Aix*Marseille université
Socialement engagée

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 17 octobre 2024 par

Tony BARBAY

Astrocyte et homéostasie potassique : implication dans les processus physio-pathologiques des réseaux moteurs spinaux

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Neurosciences

École doctorale
ED62 - Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Neurosciences de la Timone

(UMR 7289)

Composition du jury

Claire WYART	Rapporteuse
Sorbonne Université, ICM, Paris	
Alexandre CHARLET	Rapporteur
Unistra, INCI, Strasbourg	
Lucile BEN HAÏM	Examinatrice
Paris Saclay, CEA, Paris	
Maud GRATUZE	Examinatrice
AMU, INP, Marseille	
Jean-Louis MEGE	Président du Jury
AMU, APHM, Marseille	
Rémi BOS	Directeur de thèse
AMU, INT, Marseille	

AFFIDAVIT

Je soussigné, Tony Barbay, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Rémi Bos, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 14 juin 2024

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

REMERCIEMENTS

À ma grand-mère, pour ton courage, ton intelligence et ta sagesse. Cette thèse t'est dédiée, avec mon amour éternel et ma reconnaissance. Tu me manques chaque jour.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de se réunir afin de juger mon travail de thèse, en particulier mes rapporteurs, Dr. Claire Wyart et Dr. Alexandre Charlet.

Un énorme merci à mon directeur de thèse, Dr. Rémi BOS, de m'avoir pris sous son aile il y a 3 ans et demi en stage de M2 afin de « parler aux neurones ». Grâce à ton encadrement, j'ai pu obtenir une bourse de thèse afin de poursuivre nos projets ensemble. Merci de m'avoir formé à l'imagerie bi-photonique et à l'électrophysiologie sur ces satanés astrocytes ainsi que sur ces fragiles et gigantesques motoneurones. En plus d'être un super glioscientifique, tu es également un super être humain avec de vraies valeurs. Merci pour ton ouverture d'esprit, ta motivation, ton exigence ainsi que ta justesse. Merci de m'avoir laissé autant de liberté dans mon projet de thèse et de m'avoir fait confiance dans les différentes collaborations. Merci de m'avoir donné le meilleur environnement qu'un doctorant puisse souhaiter.

Une thèse, ce sont des hauts, des bas, des manips, mais ce sont aussi des rencontres. Merci à Elysa, ma meilleure amie, mon acolyte de ces dernières années pour m'avoir épaulée à chaque moment de ma vie. Merci pour tous ces fous rires, ces innombrables discussions, pour ton honnêteté et ta franchise. Tu es une personne en or, ne change rien. Si, pardon, arrête de me piquer ma bouffe les midis, de tenter des étranglements arrière (ça ne marche pas), de me voler mes provisions de nourriture, etc. (la liste est longue). Une vraie rencontre incroyable, j'en reste là car il faut aussi de la place pour les autres non mais oh. Trop hâte de monter notre labo ensemble (le carnage).

Merci à Émilie, ma n+0.5, de m'avoir formé à l'histo et de m'avoir transmis ta rigueur, non, pardon, pas ta rigueur, ta paranoïa ahah. Merci pour toutes ces discussions tant scientifiques que des commérages d'adolescents. Merci de ne pas avoir perdu espoir dans les manipulations de SCI avec les « mauvaises mères ». Plus d'une personne aurait abandonné, mais toi non. J'ai conscience que sans toi, la plupart des résultats de ma thèse n'auraient pas été possibles. Je souhaite à chaque équipe de recherche d'avoir une ingénieure aussi douée et consciencieuse que toi. Ah oui, au fait, merci pour l'huile d'olive, le vinaigre balsamique et les biscuits.

Merci à mes parents, de m'avoir offert le meilleur environnement possible afin que je puisse m'épanouir depuis le jour de ma naissance. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Merci à ma mère pour son courage, sa bienveillance et son ouverture d'esprit, tu m'as beaucoup apaisé. Merci à mon père pour son courage, sa simplicité, son esprit critique et ton accompagnement permanent dans mes projets. Merci à mon grand-père pour ton soutien, ta gentillesse et tes bêtises à mourir de rire. Merci à mon frère Mehdi, ma sœur Anaïs et à Apo pour votre bonne humeur et votre soutien, on est ensemble.

Merci à l'équipe P3M de m'avoir accueilli parmi eux, en particulier Frédéric pour tous tes conseils et ton support au cours de ma thèse ainsi qu'à Julie pour tous tes conseils pour mon monitorat et la suite de ma carrière.

Thank you, Nejada, for all those hours together in electrophysiology, for helping me at the beginning, for all your advice and your kindness. It has been a pleasure to collaborate with you in one of your postdoc projects. Thank you for integrating me into the team and for all those lunches together.

Merci à Florent pour toutes ces heures passées ensemble dans la salle de dissection et d'électrophysiologie. Merci pour ta richesse scientifique et tous nos échanges.

Merci à Jorge, aka, « el paillasso », pour tous tes conseils, ton immense expertise technique, ta gentillesse et ton réel amour pour la science. C'est un honneur d'avoir un papier ensemble, merci pour ton implication. Quel gâchis pour la science que tu n'ais pas (encore) de poste de chercheur, tu es un don pour n'importe quel institut de recherche. MACAAAAAQUE, veuve noire ? pastis Red Bull ? quiche carrée ? Zoumaï ?

Merci à mes prédécesseurs P3Miens, Benoît, Jérémy et Marine de m'avoir accueilli dans l'équipe, transmis votre savoir, aidé dans mes premières expériences, pour toutes ces pauses repas et pour tous vos conseils. Merci à vous pour mon arrachement osseux à la cheville après littéralement 2,07 secondes de jeu au basket.

Merci au Dr. Gaëlle Guiraudie Capraz de m'avoir pris sous son aile pour mon monitorat enseignement. Je n'ai jamais vu un tel investissement envers des étudiants, c'est magnifique. Chaque étudiant mériterait de côtoyer des professeurs comme toi. Merci pour tes conseils en enseignement et pour m'avoir fait confiance. Humble, accessible et ouverte d'esprit, ne change pas, c'est bien trop rare.

Merci à la Pr. Afsaneh Gaillard, une de mes enseignantes de M2, pour vos conseils sur mes choix de stages, de carrière, vos recommandations ainsi que votre implication envers les étudiants.

Merci aux Dr. Lucile Ben Haïm et Carole Escartin de m'avoir accordé votre confiance dans le cadre de vos collaborations avec Rémi.

Merci à Tom et à la Dr. Maud Gratuze de m'avoir accordé du temps afin de m'apprendre à extraire l'hippocampe de souris.

Merci à l'INT, de m'avoir accueilli, un institut incroyable où règne convivialité et entraide. Merci à Jean-Marc aka JMG, Monica, Davidou, Mélina, Mickaël, Seb, Damiano, Edith, le W (surtout pour les veuves noires), Caroline, Virginie, Elsa, Marie, Vincent, Nicolas, Hugo, JN, Maxime, Steven, Lucie, Lucio, Hannah, Alberto, Taarabte, Joëlle, Anna, Cléo, Uriel, Salvatore, Antoine. J'en oublie certainement encore…

Merci à mes amis, pour leur soutien, leur débilité sans limite, tous ces moments partagés, vous faites partie de ma réussite. Pour ne citer que vous, les Marseillais : Josef, Micka, Baz, Quentin, Anaëlle, Aurél, Laeticia, Lulu, Boutboul. Les pirates de toujours : GP, Léon, Cab, Téton, Thod, Simon, Gohu, McMilan, Le Koun, Babou, JB, Yiannis, Clém, Juliette, Kiki, Beubeu, Nathi, Nath, Disha, Momo, Jaoul, Beileini, Guena, Noé, Josian, Fifi, Jules, Gaby, Audrey. Les pirates qui ont rejoint le navire : Raph, Val, Alex et Karine, Pignoux et Meillac. Aux acolytes de saison, YWEAHHH, Louis, Ralus, Mogo, Bastien, Sanchez.

Je remercie aussi les zootechniciennes de l'INT pour l'entretien et le bien être des souris.

Je tiens également à remercier le personnel technique et d'entretien de l'institut, notamment Nadia, qui m'ont permis de réaliser ma thèse dans un environnement propre et fonctionnel.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication #1

Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network

Tony Barbay [1#], Emilie Pecchi [1#], Myriam Ducrocq [1], Nathalie Rouach[2], Frédéric Brocard [1], Rémi Bos [1]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, Marseille, France.
[2] Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France.

[#] These authors contributed equally to this work - First published: 16 January 2023 - Glia

https://doi.org/10.1002/glia.24337

Publication #2

Functional contribution of astrocytic Kir4.1 channels to spasticity after spinal cord injury

Tony Barbay [1], Emilie Pecchi [1], Jorge Ramirez Franco [1], Anton Ivanov [2], Frédéric Brocard [1], Nathalie Rouach [3], Rémi Bos [1]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, Marseille, France.
[2] Aix Marseille Univ, INSERM, INS, Inst Neurosci Syst, Marseille, France
[3] Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France.

En cours de rédaction

Publication #3

Early-life spasticity after a spinal cord injury: insights from a neonatal mouse model

Nejada Dingu[1], **Tony Barbay**[1], Florent Krust[1], Rémi Bos[1], Frédéric Brocard[1]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, Marseille, France.

En cours de rédaction

COLLABORATIONS

Collaboration #1: Dr. Lucile Ben Haïm – Paris Saclay

Mesure de l'effet de la voie astrocytaire JakCa-STAT sur l'excitabilité neuronale et l'activité synaptique des neurones pyramidaux de l'hippocampe

Collaboration #2: Dr. Carole Escartin – Paris Saclay

Mesure des propriétés électriques de 3 sous types astrocytaires dans le cortex préfrontal de souris âgées

PARTICIPATION AUX CONFÉRENCES

XVI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease - *Berlin, Germany - 2023*
Poster: Astroyctic contribution to spasticity after spinal cord injury.

Glial cells Meeting - *Lyon, France - 2023*
Poster: Astroyctic contribution to spasticity after spinal cord injury.

Symposium EDVS 2022 – Campus CNRS Joseph Aiguier – *Marseille, France - 2023*
Présentation orale: Could astrocytes be involved in spastic like symptoms after spinal cord injury?

Conférence internationale de l'INT - 5ème édition – *Campus Timone, Marseille, France - 2022*
Poster: Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network.

INT Student Meeting 2022 – *Campus Timone, Marseille, France 2022*
Présentation orale: Donwregulation of Kir4.1 channels impairs locomotor pattern by reducing interneurons oscillatory probabilities.

ENSEIGNEMENTS

2021-2022 – 64h
UE : Physiologie du neurone – Licence Neurosciences 3ème année
UE : Avancées en Biotechnologies – Licence Génomique Fonctionnelle 3ème année
UE : Découverte Science de la Vie - Licence Pasteur

2022-2023 – 64h
UE : Physiologie du neurone –Licence Neurosciences 3ème année
UE : Avancées en Biotechnologies – Licence Génomique Fonctionnelle 3ème année
UE : Découverte Science de la Vie - Travaux Dirigés - Licence Pasteur

2023-2024 – 64h
UE : Physiologie du neurone – Licence Neurosciences 3ème année
UE : Avancées en Biotechnologies – Licence Génomique Fonctionnelle 3ème année
UE : De l'atome au neurone - Licence Psychologie

BOURSES ET PRIX

Bourse ministérielle de l'école doctorale d'Aix Marseille Université (MESRI)
Financement de th.se intégrale pour 3 ans (2021-2024)

Bourse de voyage
Euroglia – Berlin 2023 (700 €)

Prix de la meilleure présentation orale
Symposium EDSVS 2023 – Campus Joseph Aiguier - Marseille (300 €)

RÉSUMÉ

Les astrocytes, un sous-type de cellules gliales, jouent un rôle clé dans la physio-pathologie du système nerveux central (SNC). Parmi l'ensemble des fonctions assurées par les astrocytes, le maintien de l'homéostasie des ions potassium (K^+) est primordial. L'expression astrocytaire des canaux potassiques à rectification entrante, notamment les canaux Kir4.1, qui soutiennent cette homéostasie K^+, a été établie au niveau du SNC. Toutefois, au niveau de la moelle épinière (ME), les implications fonctionnelles et les mécanismes de régulation de ces canaux restent en grande partie méconnue.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont eu pour but d'étudier le rôle des astrocytes et des canaux Kir4.1 dans la physiopathologie des réseaux moteurs spinaux chez la souris, tant au cours du développement qu'après lésion de la ME. Nos recherches ont abordé ce sujet à plusieurs niveaux d'analyse : de la cellule à l'organisme entier.

La ME est une structure du SNC qui reçoit et intègre des informations en provenance de la périphérie et des structures cérébrales facilitant la production d'un patron locomoteur adapté aux contraintes environnementales. Dans une première étude, nous avons démontré la contribution astrocytaire dans la rythmicité de la région ventro-médiane du segment lombaire rostral. En effet, cette région est centrale dans la genèse du rythme locomoteur où siègent des interneurones ayant des propriétés intrinsèques dites auto-rythmiques. En combinant des approches électrophysiologiques, de l'imagerie calcique bi-photonique, des outils pharmacologiques et génétiques nous avons démontré que: (1) les astrocytes sont actifs avant et pendant les oscillations neuronales, (2) les canaux astrocytaires Kir4.1 sont nécessaires au maintien de ces oscillations neuronales *ex vivo*, et (3) qu'ils participent également à la modulation du patron locomoteur *in vivo*.

Dans une seconde étude, nous avons étudié l'impact des canaux Kir4.1 sur la spasticité après une lésion de la ME. Ce trouble moteur, caractérisé par une hypertonie musculaire partiellement dûe à une hyperexcitabilité des motoneurones a été moins étudié du point de vue de la contribution astrocytaire. Suite à une lésion de la ME, nous avons identifié des changements morpho-fonctionnels chez les astrocytes entourant les motoneurones lombaires, incluant une hypertrophie et l'expression de marqueurs pro-inflammatoires, ainsi qu'une altération des signaux calciques et des déficits des propriétés électriques. Ces astrocytes réactifs présentent également une acidose excessive réduisant la fonctionnalité des Kir4.1 associée à une dyshoméostasie K^+ et une hyperexcitabilité des réseaux moteurs spinaux. La correction génétique par gain de fonction des canaux Kir4.1 a permis de réduire les symptômes spastiques chez des souris médullo-lésées, ouvrant des perspectives thérapeutiques prometteuses.

Mots clés : moelle épinière - intéraction neurogliale - astrocyte - kir4.1 - locomotion - spasticité

ABSTRACT

Astrocytes, one of the most important subtypes of glial cells, play a key role in the pathophysiology of the central nervous system (CNS). Among the various functions performed by astrocytes, maintaining potassium ion (K^+) homeostasis is crucial. The astrocytic expression of inwardly rectifying potassium channels, particularly Kir4.1 channels, which support this K^+ homeostasis, has been established in the CNS. However, in the spinal cord (SC), the functional implications and regulatory mechanisms of these channels are largely unknown.

The research undertaken during this thesis aimed to study the role of astrocytes and Kir4.1 channels in the pathophysiology of spinal motor networks in mice, both during development and after spinal cord injury (SCI). Our research addressed this topic at multiple levels of analysis, from the cell to the whole organism.

The SC is a structure of the CNS that receives and integrates information from the periphery and brain structures, facilitating the production of a locomotor pattern adapted to environmental constraints. In a first study, we demonstrated the astrocytic contribution to the rhythmicity of the ventromedial region of the rostral lumbar segment. Indeed, this region is central in the genesis of locomotor rhythm where interneurons with intrinsic auto-rhythmic properties are located. By combining electrophysiological approaches, bi-photon calcium imaging, pharmacological and genetic tools, we demonstrated that: (1) astrocytes are active before and during neuronal oscillations, (2) Kir4.1 astrocytic channels are necessary to maintain these neuronal oscillations *ex vivo*, and (3) they also participate in the modulation of the locomotor pattern *in vivo*.

In a second study, we investigated the impact of Kir4.1 channels on spasticity after SCI. This motor disorder, characterized by muscle hypertonia partly due to the hyperexcitability of motoneurons, has been less studied from the perspective of astrocytic contribution. Following SCI, we identified morpho-functional changes in astrocytes surrounding the lumbar motoneurons, including hypertrophy and the expression of pro-inflammatory markers, as well as an alteration of calcium transients and deficits in electrical properties. These reactive astrocytes also exhibit excessive acidosis reducing the functionality of Kir4.1 associated with a K^+ dyshomeostasis and hyperexcitability of the spinal motor networks. Genetic correction by gain of function of Kir4.1 channels has been able to reduce spastic symptoms in SCI mice, opening promising therapeutic perspectives.

Keywords: spinal cord - neuroglial crosstalk - astrocyte - kir4.1 - locomotion - spasticity

SOMMAIRE

AFFIDAVIT 2
REMERCIEMENTS 3
LISTE DES PUBLICATIONS 5
COLLABORATIONS 5
PARTICIPATION AUX CONFÉRENCES 6
ENSEIGNEMENTS 6
BOURSES ET PRIX 7
RÉSUMÉ 8
ABSTRACT 9
SOMMAIRE 10
LISTE DES ILLUSTRATIONS 16
LISTE DES TABLES 17
LISTES DES ABREVIATIONS 18
INTRODUCTION 19
I. Les astrocytes, une population gliale clé du système nerveux central 20
A. Historique des cellules gliales 20
B. Évolution du concept astrocytaire : de glue à « star » du système nerveux central (SNC) 21
C. Identification morpho-fonctionnelle des astrocytes 22
1. Morphologie 22
2. Les marqueurs astrocytaires 22
- La glial fibric acid protein GFAP 23
- La glycoprotéine S100β 23
- La glutamine synthétase (GS) 24
- L'aldéhyde dehydrogenase 1, sous type L1 (Aldh1L1) 24
3. Propriétés électrophysiologiques 26
D. Hétérogénéité astrocytaire 28
1. À la quête du vrai nombre d'astrocytes dans le cerveau : focus sur la densité astrocytaire 28
2. Hétérogénéité morphologique 29
3. Hétérogénéité identitaire 32
4. Hétérogénéité fonctionnelle 32
E. Les astrocytes : les gardiens de l'homéostasie ionique K^+ 33
1. L'homéostasie K^+ systémique 33

2. L'homéostasie K^+ du SNC : des variations contrôlées par le duo glial astrocyte - oligodendrocyte 35
- Maintien du K^+ dans le SNC 35
- Évidence fonctionnelle du tamponnage spatial astrocytaire dans le maintien de l'homéostasie K^+ 36
- Implication oligodendrocytaire dans le maintien du K^+ extracellulaire 38

3. Les acteurs protéiques du maintien de l'homéostasie K^+ 38
- Les pompes ATPases Na^+/K^+ 38
- Les co-transporteurs $Na^+/K^+/2Cl^-$ 39
- Les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) 40

4. Les canaux Kir4.1 41
- Structure et localisation 41
- Implication des Kir4.1 dans les propriétés biophysiques des astrocytes 41
- Implication des Kir4.1 dans le tamponnage spatial 42
- Modulation fonctionnelle des canaux Kir4.1 43

F. Interaction neurone-astrocyte 44
1. Organisation morpho-anatomique de la synapse tripartite 45
2. Intégration des signaux et excitabilité astrocytaire calcique 47
- Détection de l'activité neuronale 47
- Intégration des signaux: la complexité du signal calcique astrocytaire 47

3. La gliotransmission 50
4. Influence de la modulation astrocytaire du K^+ sur l'excitabilité neuronale 51

G. Réactivité astrocytaire 52
1. Définition : vers un consensus général ? 52
2. Hétérogénéité des astrocytes réactifs 54
3. Les astrocytes réactifs dans la moelle épinière pathologique 55
- La sclérose en plaque 55
- L'atrophie musculaire spinale (AMS) 56
- La cicatrice gliale à la suite à une lésion de la moelle épinière 57

4. Réactivité astrocytaire et perte de fonction : négligence des astrocytes ? 58
- Aberrance des signaux calciques astrocytaires 58
- Perte du couplage jonctionnel 59
- Perturbation de l'homéostasie K^+ 60

H. Les points clés du chapitre 61

II – La locomotion : reflet de la rythmogénèse spinale 62

A. La rythmogénèse au sein du SNC 62

B. La locomotion dans le règne animal 62
C. Le SNC dans la locomotion 64
1. Les centres supraspinaux dans la locomotion 65
2. La moelle épinière dans la locomotion 66
- Émergence du concept de générateur de patron centraux (GPC) spinal 66
- Localisation et architecture du GPC 67
D. Diversité neuronale dans la genèse du rythme et du patron locomoteur 68
1. Le générateur du patron locomoteur 69
- L'alternance flexion / extension 69
- L'alternance gauche / droite 70
2. Le générateur du rythme locomoteur 72
E. Les mécanismes cellulaires sous-jacents à la rythmogénèse 74
1. Couplage jonctionnel électrique et rythmogénèse 75
2. Les courants ioniques sous-jacents à la rythmogenèse 76
- Le courant sodique persistant (I_{NaP}) 76
- Le courant K^+ I_M 76
- Le courant cationique entrant non sélectif activé par le calcium (I_{CAN}). 77
- Le courant de rebond activé par l'hyperpolarisation (I_h) 77
3. Base ionique de la rythmogénèse 78
- Le chlore extracellulaire $(Cl^-)_e$ 78
- Le sodium extracellulaire $(Na^+)_e$ 79
- Le calcium extracellulaire $(Ca^{2+})_e$ 79
- Importance du potassium $(K^+)_e$ extracellulaire dans la rythmogénèse 81
4. Implication fonctionnelle des astrocytes dans la rythmogénèse 83
- Modulation astrocytaire de la respiration 84
- Modulation astrocytaire de la locomotion 84
- Enquête au niveau du GPC masticateur d'une gliotransmission non conventionnelle : implication du S100β 86
- Implication du couplage astrocytaire au niveau du GPC masticateur 87
F. La sortie motrice : les motoneurones 88
1. Les différents sous types de motoneurones 88
2. Les différents types d'unités motrices 89
3. Les différents types de fibres musculaires 90
G. Points clés du chapitre 92
III - Physiopathologie de la spasticité à la suite d'une lésion de la moelle épinière 93
A. Les lésions médullaires 93

1. Définition & Épidémiologie 93
2. Les différents types de lésion médullaire 94
3. Impact sur les fonctions sensorielles 95
4. Impact sur les fonctions végétatives 96
5. Impact sur les fonctions motrices 97
B. La spasticité 99
1. Définition 99
2. Les mécanismes sous-jacents 100
- La désinhibition de l'arc réflexe myotatique 100
- Diminution du transporteur KCC2 et désinhibition 101
- Augmentation du courant sodique persistant (I_{NaP}) et hyperexcitabilité motoneuronale 103
- Implication des astrocytes dans la spasticité : effet protecteur de Rac1 104
3. Outils d'évaluation et prise en charge 105
- Les méthodes cliniques 105
- Les méthodes biomécaniques 106
- Les méthodes électrophysiologiques 106
- Prise en charge thérapeutique et non thérapeutique 108
C. Les points clés du chapitre 109
OBJECTIFS DE RECHERCHE DE LA THÈSE 110
MATÉRIELS ET MÉTHODES 111
I. La souris juvénile comme modèle expérimental 112
A. Pertinence du modèle souris juvénile 112
B. Les modèles de souris transgéniques 112
II. Chirurgie et injection de vecteurs viraux 113
A. Les virus adéno-associés 113
B. Injection intrathécale des virus 113
C. Le modèle de lésion spinal (SCI) 114
III. Dissection et mise en place des préparations in vitro 114
A. La moelle épinière isolée 114
B. Les tranches de moelle épinière 115
IV. Enregistrements électrophysiologiques 115
A. Enregistrement extracellulaire 115
1. La locomotion fictive 115
2. Enregistrement électromyographique (EMG) 116
B. Enregistrement intracellulaire: patch clamp en configuration cellule entière ... 116

1. Les motoneurones 117
2. Les interneurones ventromédian 117
3. Les astrocytes 117
V. Imagerie bi-photonique 118
A. Imagerie calcique intracellulaire 118
1. Préparation du tissue 118
2. Acquisition 118
B. Imagerie du pH intracellulaire astrocytaire 119
1. Préparation du tissue 119
2. Acquisition 119
VI. Composés pharmacologiques 119
VII. Immunohistochimie 121
A. Préparation du tissu 121
B. Acquisition des marquages 121
VIII. Western Blot 122
IX. Test comportementaux 122
A. Analyse du pattern locomoteur avec le système catwalk 122
B. Rotarod 123
C. Test de nage forcée 123
D. Analyse cinématique des spasmes musculaires 123
X. Analyse des données 124
XI. Tests statistiques 124
RÉSULTATS 126
I. Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network 127
II. Functionnal contribution of Kir4.1 channels to spasticity after spinal cord injury. 160
DISCUSSION 217
I. Les astrocytes du GPC locomoteur, mécanistique et hétérogénéité : un prérequis essentiel ? 218
A. Les astrocytes dans le rythmogénèse : un acteur essentiel ? 218
B. Les astrocytes dans le puzzle de la rythmogénèse : comment concilier l'ensemble des mécanismes ? 219
C. L'hétérogénéité fonctionnelle des astrocytes dans la rythmogénèse 221
D. Les astrocytes et les répertoires locomoteurs 221
II. Les astrocytes dans la spasticité : une nouvelle piste thérapeutique ? 224

A. À la recherche du fautif dans l'émergence des astrocytes réactifs dans la spasticité suite à une lésion spinale 224
B. Hétérogénéité des astrocytes dans la spasticité après une lésion de la moelle épinière 225
1. Hétérogénéité territoriale, morphologique et inflammatoire 225
2. Hétérogénéité fonctionnelle 226
C. L'œuf ou la poule, les neurones ou les astrocytes ? Qui est à l'origine de l'émergence des symptômes spastiques ? 228
D. Les astrocytes peuvent-ils vraiment soigner la spasticité ? 230
E. La spasticité dans diverses pathologies : les astrocytes réactifs en tant que dénominateur commun ? 231
LIMITATIONS DES ÉTUDES 233
RÉFÉRENCES 235

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Première représentation des cellules gliales. 20
Figure 2 : Evolution technique de la visualisation morphologique des astrocytes. 21
Figure 3 : Marquage des astrocytes avec 4 différents marqueurs au niveau du striatum de souris. 24
Figure 4 : Spécificité et redondance du marqueur Aldh1L1. 25
Figure 5 : Compararaison des caractéristiques électrophysiologiques des neurones et des astrocytes du striatum. 27
Figure 6 : Ratio neurone-astrocyte (RAN) dans différentes régions du SNC. 29
Figure 7 : Diversité morphologique inter-espèces des astrocytes. 30
Figure 8 : Diversité morphologique inter-régional des astrocytes chez la souris. 31
Figure 9 : Ensemble des fonctions assurées par les astrocytes au sein du SNC. 34
Figure 10 : Le tamponnage spatial par le syncytium astrocytaire. 37
Figure 11 : Procédure pharmacologique pour isoler la conductance Kir4.1. 42
Figure 12 : Nombre de publications dans la base de donnée PubMed contenant le mot clé « astrocytes » entre les années 1948 et 2024. 45
Figure 13 : Différente représentation illustrant l'intéraction morphologique neurone-astrocyte au niveau de la synapse tri-partite. 46
Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes sources de Ca^{2+} intracellulaires des astrocytes. 48
Figure 15 : Illustration de la dynamique spatio-temporelle des signaux calciques au niveau du doma et de leur prolongements. 49
Figure 16 : Evaluation multivariée des astrocytes réactifs. 53
Figure 17 : Les différents modes de locomotion dans le règne animal. 63
Figure 18 : Cycle de pas de la jambe droite chez l'Homme. 64
Figure 19 : Projections des centres supra-spinaux sur le réseau locomoteur spinal. 66
Figure 20 : Localisation du GPC locomoteur chez le rongeur nouveau-né. 68
Figure 21 : Localisation des interneurones commissuraux. 70
Figure 22 : Rôle des neurones V0 dans l'alternance bilatérale. 71
Figure 23 : Identification des interneurones du réseau locomoteur. 74
Figure 24 : Propriétés de décharge tonique *versus* bouffées rythmiques. 75
Figure 25 : Mesure des variations de concentrations extracellulaire en Ca^{2+} et K^+ au cours de la locomotion fictive sur moelle épinière isolée. 80
Figure 26 : Influence des concentrations extracellulaires en Ca^{2+} et K^+ sur le pattern de décharge. 81
Figure 27 : Effet de la concentration extracellulaire en K^+ sur la locomotion ficitve. 82
Figure 28 : Émergence de la locomotion, de la base ionique à la contraction musculaire. 83
Figure 29 : : Le relargage de S100B par les astrocytes permet l'induction de bouffées rythmiques au niveau du GPC masticateur. 86
Figure 30 : : Le syncitium astrocytaire permet l'émergence des bouffées rythmiques. 87
Figure 31 : Innervation musculaire. 89
Figure 32 : Caractéristiques des MNs alpha et gamma. 91
Figure 33 : Anatomie des différents types de lésion traumatiques de la moelle épinière. 94
Figure 34 : Possible symptômes après une lésion de la moelle épinière. 97
Figure 35 : Innervation des organes par la moelle épinière. 98
Figure 36 : Les signes cliniques de la spasticité. 100
Figure 37 : La désinhibition post-lésionnelle liée à la baisse du co-transporteur KCC2. 102
Figure 38 : L'hyperexcitabilité des motoneurones sous-lésionnels est en partie liée à l'augmentation du courant sodique persistant (I_{NaP}). 104
Figure 39 : Réflexe de Hoffman (réflexe H). 107
Figure 40 : Exemple de suivi automatique de points spécifique par DeepLabcut chez une souris. 124
Figure 41 : Proposition des mécanismes astrocytaires pour favoriser l'environnement ionique propice à l'émergence des bouffées rythmiques au niveau des interneurones dy GPC locomoteur. 223

LISTE DES TABLES

Table 1 : L'échelle modifiée d'Ashworth. 106
Table 2 : L'échelle de Penn. 106
Table 3 : Ensemble des vecteurs viraux utilisés 113
Table 4 : Ensemble des composés pharmacologiques 120
Table 5 : Liste des différents anticorps utilisés 121

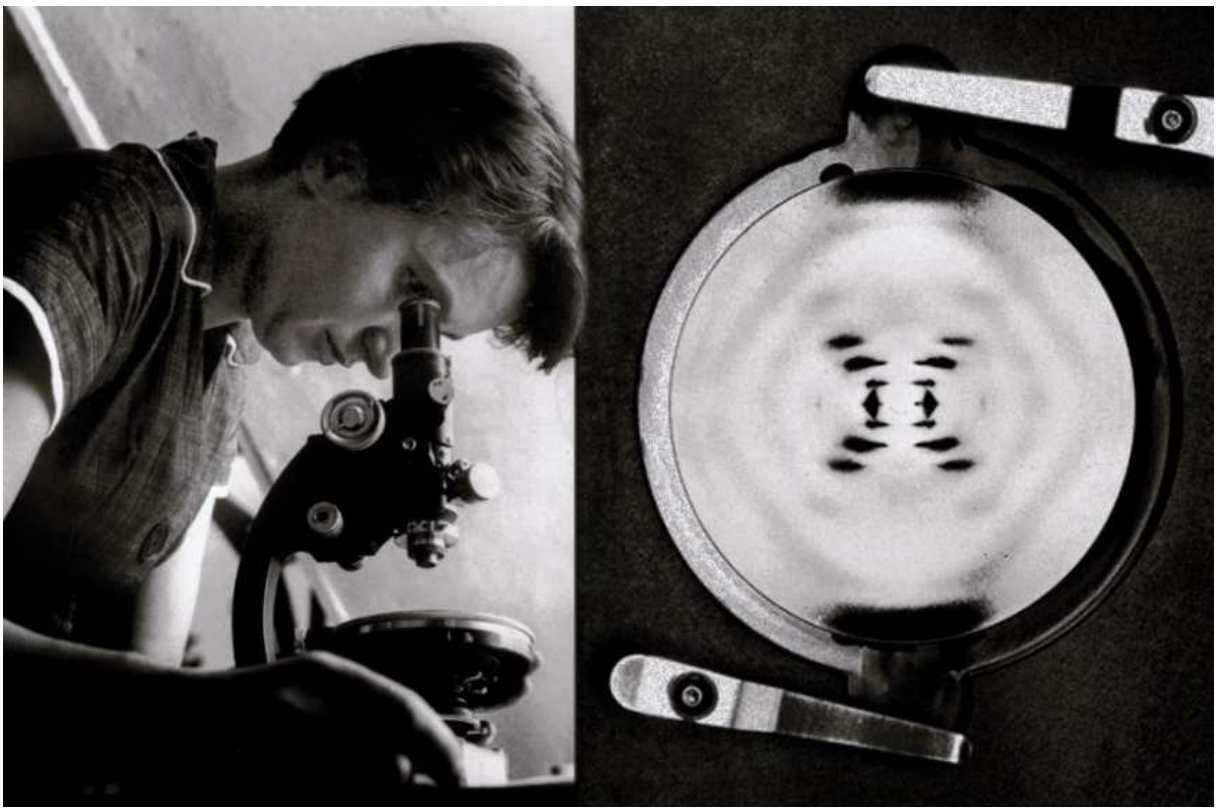
LISTES DES ABREVIATIONS

AAV : Adéno-associated virus
aCSF : Liquide cérébrospinal artificiel
Aldh1L1: 10-formyltétrahydrofolate déshydrogénase
AMS : Sclérose musculaire spinale
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ADP : Adénosine di-phosphate
ATP : Adénosine tri-phosphate
AVC : Arrêt vasculaire cérébral
BAPTA : Chélateur Ca^{2+}
Ba^{2+} : Ion barium
Ca^{2+} : Ion calcium
CB1 : Récepteur 1 aux endocannabinoïdes
ChAT : Choline acétyltransférase
CIN : Interneurone commissural
CN : Noyau cunéiforme
E : Jour du stade embryonnaire
EAAT1 : Transporteur d'acide aminé excitateur 1
E_K : Equilibre des ions K^+
EMG : Electromyogramme
ERRβ : Récepteur β lié aux œstrogènes
FF : Unité motrice rapide et fatigable
FR : Unité motrice rapide et résistante
GFAP: Glial Fibric Acid Protein
GLT-1 : Transporteur au glutamate 1
GPC : Générateur de patron central
GS : Glutamine synthetase
$HCO3^-$: Ion bicarbonate
Iba1: Marqueur de la microglie
IN(s): Interneurone(s)
IL-1β : Interleukine 1β
IL-6 : Interleukine 6
I_{CAN} : Courant cationique entrant non sélectif
I_{NaP} : Courant sodique entrant persitant
I_{NaT} : Courant sodique entrant transitoire
KO : knock out
LC : Locus coeruleus
LIF : Leukaemia inhibitory factor
LTD : Dépression synaptique à long terme
LTP : Potentialisation synaptique à long terme
L1-L2 : Segment lombaire 1-2
mM : Milimolaire
MMP9 : Métalloprotéase matricielle 9
MN(s): Motoneurone(s)
MRF : Neurones médullaires
MSN : Neurone épineux de taille moyenne
mV : millivolt
Nav : Canaux sodiques voltage-dépendants
NeuN: Marqueur des neurones
NG2a: Progéniteur d'oligodendrocytes
NKKC1 : Co-transporteur 1 $Na^+/K^+/Cl^-$
NKKC2 : Co-transporteur 2 $Na^+/K^+/Cl^-$
NMDA : N-Méthyl D-Aspartate
OTR : Récepteur au neuropeptide OT
P : Jour post-natal
PA : Potentiel d'action
PKC : Protéine kinase C
PPN : Noyau pédonculo-pontins
qPCR : PCR quantitative
RAN : Ratio astrocyte-neurone
RE : Réticulum endoplasmique
RMP : Potentiel de membrane au repos
RN : Neurones réticulaires pontiques
RNAseq : Séquençage de l'ARN
SEP : Sclérose en plaques
SFR : Unité motrice lente
SMN : Gène de survie du motoneurone
S100β : Glycoprotéine fixatrice de Ca^{2+}
SCI : Spinal cord injury
SNC : Système nerveux central
SP : Substance P
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TRH : Thyrotropin
TRN : noyau retrotrapézoïde
T13 : Segment thoracique 13
UM : Unité motrice
VGLUT1 : Transporteur vésiculaire au glutamate de type 1
Vm : Potentiel de membrane
VS : Médulla oblongata
5-HT : Sérotonine
$(pH)_i$: pH intracellulaire
$[ATP]_i$: Concentration en ATP intracellulaire
$[Ca^{2+}]_e$: Concentration en calcium extracellulaire
$[Cl^-]_e$: Concentration en chlore extracellulaire
$[K^+]_e$: Concentration en potassium extracellulaire
$[Na^+]_e$: Concentration en sodium extracellulaire

INTRODUCTION

« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait,
on ne voit que ce qui reste à faire »

Marie Curie
Physicienne, Scientifique (1867-1934)



Photographie de *Rosalind Elsie Franklin et de sa grande découverte sur la structure de la double hélice* d'ADN (51 picture).

A gauche, photographie de Rosalind Elsie Franklin avec à droite, sa découverte historique sur la structure en double hélice de l'ADN. Rosalind Elsie Franklin (1920-1958) était une biochimiste britannique renommée pour ses contributions cruciales à la compréhension de la structure de l'ADN. Après des études à l'Université de Cambridge, elle a travaillé à Paris, où elle a perfectionné ses compétences en cristallographie aux rayons X. De retour à Londres, au King's College, ses photographies aux rayons X de l'ADN, en particulier la célèbre Photo 51 (à droite), ont été essentielles pour la découverte de la structure en double hélice de l'ADN. Malgré son rôle central, elle n'a pas reçu de reconnaissance équivalente de son vivant.

I. Les astrocytes, une population gliale clé du système nerveux central

A. Historique des cellules gliales

Les cellules gliales ont été identifiées pour la première fois par le berlinois Rudolf Virchow au XIX siècle (Figure 1) lors de recherche de tissu conjonctif dans le cerveau (Virchow, 1846 ; Virchow, 1856 ; Virchow, 1858). Le nom de "cellule gliale" est dérivé du mot grec ancien "glía, γλία ", qui signifie "colle". La toute première identification expérimentale d'une cellule gliale a toutefois été produite quelque temps avant la classification terminologique de Virchow. Il s'agissait d'une cellule gliale de type radial de la rétine (Figure 1), la cellule de Müller, décrite par Heinrich Müller en 1851 (Müller, 1851). En 1857, Karl Bergmann a découvert des cellules gliales de type radial dans le cervelet, aujourd'hui connues sous le nom de cellules gliales de Bergmann (Bergmann, 1957). Au niveau spinal, c'est Camillo Golgi qui a été un des premiers à visualiser des cellules gliales (Golgi, 1870). Il démontra que la glie représentait une population

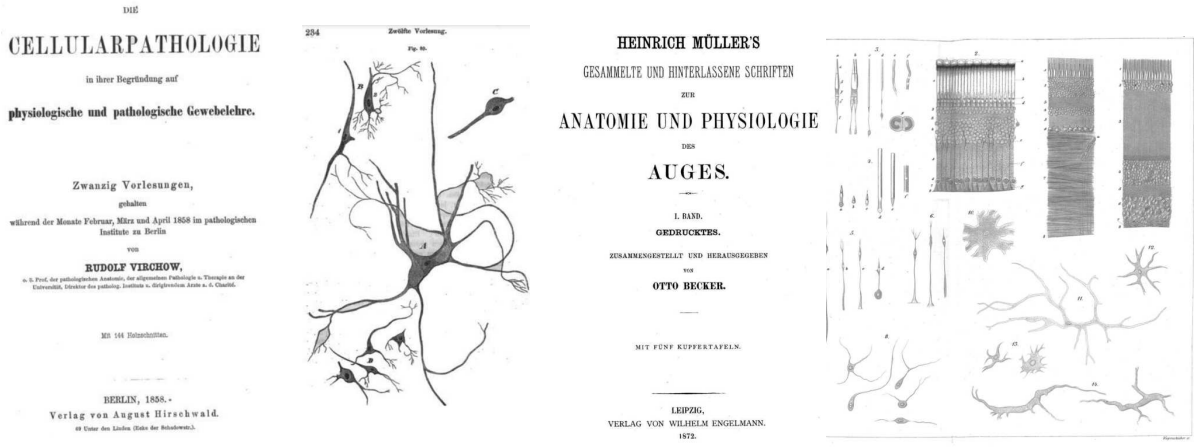


Figure 1 : Première représentation des cellules gliales.
Page de couverture de l'ouvrage « Cellularpathologie » rédigé par Rudolf Virchow en 1958 accompagné de la première représentation de cellule gliale au sein de tissu conjonctif dans le cerveau (gauche). Page de couverture de l'ouvrage « Anatomie and physiologie » rédigé par Heinrich Müller, contenant l'illustration de la glie radiaire au niveau de la rétine (droite).

cellulaire distincte des cellules nerveuses. En utilisant la technique de coloration au chromate d'argent (*reazione nera*), Golgi a ainsi décrit une remarquable diversité morphologique des cellules gliales dans le système nerveux central (SNC) et a démontré l'existence de réseaux gliaux encapsulant les vaisseaux sanguins (Figure 2) (Golgi, 1885 ; Chvátal et Verkhratsky, 2018). Les cellules gliales sont des cellules non neuronales du système nerveux. Les termes "neuroglie" ou "glie" décrivent les cellules (i) d'origine neuroépithéliale (astrocytes,

oligodendrocytes, cellules progénitrices d'oligodendrocytes (NG2a), cellules épendymaires, glie radiales), (ii) d'origine myéloïde (microglie) et (iii) issues de la crête neurale (glie périphérique). Il y a au moins autant, sinon plus, de cellules gliales que de neurones dans le cerveau. Elles constituent, selon l'espèce de mammifère, entre 33 et 66 % de la masse cérébrale totale (Azevedo et al., 2009 ; Herculano-Houzel, 2014).

B. Évolution du concept astrocytaire : de glue à « star » du système nerveux central (SNC)

Le terme astrocyte (αστρον κψτοσ ; astron, étoile et kytos, cellule, c'est-à-dire cellule en forme d'étoile) a été introduit par Michael von Lenhossék en 1895 (Lenhossék, 1895). Les astrocytes sont une classe de cellules neurales d'origine neuroépithéliale qui maintiennent l'homéostasie et assurent la défense du SNC. Le terme astrocytes pour désigner la neuroglie parenchymateuse a été largement popularisé par Santiago Ramón y Cajal, qui a utilisé et mis au point différentes techniques dont une à base de coloration à l'or et au chlorure de mercure spécifique des astrocytes (García-Marín et al., 2007) marquant ainsi la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Cette coloration a permis à Cajal de confirmer l'origine des astrocytes à partir de la glie radial (Ramón y Cajal, 1913 ; Ramón y Cajal, 1916). Pendant longtemps les astrocytes ont été considéré comme une « glue » présente pour colmater les régions du système nerveux centrale absence en neurone. Cependant, l'émergence de nouveaux outils (Figure 2), combinée à l'incapacité de certaines hypothèses purement neuronales à expliquer certains phénomènes biologiques, a propulsé les astrocytes au rang d'acteurs majeurs, tant à l'échelle des réseaux neuronaux que du comportement.

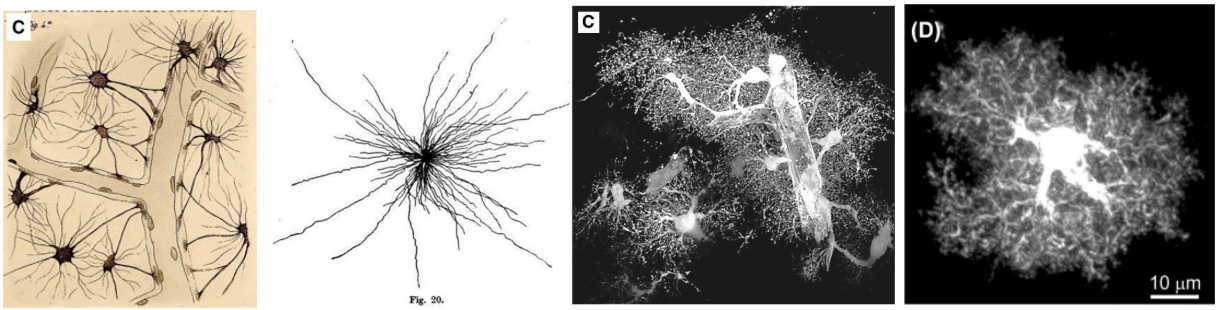


Figure 2 : Evolution technique de la visualisation morphologique des astrocytes.
A gauche, dessin de Camillo Golgi d'astrocytes contactant les vaisseaux sanguins, issue de Golgi C, 1903. Millieu gauche, dessin de Michael v. Lenhossék illustrant un astrocyte, issue de « Feinere bau des nervensystems », 1895). Millieu droite, Astrocyte protoplasmique cortical exprimant eGFP contactant les vaisseaux sanguins, issue de

Verkhratsky et Nedergaard, 2018. A droite, acquisition confocal à haute résolution d'un astrocyte (Aldh1l1) issue, de Chai et al., 2017.

C. Identification morpho-fonctionnelle des astrocytes

1. Morphologie

Une des caractéristiques les plus notables des astrocytes est leur morphologie atypique de type spongiforme. Leur structure est d'une grande complexité et se compose de différents compartiments. On retrouve bien évidemment le soma, qui contient le noyau, ainsi que des prolongements dits primaires ou souches qui émanent du soma. Leur nombre varie selon la région cérébrale et le contexte (voir section « Hétérogénéité des astrocytes »), mais est généralement compris entre 4 et 10 (Khakh et Sofroniew, 2015). On retrouve aussi les prolongements secondaires et tertiaires qui proviennent des prolongements primaires et constituent la majorité de l'arborisation d'un astrocyte (environ plus d'une centaine). Les terminaisons de ces prolongements astrocytaires entrent en contact avec les synapses (synapse tri-partite) ou avec les vaisseaux sanguins (unité glio-vasculaire). On estime que 90 à 95 % de la surface d'un astrocyte est représentée par l'ensemble de ces prolongements (Khakh et Sofroniew, 2015 ; Reeves et al., 2011).

De façon paradoxale, malgré une grande arborescence, les domaines des astrocytes ne se chevauchent que très peu (5%) de sorte que chaque astrocyte occupe un domaine qui lui est propre (Verkhratsky et Nedergaard, 2018 ; Bushong et al., 2002). Malheureusement, l'étude de la morphologie d'un astrocyte se limite majoritairement aux prolongements primaires, secondaires, voire tertiaires, en raison d'une résolution insuffisante pour imager un astrocyte complet à l'échelle nanométrique. Afin de les distinguer dans un tissu à forte densité cellulaire et variée, des marqueurs spécifiques sont utilisés.

2. Les marqueurs astrocytaires

Dans cette section, nous allons décrire en détail certains marqueurs essentiels à l'identification des astrocytes. Je me concentrerai uniquement sur les principaux marqueurs, ceux que j'ai le plus fréquemment utilisés au cours de ma thèse et qui sont couramment mentionnés dans la majorité des publications consultées. Il est important de noter qu'il existe

d'autres marqueurs, chacun présentant ses propres avantages et inconvénients selon la problématique scientifique abordée.

- La glial fibric acid protein GFAP

Le marqueur astrocytaire le plus connu et le plus communément utilisé est la GFAP (Figure 3), découverte dans les années 1970 (Eng et al., 1971 ; Uyeda et al., 1972). Cette protéine, constituant majeur des filaments intermédiaires du cytosquelette, a rapidement fait l'unanimité en tant que marqueur astrocytaire du fait de son expression exclusive dans les astrocytes (Bignami et al., 1972 ; Ludwin et al., 1976). Aujourd'hui encore, dans la grande majorité des publications, la GFAP est utilisée pour visualiser les astrocytes.

Cependant il est important de noter que la GFAP ne permet pas de visualiser l'ensemble des astrocytes mais uniquement une proportion limitée. Certaines régions sont quasiment dépourvues en GFAP, ce qui en fait un marqueur limité (Kimelberg, 2004 ; Walz et Lang, 1998). À l'inverse, certaines régions comme l'hippocampe contiennent 80% d'astrocytes positifs à la GFAP. De plus, parmi les astrocytes GFAP positifs, l'immunomarquage ne révèle que les prolongements primaires et secondaires, laissant le reste du domaine astrocytaire non marqué (Connor et Berkowitz, 1985). En réponse à ces limitations, le marqueur GFAP est davantage utilisé pour mettre en partie en évidence le phénomène de réactivité astrocytaire (voir section « réactivité astrocytaire »).

- La glycoprotéine S100β

La glycoprotéine S100β est une protéine fixatrice du calcium (Ca^{2+}) et agit comme chélateur et transducteur dans la signalisation intracellulaire Ca^{2+} (Donato et al., 2013). Cette glycoprotéine peut également être sécrétée via un mécanisme encore inconnu, constituant ainsi une gliotransmission non-conventionnelle (Morquette et al., 2015), et pourrait également jouer un rôle dans la modulation de la plasticité synaptique (Nishiyama et al., 2002).

La S100β présente un intérêt particulier puisqu'elle permet de marquer un plus grand nombre d'astrocytes que la GFAP (Figure 3) (Ogata et al., 2002). En effet, dans le cerveau de rat, la S100β permettrait de marquer environ trois plus d'astrocytes que la GFAP. Cependant, la spécificité de la S100β pour les astrocytes est moins forte que pour la GFAP. Dans le SNC, la S100β est également exprimé dans les oligodendrocytes, les cellules épendymaires,

l'épithélium, les cellules vasculaires endothéliales, ainsi que dans certains neurones du tronc cérébral, du cervelet et du système limbique (Steiner et al., 2007 ; Rickmann et Wolff, 1995).

- La glutamine synthétase (GS)

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme clé dans le recyclage du glutamate au sein du SNC. Elle permet de marquer une grande diversité d'astrocytes (Figure 3) tels que la glie radiaire, la glie de Bergmann et les cellules de Müller (Anlauf et Derouiche, 2013). De plus, certains astrocytes qui ne sont pas révélés par la GFAP, peuvent être visualisés avec la GS (Anlauf et Derouiche, 2013). Au sein de l'hippocampe, parmi les astrocytes positifs à la GS, seuls 60% sont également positifs pour la GFAP. Étant une enzyme cytosolique, elle marque principalement le soma, bien que certaines études montrent son expression au niveau des prolongements périsynaptiques (Derouiche et Frotscher, 1991 ; Norenberg et Martinez-Hernandez, 1979). Comme pour certains marqueurs précédents, la GS est également présente dans les oligodendrocytes (Cammer, 1990 ; D'Amelio et al., 1990 ; Miyake et Kitamura, 1992 ; Ben Haïm et al., 2021) et les neurones (Robinson, 2001).

- L'aldéhyde dehydrogenase 1, sous type L1 (Aldh1L1)

Dans le cadre d'études *in vivo* utilisant l'optogénétique ou le tamoxifène pour activer spécifiquement les astrocytes, les marqueurs évoqués précédemment posent un problème. En effet, leur expression non spécifique rend toute conclusion sur l'effet des astrocytes sur le comportement potentiellement erroné. Pour surmonter cette limitation, plusieurs études ont mis en avant une enzyme impliquée dans le métabolisme du folate, l'Aldh1L1, comme un

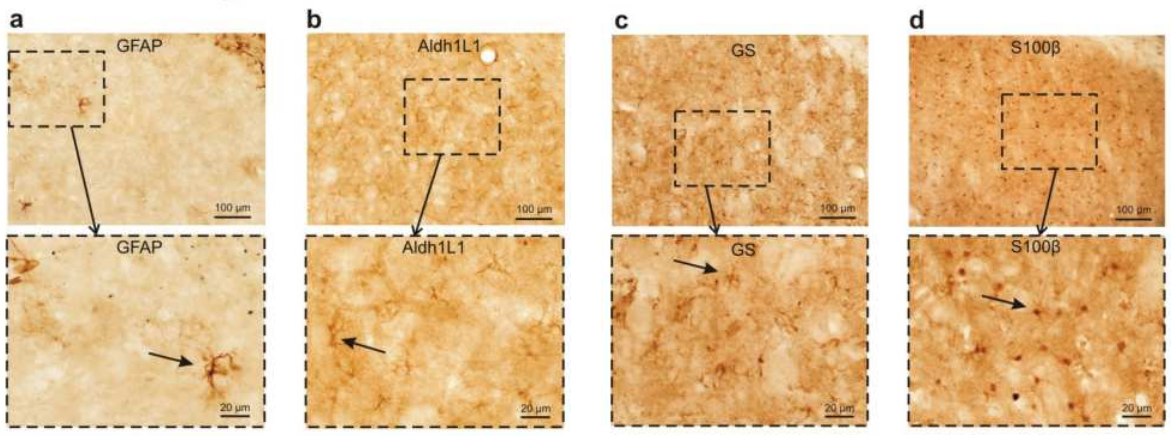


Figure 3 : Marquage des astrocytes avec 4 différents marqueurs au niveau du striatum de souris.
(A*) GFAP, (B) Aldh1L1, (C) GS, (D) S100ß. Les images dans les panneaux inférieurs représentent des grossissements des panneaux supérieurs. Issue de Tong et al., 2014*

marqueur fiable des astrocytes (Gong et al., 2003 ; Cahoy et al., 2008 ; Molofsky et Deneen, 2015 ; Zhang et al., 2014 ; Zhang et al., 2016 ; Foo et Dougherty, 2013).

Une étude récente a alors exploré l'utilisation du promoteur Aldh1L1 comme un marqueur adéquat pour étudier les fonctions astrocytaires *in vivo*. Les résultats ont montré que le promoteur Adlh1L1 permet d'infecter la grande majorité des astrocytes

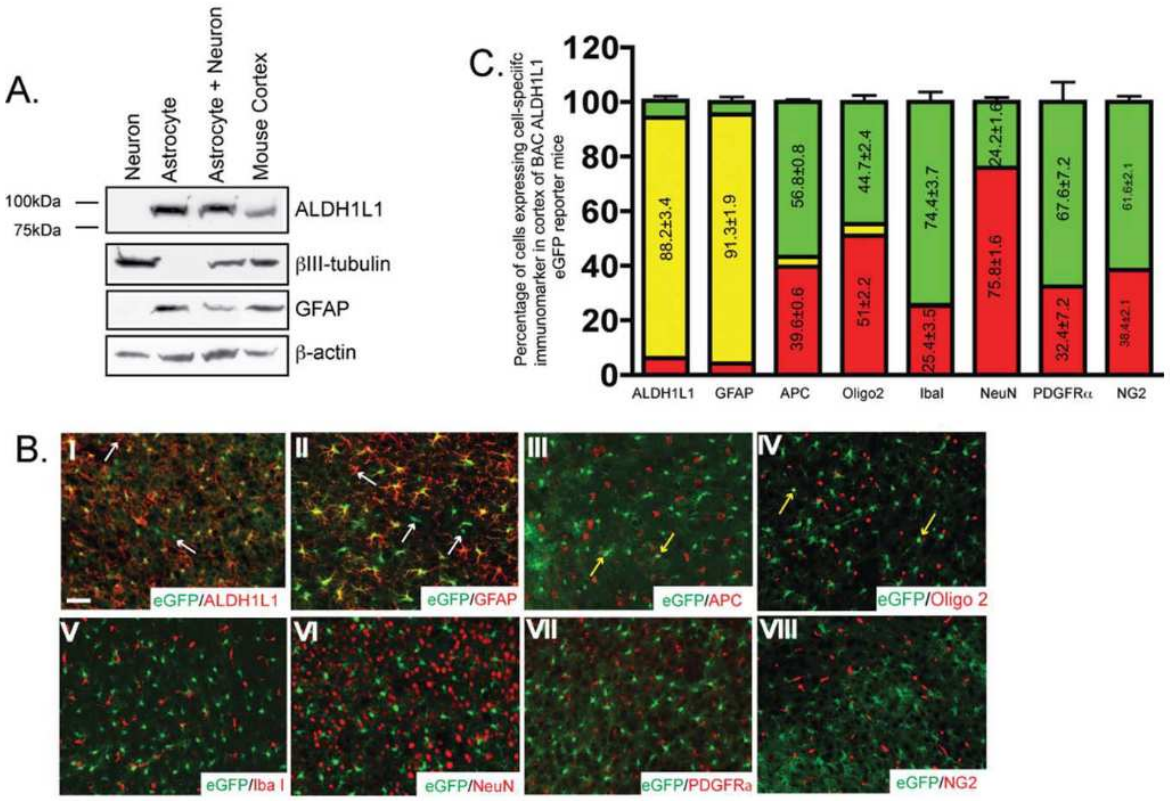


Figure 4 : Spécificité et redondance du marqueur Aldh1L1.
(A) Western blot illustrant l'expression sélective de l'aldh1l1 dans une culture primaire d'astrocytes (B) Image immunofluorescente de cortex (P25) illustrant la GFP endogène (Aldh1L1) colocalisée avec la GFAP mais très rarement avec les autres types cellulaires du SNC. (C) Quantification de l'expression de la aldh1l1 dans différents sous types cellulaires. Figure issue de Yang et al., 2011.

sans contamination neuronale détectable (Srinivasan et al., 2016). De plus, une autre étude utilisant l'immunofluorescence a démontré qu'une grande majorité des astrocytes exprimant l'Aldh1L1 exprimait également la GFAP, avec une absence totale dans la microglie (Iba1+) et les neurones (NeuN) (Figure 4) (Yang et al., 2011).

Il est important de noter que la quantité d'ARNm de l'Aldh1L1 diminue avec l'âge au sein de la moelle épinière. En effet, entre le jour postnatal numéro 2 et 135, une diminution de 50% est observée (Yang et al., 2011). Cela ajoute un degré de complexité dans le choix des marqueurs astrocytaires, car en plus de la région étudiée, il apparait également que l'âge est

un facteur à prendre en compte. Bien que l'Aldh1L1 soit présente dans un sous-type d'oligodendrocytes, cela se produit en très faible proportion (Yang et al., 2011).

3. Propriétés électrophysiologiques

Bien que les neurones soient le principal type de cellules excitables du SNC, les astrocytes ne sont pas des cellules "électriquement silencieuses", en raison de l'expression de canaux voltage-dépendants ou –indépendants et de transporteurs ioniques variés (Verkhratsky et Nedergaard., 2018). Les astrocytes ont des potentiels de membrane (Vm) hyperpolarisés (Du et al., 2016) qui se situent généralement en dessous de ceux des neurones (Bolton et al., 2006 ; Zhou et al., 2006). À la suite d'une incrémentation de courant, les astrocytes se caractérisent par une faible résistance et par une absence de potentiel d'action (PA) (Figure 5). Le Vm des astrocytes est proche de l'équilibre de Nernst pour les ions K^+ (E_K), reflétant ainsi la présence de conductances de repos élevées pour les ions K^+ (Somjen, 1979). Toutefois, les valeurs spécifiques du potentiel membranaire de repos (RMP) des astrocytes varient considérablement dans le SNC. A titre d'exemples, les astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe ont un RMP d'environ -80 mV (Tang et al., 2009 ; Deemyad et al., 2018) tandis que ceux du nerf optique ont un RMP d'environ -62 mV (Butt et Jennings, 1994). Au niveau spinal, nous avons montré que les astrocytes protoplasmiques de la corne ventrale présentent des valeurs hyperpolarisées de RMP (Barbay et al., 2023) comparable à celles du striatum pyramidal de l'hippocampe (RMP de -90 mV) ou des couches V et VI du cortex (Mishima et Hirase, 2010).

Il existe également une grande hétérogénéité des RMP astrocytaires au sein d'une même région ; les astrocytes de l'aire tegmentale ventrale varient entre -60 à -90 mV (Xin et al., 2019). De manière identique, au niveau spinal, les astrocytes de la corne dorsale ont des RMP plus dépolarisés (Kronschläger et al., 2021) que ceux de la corne ventrale.

Outre leur état RMP négatif, les astrocytes présentent généralement une résistance d'entrée membranaire nettement inférieure à celle des neurones dans des conditions basales (Zhou et al., 2006 ; Deemyad et al., 2018 ; Barbay et al., 2023 ; Xin et al., 2019 ; Tong et al., 2014), ce qui suggère une perméabilité globale aux ions relativement élevée au repos. Cependant ces différences de Vm entre les différentes structures sont à prendre avec un

certain recul car les valeurs mesurées dépendant fortement des conditions d'enregistrements comme la température et la concentration extracellulaire en ions K^+ ($[K^+]_e$).

Aussi, bien souvent, l'enregistrement électrophysiologique des astrocytes s'effectue au niveau somatique alors que beaucoup de canaux, comme les Kir4.1, sont exprimés au niveau des ramifications (Verkhratsky et Nedergaard, 2018). La difficulté à mesurer avec la technique de patch-clamp les flux d'ions dans les sites situés à distance des soma (Ma et al., 2014), en particulier dans les sites périsynaptiques ou périvasculaires, et au niveau des ramifications astrocytaires, encourage l'utilisation de techniques complémentaires telles que l'enregistrement de l'activité calcique. Cette dernière présente l'avantage de pouvoir distinguer l'activité Ca^{2+} transitoire entre les compartiments somatiques et les ramifications astrocytaires.

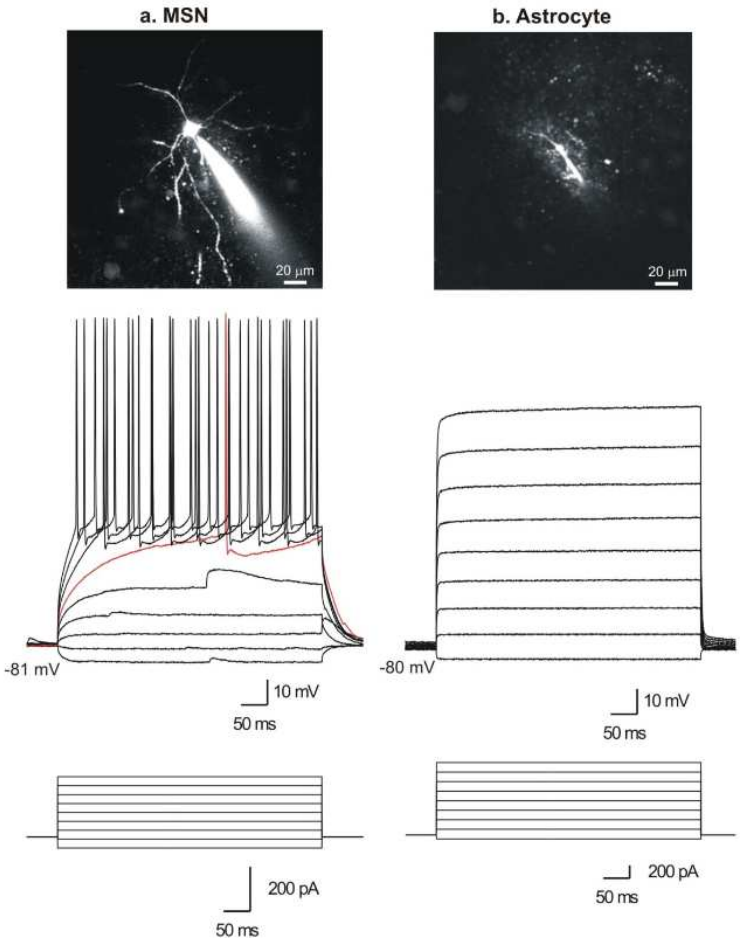


Figure 5 : Compararaison des caractéristiques électrophysiologiques des neurones et des astrocytes du striatum.
Sur la gauche un neurone dialysé avec un Alexa 488 montre des PAs suite à des injections de courant. A l'inverse, sur la droite, un asgrocyte, également dialysé avec un Alexa 488, montre une absence de potentiel d'action malgré de large courant d'injection. Issue de Tong et al., 2014.

D. Hétérogénéité astrocytaire

1. À la quête du vrai nombre d'astrocytes dans le cerveau : focus sur la densité astrocytaire

Le nombre réel d'astrocytes dans le cerveau est l'une des questions les plus débattues du domaine. Au fil des études, le paramètre « nombre d'astrocytes » a progressivement été remplacé par le « ratio astrocyte-neurone » (RAN). Ce RAN varie considérablement en fonction de l'espèce et de la région cérébrale.

En ce qui concerne la diversité inter-espèces, il a été remarqué que le RAN augmente proportionnellement avec l'augmentation de la taille du cerveau (Verkhratsky et al., 2017). Par exemple, au niveau du cortex, le RAN est de 0.3-0.4 chez le rongeur, 1.2 chez le cheval, 0.5-1.0 chez le singe rhésus, 1.5-1.7 chez l'humain et enfin 4 à 8 chez l'éléphant (Verkhratsky et al., 2017).

Pour ce qui est de la diversité inter-régions, des études chez le rongeur montrent également des différences dans le RAN. Trois régions, à savoir la partie ventrale de la moelle épinière, le mésencéphale et le cerveau postérieure (*hindbrain*), apparaissent être les régions avec le RAN le plus élevé avoisinant les 1.5 (Figure 6) (Endo et al., 2022). À l'inverse, les régions avec le RAN le plus faible se trouve au niveau du bulbe olfactif et du cervelet (Figure 6) (Endo et al., 2022). Contre toute attente, ces variations ne sont pas dues à la densité d'astrocytes mais à des différences de densité neuronale. Si l'on s'intéresse au nombre d'astrocyte brut, c'est le cervelet qui semble contenir le plus grand nombre d'astrocytes (Figure 6) (Endo et al., 2022).

De plus, au sein d'une même structure, il existe des variations de densité astrocytaire. Par exemple, chez la souris, au niveau de la moelle épinière, des différences sont observées au sein des laminas I, II et III de la région dorsale (Kronschläger et al., 2021). Dans cette étude, la densité astrocytaire a été mesurée à partir de 4 marqueurs astrocytaires différents : Aldh1L1, la GFAP, S100β et GS. Quel que soit le marqueur utilisé, une densité astrocytaire plus importante est retrouvée au sein de la lamina I, avec une densité plus faible en lamina III (Kronschläger et al., 2021).

Pour ajouter un degré de complexité, il apparait que le facteur âge-vieillissement joue également un rôle important dans ce ratio (Man et al., 2024).

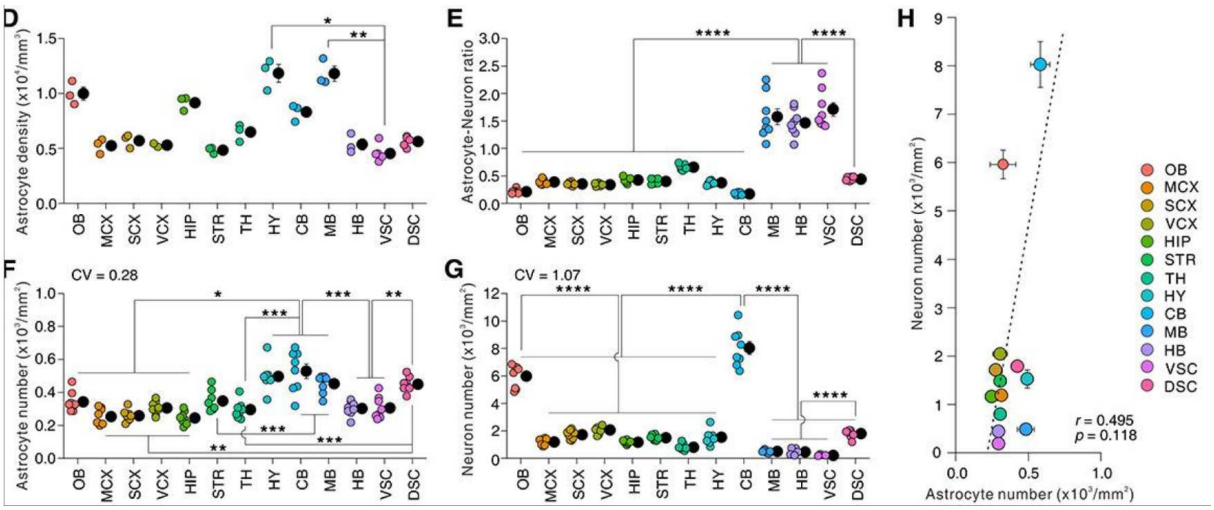


Figure 6 : Ratio neurone-astrocyte (RAN) dans différentes régions du SNC.

(D) Densité astrocytaire dans 13 régions du SNC (E) Ratio neurone-astrocyte (F) Nombre d'astrocyte (G) Nombre de neurone (H) Corrélation entre le nombre d'astrocyte et de neurone. OB : bulbe olfactif ; MCX : Cortex moteur ; SCX : cortex somatosensoriel ; VCX : cortex visuel ; HIP : hippocampe ; STR : striatum ; TH : thalamus ; HY : hypothalamus ; CB : cervelet ; MB ; mésencéphale ; HB : hindbrain : cerveau postérieure ; VCX : moelle épinière ventrale ; DSC : moelle épinière dorsale. Issue de Endo et al., 2022. A noter que la figure originelle a été rogné afin de clarifier les propos en fonction de la section.

2. Hétérogénéité morphologique

L'hétérogénéité morphologique des astrocytes est présente au niveau inter-espèces. En effet, il apparait que les astrocytes provenant des humains et des primates non-humains sont plus gros et plus complexes que ceux retrouvés chez les rongeurs (Figure 7) (Oberheim et al., 2006). En effet, les prolongements astrocytaires couvrent de plus grands volumes dans le cerveau humain et contactent ~10-20 fois plus de synapses que chez les rongeurs (Vasile et al., 2017 ; Oberheim et al., 2006). Le chevauchement des domaines astrocytaires, bien que faible, est également plus étendu chez l'humain.

Chez la souris, on retrouve deux grandes classes d'astrocytes : les protoplasmiques situés dans la substance grise et les fibreux dans la substance blanche. Les principales caractéristiques des astrocytes de la substance blanche sont l'aspect lisse et long des ramifications contactant des extrémités vasculaires. Certains des processus des astrocytes fibreux peuvent s'étendre dans la substance grise. A l'inverse, les astrocytes protoplasmiques présentent de nombreux processus courts et le plus souvent ramifiés dont le diamètre atteint ~50µm chez la souris et pouvant atteindre ~100µm chez l'homme (Vasile et al., 2017). En revanche, chez l'humain, on retrouve deux classes supplémentaires avec l'apparition de deux

types uniques d'astrocytes dans le cortex. Les astrocytes de projection interlaminaire et les astrocytes variqueux, potentiellement impliqués dans la communication à longue distance (Oberhaim et al., 2012).

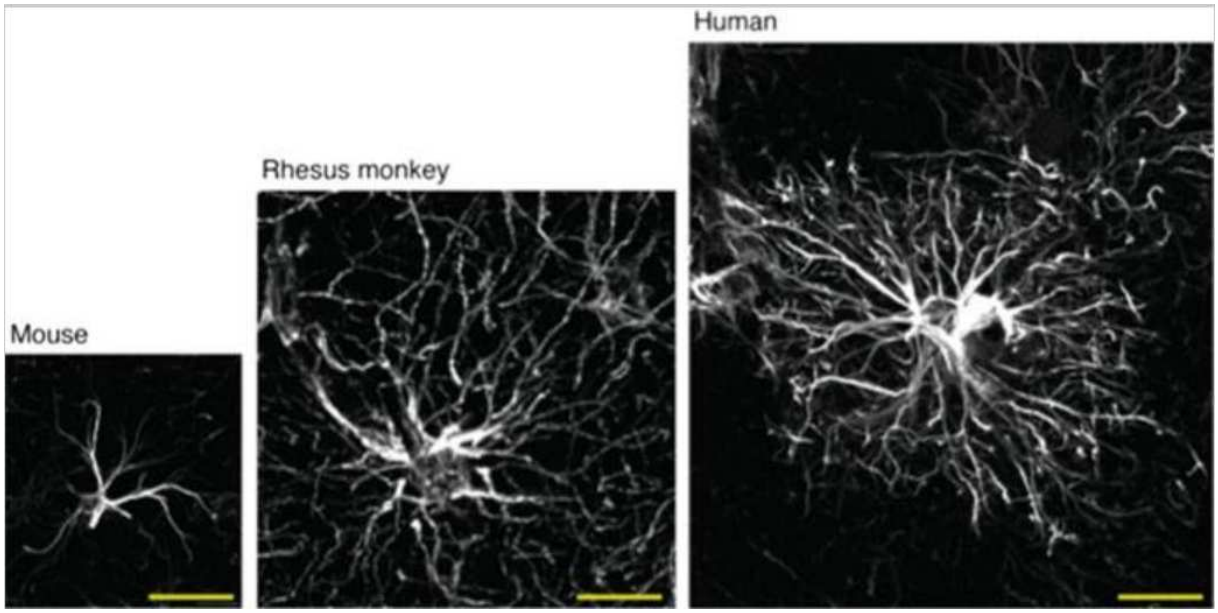


Figure 7 : Diversité morphologique inter-espèces des astrocytes.
Les astrocytes humains sont plus larges et complexes que ceux retrouvés chez le primate ou la souris. Les astrocytes sont révélés à l'aide du marquage de la GFAP en blanc. Echelle = 20 µm. Issue de Oberheim et al., 2012

Si une diversité morphologique inter-espèces est présente, des études chez la souris suggèrent également une diversité morphologique entre les différentes régions du SNC. Une première étude illustre une diversité morphologique des astrocytes entre ceux présents dans le striatum et de ceux présent dans l'hippocampe (Chai et al., 2017). Selon cette étude, les astrocytes du striatum couvrent un territoire plus vaste que ceux de l'hippocampe et sont éloignés des épines dendritiques des neurones (Chai et al., 2017). Une étude plus récente, réalisée par le même laboratoire, a comparé la morphologie des astrocytes au sein de 13 régions différentes du SNC (Endo et al., 2022). Divers paramètres morphologiques clés, tels que la taille du territoire, la taille du soma, la circularité et le nombre de prolongements primaires, ont été analysés (Endo et al., 2022). Cette étude comparative a ainsi révélé que les astrocytes ayant le plus grand territoire proviennent du cortex moteur, tandis que les plus petits territoires sont retrouvés dans la moelle épinière dorsale (Figure 8). En revanche, les astrocytes avec le plus grand nombre de prolongements primaires se trouvent dans l'hypothalamus alors que dans le cervelet, ils en possèdent le moins (Figure 8) (Endo et al., 2022).

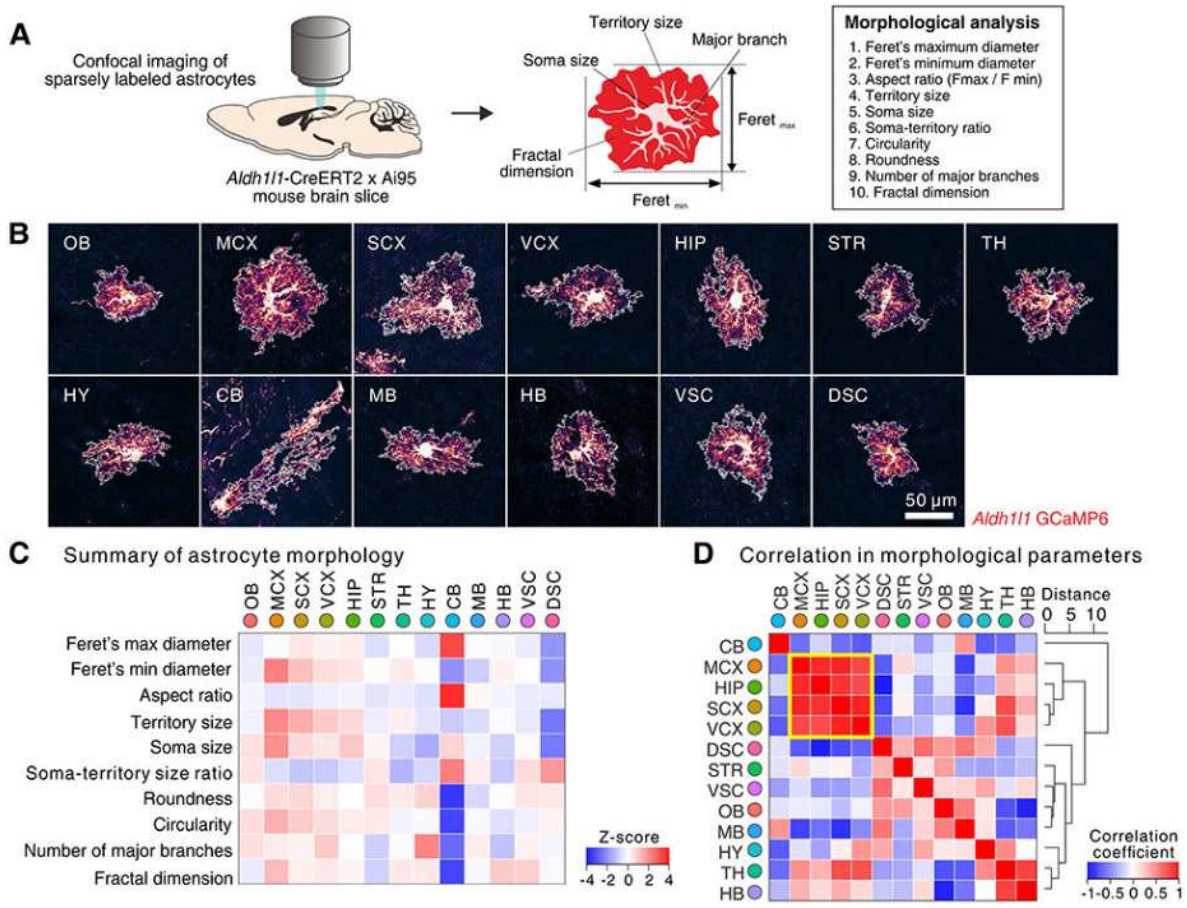


Figure 8 : Diversité morphologique inter-régional des astrocytes chez la souris.

(A) Procédure utilisé pour la morphologie des astrocytes avec l'ensemble des paramètres morphologiques utilisés (B) Images représentative illustrant la morphologie de astrocytes dans 13 régions du SNC. (C) Heat map illustrant le z-score des différents paramètres illustrant la morphologie dans 13 régions du SNC (D) Heat map illustrant le z-score moyen des astrocytes qui illustre l'hétérogénéité des astrocytes en fonction de la région étudiée. Issue de Endo et al., 2022.

De plus, il existe une complexité supplémentaire car les astrocytes d'une même et seule région, possèdent également des morphologies distinctes. Des travaux au sein de l'amygdale centrale, une région clé du conditionnement de la peur, ont révélé qu'un sous-type d'astrocytes exprimant l'ARN messager (ARNm) pour un récepteur au neuropeptide OT (OTR) sont plus complexes. En effet, ces astrocytes possèdent un volume, un domaine et un nombre de prolongements plus importants que ceux n'exprimant pas cet ARNm (Wahis et al., 2021).

Il apparait alors que la morphologie des astrocytes ne soit pas uniquement déterminée par l'espèce et la région cérébrale auxquels ils appartiennent, mais également par des marqueurs liés à des expressions de gènes spécifiques (Endo et al., 2022).

3. Hétérogénéité identitaire

L'étude mentionnée précédemment indique non seulement des différences morphologiques au sein d'une même région, mais identifie également un sous-type d'astrocytes exprimant spécifiquement l'ARNm de l'OTR (Wahis et al., 2021). Cette observation se retrouve également dans d'autres études où les astrocytes d'une même structure bien qu'ils partagent un grand nombre de marqueurs communs se distinguent aussi en exprimant ou non certains sous-types spécifiques (Endo et al., 2022). Par exemple, les astrocytes fibreux de la substance blanche n'expriment pas le transporteur au glutamate 1 (GLT-1), contrairement à ceux de la substance grise qui l'expriment fortement (Regan et al., 2007).

Une autre étude a montré la présence d'un sous type spécifique d'astrocytes exprimant la µ-crystallin (Crym) dans 46% des astrocytes S100β^{+}, en particulier au niveau du striatum (Ollivier et al., 2024). La délétion spécifique de la µ-crystallin dans les astrocytes du striatum induit des comportements répétitifs sans modifications morphologiques (Ollivier et al., 2024). Sur 4 314 gènes fortement exprimés par les astrocytes, seulement 20 % (soit 825 gènes) sont communs à plusieurs régions du SNC. En revanche, 22% sont uniques à certaines régions et 60% sont partiellement partagés entre différentes régions (Endo et al., 2022).

Ces données suggèrent fortement que, tout en maintenant des fonctions de base communes dans l'ensemble du SNC, comme la régulation de l'homéostasie potassique (K^{+}), la synthèse du cholestérol ou encore le métabolisme du glucose, les astrocytes accomplissent aussi des fonctions spécifiques qui sont régions-dépendantes. Cela indique également que des astrocytes d'une même région peuvent avoir des fonctions différentes.

4. Hétérogénéité fonctionnelle

Les astrocytes présentent une grande diversité de propriétés cellulaires, telles que le potentiel de membrane, la résistance membranaire et l'activité calcique spontanée et/ou évoquée. En comparant plusieurs études, on observe de grandes différences dans ces paramètres en fonction des régions étudiées. Par exemple, dans la moelle épinière, les astrocytes semblent plus hyperpolarisés et leur résistance est plus élevée en comparaison à

d'autres structures supraspinales (Barbay et al., 2023 ; Kronschläger et al., 2021 ; Tong et al., 2014).

En ce qui concerne la sensibilité au pH, une étude montre que les astrocytes des centres respiratoires se distinguent par une forte sensibilité au pH, en générant des variations de Ca^{2+} intracellulaire. En revanche, les astrocytes du cortex cérébral ne présentent pas cette sensibilité, aucune variation d'activité Ca^{2+} intracellulaire n'y étant observée (Gourine et al., 2010).

Une étude citée précédemment, visant à supprimer les OTR présents spécifiquement dans un sous-type d'astrocytes a permis de mettre en évidence leur rôle clé dans le conditionnement de la peur. En effet, à la suite de cette suppression, une perturbation de la transmission synaptique induit une diminution du niveau d'anxiété (Wahis et al., 2021).

L'ensemble de ces travaux montrent que la modulation d'un sous type d'astrocyte est parfois suffisante pour moduler un comportement précis. Cette hétérogénéité fonctionnelle des astrocytes au niveau cellulaire permettrait alors d'influencer également le réseau et donc le comportement (Lyon and Allen, 2022).

E. Les astrocytes : les gardiens de l'homéostasie ionique K^+

Dans cette section, nous allons détailler le maintien de l'homéostasie ionique K^+ par les astrocytes, qui constituent une fonction essentielle au sein du SNC. Bien entendu, les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses autres fonctions, telles que la modulation de l'activité synaptique, le maintien de la barrière hémato-encéphalique et le soutien métabolique (Figure 9). Par conséquent, le rôle des astrocytes ne se résume pas uniquement au maintien de l'homéostasie ionique. Cependant, afin d'être concis et cohérent avec les mécanismes étudiés dans ma thèse, nous nous concentrerons ici exclusivement sur le maintien de l'homéostasie K^+.

1. L'homéostasie K^+ systémique

Dans le corps humain, le maintien de l'homéostasie K^+ est impliqué dans différentes fonctions et processus cellulaires, tels que la régulation de l'excitabilité, la contraction musculaire, et la sécrétion d'hormones. Bien que souvent asymptomatique, l'hypokaliémie, caractérisée par de faibles taux de potassium sanguin (<3.5 mM), peut conduire à une

hyperpolarisation des cellules excitables, notamment celles du tissu nodal cardiaque et des muscles squelettiques (Kogika et de Morais, 2017 ; Oram et al., 2013). A l'inverse, l'hyperkaliémie (>5mM) pose des risques plus préoccupants (Montfort et Linas, 2017), car une hausse de la $[K^+]_e$ entraîne une activité excessive des cellules excitables, qui déchargent alors de manière soutenue.

Bien que notre alimentation soit la principale source de K^+, le contrôle de son homéostasie est essentiel pour contrôler cette excitabilité cellulaire. Les reins sont les principaux régulateurs de la concentration totale de K^+ dans le sang. L'expression des pompes Na/K-ATPase à l'interface sanguine des cellules du néphron permet de maintenir un flux K^+ vers les capillaires. Cette diffusion paracellulaire est également régulée par la fuite de K^+ vers la lumière des tubules via les canaux ROMK/Kir1.1 (Palmer, 2015). Cependant, ces ajustements rénaux prennent plusieurs heures.

Un problème majeur se pose : les neurones ne possèdent pas de contact direct avec le compartiment sanguin. Heureusement, les astrocytes servent de liaison entre les neurones et les capillaires sanguins (Benarroch, 2016b) et apparaissent donc comme de bons candidats pour maintenir l'homéostasie K^+ dans le SNC.

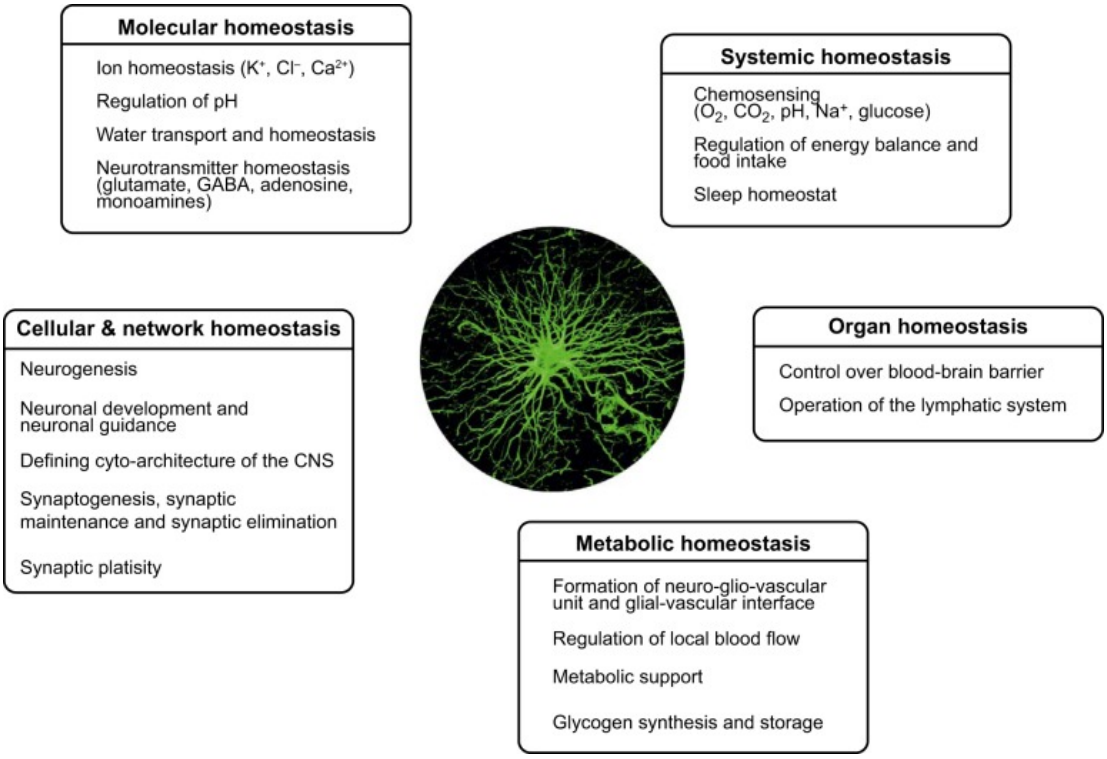


Figure 9 : Ensemble des fonctions assurées par les astrocytes au sein du SNC.
A plusieurs échelles, allant de la moléculaire, cellulaire à la systémique, les astrocytes œuvrent au maintien de l'homéostasie en assurant un grand nombre de fonction.

2. L'homéostasie K^+ du SNC : des variations contrôlées par le duo glial astrocyte - oligodendrocyte

• Maintien du K^+ dans le SNC

Au niveau du SNC, la concentration extracellulaire de K^+ ($[K^+]_e$) est maintenue autour de 3mM, bien que des variations locales puisse survenir lors des changements d'activité neuronale (Katzman, 1976 ; Somjen, 1979 ; Somjen, 2002 ; Sibille et al., 2015 ; Bataveljic et al., 2024 ; Larsen et al., 2016). En effet, certaines preuves montrent que les potentiels post-synaptiques sont une source majeure des faibles augmentations de K^+ extracellulaire (Aitken et Somjen, 1986 ; Ballanyi et al., 1993 ; Erulkar et Weight, 1977, Hackman et al., 1982). Par exemple, dans la moelle épinière de chat, une flexion/extension rythmique induit une hausse de 1.7 mM en K^+ extracellulaire (Heinemann et al., 1990). Des observations similaires sont observées après une stimulation électrique des voies afférentes. Dans ces conditions, l'activité neuronale intense induit une hausse de la $[K^+]_e$ de plusieurs mM, atteignant un plateau autour de 10-12 mM (Heinemann et Lux, 1977 ; Connors et al., 1982) dans diverses régions comme le cortex somatosensoriel (Heinemann et Lux, 1977), le nerf optique (Connors et al., 1982 ; Ransom et al., 1986) et le thalamus (Gutnick et al., 1979). De plus, après une stimulation prolongée, un phénomène appelé « undershoot » est fréquemment observé à l'arrêt des stimulations, où la $[K^+]_e$ redescend en dessous de son niveau de base initial. Ce phénomène est influencé par l'intensité, la durée et la fréquence de la stimulation (Heinemann et Lux, 1975 ; Kriv et al., 1975 ; Ransom et al., 2000). Il est proposé que les cellules gliales sont responsables du retour de la $[K^+]_e$ à son niveau de base, jouant ainsi un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie K^+.

La première preuve que l'implication des cellules gliales dans la recapture du K^+ extracellulaire provient d'expériences utilisant des radiotraceurs et des électrodes sensibles aux ions K^+. Ces expériences ont montré que la concentration intracellulaire de K^+ dans les cellules gliales augmente de façon concomitante avec une hausse de l'activité neuronale (Ballanyi et al., 1987 ; Coles et Tsacopoulos, 1979 ; Coles et al., 1986 ; Hertz, 1986 ; Schlue et Wuttke, 1983). De plus, cette hausse de K^+ dans les astrocytes était corrélée avec une diminution de la concentration de K^+ dans les neurones (Coles et Tsacopoulos, 1979 ; Coles et Orkland, 1983 ; Coles et al., 1986). Bien que ces observations soient prometteuses, les mécanismes exacts restent mal connus.

Le retour à la concentration de base de $[K^+]_e$ après l'activité neuronale repose sur deux hypothèses distinctes. La première considère les cellules gliales comme un réservoir de K^+, accumulant le potassium avant de le libérer dans l'espace extracellulaire, un processus appelé recapture de K^+ (Hertz, 1965). La seconde hypothèse propose que l'excès de K^+ est capturé par les cellules gliales et redistribué vers des zones de moindre concentration, via le syncytium glial, un processus connu sous le nom de tamponnage spatial (Figure 9) (Orkand et al., 1966).

Cependant, le rôle exact de ces deux mécanismes dans les différentes parties du SNC demeure incertain. Cette question fait l'objet de débats, et la recherche montre que les contributions respectives peuvent varier selon les espèces et les régions du SNC (Newman, 1995). Par exemple, dans le nerf optique du rat, le retour à la concentration de base de $[K+]_e$ semble davantage dépendre de la recapture K^+ que du tamponnage spatial, car le temps de retour à la concentration de base post-stimulus de $[K+]_e$ n'est pas affecté par les bloqueurs des canaux K^+ gliaux (Ransom et al., 2000). En revanche, dans la région CA3 de l'hippocampe du rat, les deux mécanismes sont essentiels pour le retour à la concentration de base post-stimulus de la $[K^+]_e$ (D'Ambrosio et al., 2002).

- Évidence fonctionnelle du tamponnage spatial astrocytaire dans le maintien de l'homéostasie K^+

Les premiers travaux suggérant le tamponnage spatial K^+ ont été menés par Orkland et al, en 1966. Ils ont observé que la stimulation du nerf optique d'amphibiens induisait une dépolarisation suivie d'une repolarisation lente dans les cellules gliales autour des axones non myélinisés. Cette repolarisation lente serait due au transfert de K^+ vers d'autres cellules gliales via le syncytium. De plus, les enregistrements des potentiels de champ extracellulaire ont montré que, dans le cas du tamponnage spatial du K^+, le transfert des ions K^+ du syncytium des zones à forte concentration en K^+ ($[K^+]_e$) vers les zones à faible concentration (Figure 10) génère des courants en boucle. Une fois le K^+ de retour dans l'espace extracellulaire, de nouveaux potentiels de champ extracellulaire apparaissent (Gardner-Medwin et al., 1981 ; Dietzel et al., 1989).

Les enregistrements de l'activité dépendante du K^+ extracellulaire dans le cervelet et le cortex ont montré que les variations en $[K+]_e$ sont cohérentes avec le transfert des ions K^+. Ces observations persistent même en présence de bloqueurs des pompes sodiques, indiquant que ce mécanisme est dû à la conductance passive du K^+, comme suggéré dans le cadre du

tamponnage spatial (Gardner-Medwin et Nicholson, 1983). La preuve la plus directe pour le tamponnage spatial provient de l'imagerie optique sur tranches (Holthoff et Witte, 2000). En effet, le transfert d'ions K^+ dans les cellules gliales devrait s'accompagner d'un rétrécissement de l'espace extracellulaire, dû à l'entrée d'eau dans les cellules, et d'une augmentation de cet espace au niveau des sorties de K^+ (Dietzel et al., 1980). Comme attendu, la stimulation d'une couche corticale induit un rétrécissement de l'espace extracellulaire suivi d'un grossissement au niveau des couches distantes du site de stimulation (Holthoff et Witte, 2000). Ce grossissement de l'espace extracellulaire est associé à une hausse local de la $[K^+]_e$ et dépend du couplage jonctionnel. Tous ces éléments soutiennent le concept de tamponnage spatial K^+ médié par le syncytium astrocytaire.

Par la suite, ces mécanismes ont été confirmés dans la rétine au niveau des cellules de Müller, un sous-type astrocytaire. Pour maintenir une $[K^+]_e$ physiologique, les astrocytes collaborent étroitement avec les oligodendrocytes, souvent négligés dans cette fonction.

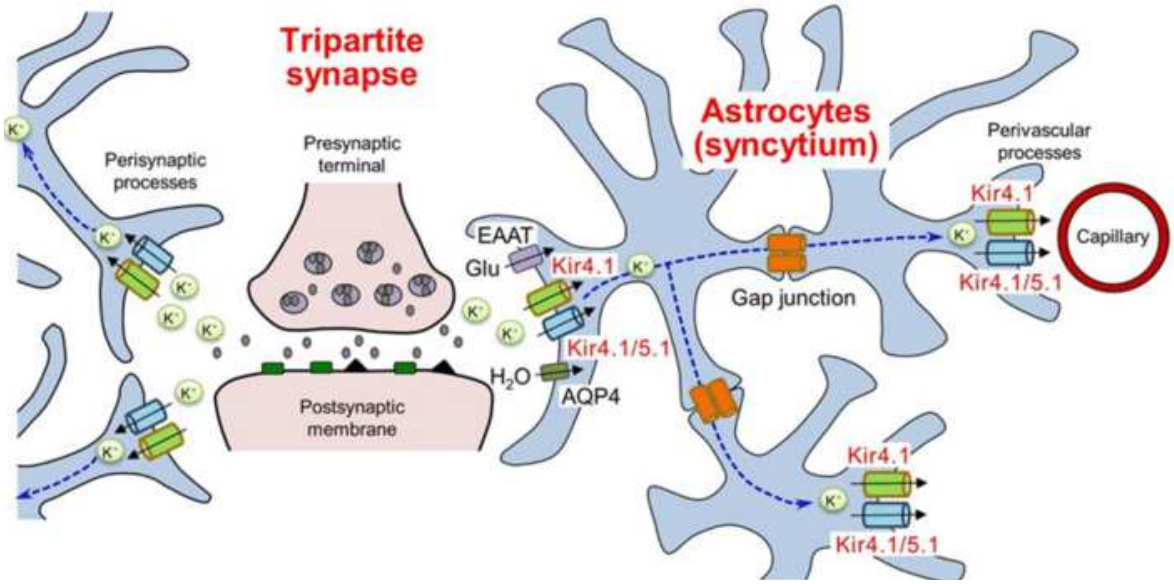


Figure 10 : Le tamponnage spatial par le syncytium astrocytaire.
Les astrocytes recapture l'excès de K^+ extracellulaire libéré par les neurones avant de le libérer au niveau de région moins concentré en K^+ par le biais du couplage jonctionnel jusqu'au vaisseaux sanguins au niveau des pieds astrocytaires. Issue de Kinboshi et al., 2020.

- Implication oligodendrocytaire dans le maintien du K^+ extracellulaire

Bien que la formation de la gaine de myéline soit l'une des fonctions les plus connues des oligodendrocytes, des études révèlent qu'ils seraient également impliqués dans l'homéostasie K^+. Les oligodendrocytes possèdent une forte concentration de canaux K^+ voltages dépendants Kv dans les zones juxtaparanodales (Poliak et Peles, 2003 ; Rasband, 2004), des canaux Kir2.1 (Stonehouse et al., 1999), ainsi que des canaux Kir4.1 (Kapell et al., 2023 ; Kelley et al., 2018 ; Schirmer et al., 2018 ; Looser et al., 2024). Cette machinerie protéique leur permet de détecter et de maintenir les niveaux de K^+ extracellulaire. En régulant l'homéostasie du K^+, les oligodendrocytes peuvent également exercer un effet protecteur au cours d'inflammations démyélinisantes grâce à l'interaction des canaux Kv7 neuronaux et les canaux Kir4.1 des oligodendrocytes (Kapell et al., 2023). De plus, les canaux Kir4.1 sont responsables d'un couplage métabolique avec les oligodendrocytes (Looser et al., 2024), ce qui aide à maintenir l'intégrité de l'axone (Schirmer et al., 2018).

3. Les acteurs protéiques du maintien de l'homéostasie K^+

Pour maintenir l'homéostasie K^+ au sein du SNC, plusieurs protéines jouent un rôle crucial :

- Les pompes ATPases Na^+/K^+

La pompe ATPase Na^+/K^+ est une enzyme transmembranaire qui utilise l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate comme source d'énergie afin de transporter les ions Na^+ et K^+ contre leur gradient électrochimique. Ce transport actif permet de récupérer 2 ions K^+ et de libérer dans le milieu extracellulaire 3 ions Na^+. Son fonctionnement dépend ainsi grandement des concentrations en $[Na^+]_i$, $[K^+]_e$ et $[ATP]_i$ ainsi que du potentiel de membrane de la cellule. Au niveau du SNC, ces pompes ATPases sont présentes au niveau astrocytaire mais également neuronal (Arnaiz, 2007 ; Cholet et al., 2002 ; Sweadner, 1989).

Au niveau structural, la pompe ATPase Na^+/K^+ est une protéine hétérodimérique composé d'une sous-unité α (3 isoformes) et d'une sous unité β (3 isoformes). Les sous unités sont α1 et α3 retrouvées au niveau neuronal alors que les astrocytes présentent les sous unités α1 et α2 (Larsen et al., 2016 ; Cholet et al., 2002 ; Sweadner, 1989).

Au niveau fonctionnel, il apparait que les pompes ATPases Na^+/K^+ au niveau neuronal sont beaucoup moins sensibles que celles exprimées au niveau astrocytaire (Rose et Ransom, 1997). En effet, suite à des augmentations en $[K^+]_e$ les pompes ATPases Na^+/K^+ présente une plus grande efficacité (Hajek et al., 1996) avec un seuil de saturation en $[K^+]_e$ beaucoup plus élevé (Reichenbach et al., 1992 ; Hajek et al., 1996).

La découverte de l'ouabaïne, un bloqueur de la pompe ATPase Na^+/K^+, a permis de confirmer l'impact fonctionnel de ces pompes sur la recapture du K^+ extracellulaire. L'application d'ouabaïne sur des tranches de cortex diminue l'accumulation du K^+ intracellulaire dans les astrocytes suite à des stimulations électriques (Ballanyi et al., 1987). De même, au niveau du nerf optique et de l'hippocampe, l'ouabaïne a induit un ralentissement de la recapture K^+ (Ransom et al., 2000 ; D'Ambrosio et al., 2002). De plus, il s'avère que le phénomène d'« *undershoot* » disparait en présence d'ouabaïne, confirmant le rôle de ces pompes (Forstl et al., 1982 ; Galvan et al., 1979 ; D'Ambrosio et al., 2002).

- Les co-transporteurs $Na^+/K^+/2Cl^-$

La régulation de la $[K^+]_e$ pourrait également impliquer les co-transporteurs $Na^+/K^+/2Cl^-$. Ce transporteur fait entrer un ion Na^+ et K^+ pour $2Cl^-$ dans la cellule, le rendant électroneutre. En faisant entrer du K^+ à l'intérieur de la cellule, il apparait comme un candidat idéal dans la régulation K^+.

Ce co-transporteur possède deux isoformes : le NKCC1, présents dans les neurones (Yamada et al., 2004 ; Achilles et al., 2007 ; Spila et et al., 2009 ; Blanquie et al., 2017) la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes (Nurki et al., 2023) ; et le NKCC2, majoritairement exprimé dans les reins (Castrop, 2007).

Des expériences utilisant des cultures primaires d'astrocytes ont montré que l'accumulation de K^+ dans les cellules est réduite en présence de bumétanide, un bloqueur de NKCC1 (Rose et Ransom, 1996 ; Su et al., 2000). Le retrait de Na^+ et de Cl^- du millieu extracellulaire, nécessaires à l'entrée de K^+ par NKCC1, produit le même effet (Hertz et al., 1990). D'autres expériences sur le nerf optique de rat ont observé un gonflement réduit des astrocytes en réponse à des augmentations de $[K^+]_e$ après application de bumetanide (MacVicar et al., 2002). Cependant, une étude de la même année sur l'hippocampe n'a montré aucun effet de la furosemide, un autre bloqueur de NKCC1, sur la concentration extracellulaire

de K^+ (Hauch et al., 2002). Une étude plus récente a également démontré l'absence d'implication de NKCC1 dans la recapture K^+ (Larsen et al., 2014).

De ce fait, l'implication de NKCC1 reste débattue, mais une étude suggère que son activité dans la recapture du K^+ dépend fortement de l'activité des pompes ATPase Na^+/K^+ (Rose et Ransom, 1996).

- Les canaux potassiques à rectification entrante (Kir)

Les canaux Kir sont des canaux K^+ à rectification entrante présents dans les oligodendrocytes et les astrocytes. Plusieurs études indiquent que les canaux Kir constituent la principale conductance K^+ des astrocytes, des oligodendrocytes, ainsi que des cellules de Müller et de Bergmann (Newman, 1993 ; Ransom et Sontheimer, 1995).

Au niveau morphologique, les canaux Kir sont des protéines membranaires tétramériques formant un pore et pouvant être composés de sous-unités Kir identiques (homéomères) ou différentes (hétéromères). Les canaux Kir sont classés en 7 sous-familles, de Kir1 à Kir7, selon leurs mécanismes de régulations (Doupnik et al., 1995 ; Kubo et al., 2005 ; Nichols et Lopatin, 1997). A titre d'exemple, les Kir6.0 sont sensibles aux concentrations d'ATP, Kir3.0 peut être activés par des protéines G et Kir1.0, Kir4.1/Kir5.1 sont sensibles au pH (Kubo et al., 2005 ; Tucker et al., 2000 ; Tanemoto et al., 2000 ; Pessia et al., 2001).

L'implication de ces canaux dans le tamponnage spatial a été mise en évidence grâce au barium (Ba^{2+}), un bloqueur des Kir. En effet, le blocage des Kir par le Ba^{2+} induit une accumulation de potassium extracellulaire dans la rétine et atténue fortement la dispersion du K^+ au sein des cellules du Müller (Newman, 1986b ; Karwoski et al., 1989). Une autre étude montre qu'après une stimulation du bulbe olfactif, la présence de Ba^{2+} affecte l'augmentation du K^+ intracellulaire (Ballanyi et al., 1987).

Cependant, certaines études ne corroborent pas ces résultats, car l'application de Ba^{2+} ne semble pas toujours impacter la recapture du K^+ (Meeks et Mennerick, 2007 ; Xiong et Stringer, 2000). Il apparait que, selon la région et l'âge, la recapture du K^+ est médiée à des degrés différents par les Kir et la pompe ATPase Na^+/K^+.

Parmi cette grande famille, la sous-unité Kir4.1 semble jouer un rôle majeur dans ce mécanisme.

4. Les canaux Kir4.1

• Structure et localisation

Le canal Kir4.1 est une sous-unité de la famille des Kir, qui fut la première à être identifiée au sein du SNC (Takumi et al., 1995). Il est présent au niveau des astrocytes, des oligodendrocytes, des cellules de Bergmann et de Müller (Kofuji et al., 2002 ; Olsen et al., 2006 ; Poopalasundaram et al., 2000 ; Kelley et al., 2018). Le canal Kir4.1 est codé par le gène *kcnj10,* qui permet l'expression d'un tétramère qui est composé de sous-unités Kir4.1 (homéomères) ou d'un assemblage de sous-unités Kir5.1 et Kir4.1 (hétérodimères). Ils sont exprimés de manière différentielle dans le SNC et sont majoritairement retrouvés au niveau des prolongements astrocytaires (Verkratsky and Nedergaard, 2018). Les hétérodimères et les homéomères présentent des propriétés électrophysiologiques différentes : les hétéromères par exemple, sont plus sensibles aux variations de pH intracellulaire que les homéomères (Kubo et al., 2005 ; Tucker et al., 2000 ; Tanemoto et al., 2000 ; Pessia et al., 2001).

• Implication des Kir4.1 dans les propriétés biophysiques des astrocytes

Au niveau fonctionnel, les Kir4.1 confèrent la grande majorité des caractéristiques biophysiques des astrocytes. En effet, les canaux Kir4.1 sont responsables de leur conductance K^+ élevée au repos, de leur potentiel membranaire hyperpolarisé ainsi que de leur faible résistance (Kuffler, 1967 ; Walz et MacVicar, 1988). Des travaux utilisant des approches pharmacologiques et génétiques ont mis en lumière Kir4.1 comme étant le canal majoritairement impliqué dans le potentiel de membrane, la résistance et la conductance astrocytaire au repos.

Une première série d'expérience a utilisé le Ba^{2+}, un bloqueur non spécifique des canaux K^+, mais à une concentration de 100 µM, il offre une certaine spécificité aux canaux Kir (Jansen et al., 2005). L'application du Ba^{2+} dans le bain d'enregistrement au cours d'un enregistrement électrophysiologique permet d'isoler la conductance des canaux Kir4.1 (Figure 11). L'application du Ba^{2+} a permis d'induire une forte dépolarisation ($\simeq$ 20mV) et une augmentation par un facteur 10 de la résistance astrocytaire dans la moelle épinière (Olsen et

al., 2006) ainsi que dans l'hippocampe (Djukic et al., 2007). Ces observations pharmacologiques ont été confirmées en utilisant des outils génétiques pour diminuer (ARN interférent) ou abolir (*knock out*) l'expression des Kir4.1 dans les cellules de Müller, l'hippocampe et la moelle épinière (Djukic et al., 2007 ; Kucheryavykh et al., 2007 ; Kofuji et al., 2000). Des études utilisant le double patch clamp indiquent que les canaux Kir4.1 sont responsables de 50% de la conductance totale des astrocytes (Ma et al., 2014), ce qui est corroboré dans l'hippocampe (Seifert et al., 2009). A noter le dévelopement récent d'un nouveau bloqueur plus spécifique des canaux Kir4.1, le VU0134992 (McClenahan et al., 2022).

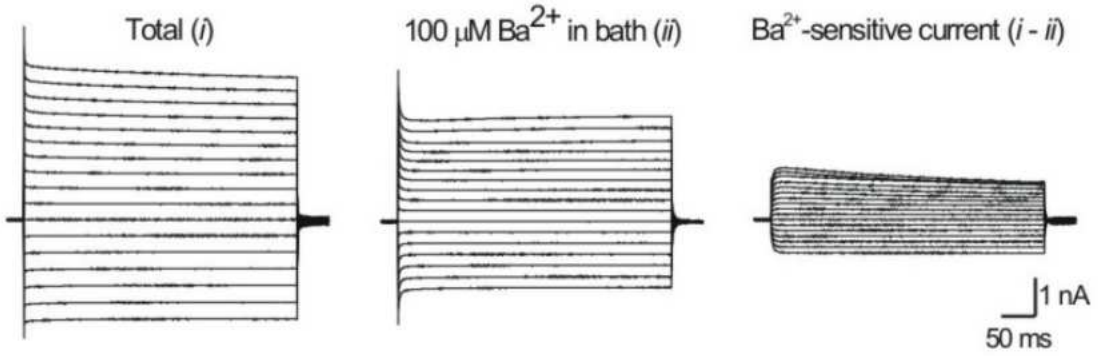


Figure 11 : Procédure pharmacologique pour isoler la conductance Kir4.1.
Une première étape consiste à appliquer des incrémentations de voltage (-140 mV à + 50 mV) afin d'obtenir le courant dit macroscopique (i) (gauche). Une fois l'enregistrement stable, 100 µM de Ba^{2+} est appliquée dans le bain d'enregistrement. Une fois que l'application de Ba^{2+} a fait effet (e.g. > 8 min), les mêmes incrémentations de voltage sont à nouveau appliquées (ii) (milieu). On peut observer que le courant macroscopique a alors diminuer en amplitude du fait du blocage des canaux Kir4.1 (ii). Afin d'isoler la conductance Kir4.1, l'enregistrement en (ii) est alors soustrait de l'enregistrement (i) afin d'obtenir le courant sensible au Ba^{2+} (droite). Issue de Tong et al., 2014.

Récemment, une publication réalisée dans le cadre de ma thèse a confirmé ces observations au niveau de la moelle épinière lombaire, où un *short harpin RNA* dirigé contre les canaux Kir4.1 induit une dépolarisation, une réduction de la conductance ainsi qu'une augmentation de la résistance astrocytaire (Barbay et al., 2023). Les astrocytes étant des cellules clés dans la recapture K^+ et les canaux Kir4.1 jouant un rôle crucial dans ce processus, des études se sont intéressées à l'impact de ce canal dans la recapture du K^+.

- Implication des Kir4.1 dans le tamponnage spatial

Tout d'abord, il est important de noter que spatialement, les canaux Kir4.1 sont fortement exprimés dans les prolongements astrocytaires en contact avec les vaisseaux

sanguins et les synapses (Higashi et al., 2001). De même, au niveau de la moelle épinière, les motoneurones sont fortement entourés par ces canaux (Kelley et al., 2018). Cela suggère que les canaux Kir4.1 sont situés à des endroits clés où l'homéostasie K^+ doit être finement régulée.

Une première étude utilisant des électrodes sensibles au K^+ à la suite de stimulations électriques au niveau du nerf optique n'a révélé aucun changement dans le retour à la concentration initiale de $[K^+]_e$, sauf une légère augmentation du pic de $[K^+]_e$, suite au blocage des canaux Kir4.1 (Ransom et al., 2000). Cette étude a conclu que les canaux Kir4.1 sont davantage impliqués dans la répartition du K^+ dans le milieu extracellulaire. Dans cette optique, une autre étude a montré que le blocage des canaux Kir4.1 résulte en une élévation de la $[K^+]_e$ ainsi qu'en une augmentation de l'amplitude de l'*undershoot* après stimulation des collatérales de Schaffer, sans affecter la vitesse du retour à la ligne de base (D'Ambrosio et al., 2002). Une autre étude dans l'hippocampe, a démontré que l'application de Ba^{2+} conduit à une accumulation K^+ plus ample pendant l'activité neuronale (Larsen et al., 2014). Ces études pharmacologiques, suggèrent que les Kir4.1 seraient davantage impliqués dans la dispersion du K^+ lors d'une forte activité neuronale pour éviter une hausse transitoire excessive de K^+ dans l'espace extracellulaire. En revanche, la recapture du K^+ à des valeurs basales, serait principalement médiée par les pompes ATPase Na^+/K^+.

Des approches génétiques ont également été utilisées pour éclaircir le rôle des canaux Kir4.1 dans la recapture du K^+. Des études ont montré qu'après stimulation, les animaux *knock out* (KO) pour Kir4.1, ont un temps de retour au taux basaux en K^+ plus long que les animaux *wild type* au niveau du tronc cérébral (Neusch et al., 2006) et de l'hippocampe (Djukic et al., 2007 ; Haj-Yasein et al., 2011). Enfin, une étude *in vivo* chez la souris a montré, à différentes intensités de stimulation, un temps de recapture prolongé chez les animaux dépourvus de Kir4.1 (Chever et al., 2010). L'ensemble de ces données souligne le rôle clé des canaux Kir4.1 dans la recapture K^+.

- Modulation fonctionnelle des canaux Kir4.1

L'efficacité des canaux Kir4.1, autrement dit leur capacité à capturer le K^+ extracellulaire, dépend bien évidemment des concentrations en K^+ de part et d'autre de la membrane cellulaire, mais aussi d'un certain nombre de facteurs endogènes.

Des premiers travaux sur des cellules d'ovocytes de *xenopus laevis,* transfectées pour exprimer soit les canaux Kir4.1 soit leur homologue Kir4.1-5.1 montrent qu'une réduction de

la concentration en [Na^+] réduit l'amplitude des deux conductances (Søe et al., 2009). Une autre étude, également réalisée sur des ovocytes de *xenopus laevis,* démontre que la sérotonine (5-HT), la substance P (SP) et la thyrotropin (TRH) influencent la conductance de l'hétéromère Kir4.1-Kir5.1 (Rojas et al., 2008). L'utilisation de bloqueurs de la recapture sérotoninergique confirment ces résultats en montrant aussi une inhibition de la conductance Kir4.1 (Ohno et al., 2007).

Les canaux Kir4.1-Kir5.1 possèdent des sites de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC). Des expériences ont ainsi exploré le potentiel rôle de la PKC sur la conductance du tandem Kir4.1-Kir5.1. Il s'avère qu'après phosphorylation par la PKC, la conductance du duo Kir4.1-Kir5.1 diminue fortement, alors que celle de Kir4.1 seule, est moins affectée (Rojas et al., 2008).

Enfin, une étude intéressante suggère que la conductance Kir4.1 est modulée par le pH intracellulaire $(pH)_i$. Les résultats ont montré qu'une diminution du $(pH)_i$ entraîne une réduction de la conductance Kir4.1 (Xu et al. 2000). Cet effet est exacerbé chez les ovocytes exprimant Kir4.1 et Kir5.1. (Xu et al., 2000). La sensibilité au pH de ces canaux réside dans un groupement lysine en position 67 (Xu et al., 2000). Cette sensibilité au pH des canaux Kir4.1/Kir4.1-Kir5.1 a également été rapportée dans d'autres études (Yang et al., 2000 ; Cleary et al., 2023 ; Pessia et al., 2001).

Il est désormais établi que les astrocytes, via les canaux Kir4.1, jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie K^+. Cependant, il est pertinent de se questionner sur l'influence réelle des astrocytes sur leurs partenaires neuronaux au sein du réseau conjoint.

F. Interaction neurone-astrocyte

Au sein du grand domaine des neurosciences, les neurones constituent la grande majorité des recherches effectuées dans les laboratoires de recherche. De nombreuses études focalisés sur les astrocytes leur ont permis de se révéler comme étant un acteur majeur dans le fonctionnement du SNC. En effet le nombre de publications étudiant les astrocytes augmentent chaque année de façon considérable (Figure 12).

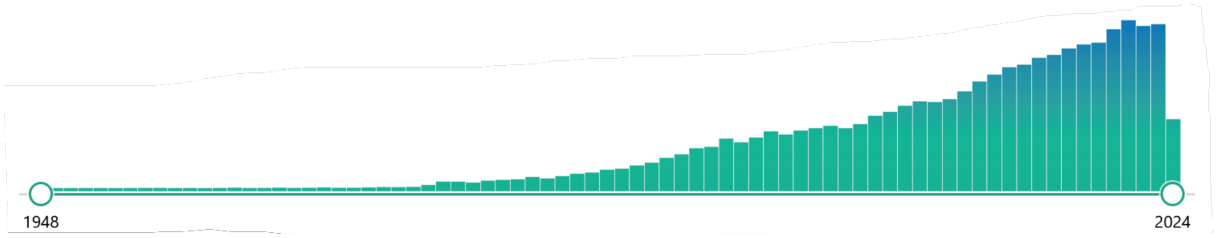


Figure 12 : Nombre de publications dans la base de donnée PubMed contenant le mot clé « astrocytes » entre les années 1948 et 2024.
Cette représentation illustre le nombre croissant de données émergeant sur les astrocytes.

Ces travaux montrent que les astrocytes modulent l'activité des neurones tant d'un point de vue électrique que métabolique. Ces observations ont permis de donner lieu à une nouvelle thématique de recherche : l'interaction neurone-astrocyte.

1. Organisation morpho-anatomique de la synapse tripartite

La transmission d'information entre neurones se produit au niveau d'une structure spécialisée : la synapse. Les astrocytes, avec leurs nombreux prolongements, contactent et enrobent les synapses (Figure 13), détectant et répondant aux neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique pour générer une communication bidirectionnelle (Perea et al., 2009 : Halassa et Haydon, 2010 ; Tasker et al., 2012). Cependant, il apparait que les astrocytes ne contactent pas l'ensemble des synapses du SNC, cette organisation anatomique variant selon la région étudiée. Une première étude montre que dans l'hippocampe, seulement 40% des synapses seraient modulées fonctionnellement par les astrocytes (Perea et Araque, 2007) ce qui est confirmé par de l'imagerie au sein de cette même région (Ventura et Harris, 1999). En revanche, au niveau du cortex visuel, seulement 30% des astrocytes semblent- être en contact synaptique (Grosche et al., 1999). Une première hypothèse suggère que les astrocytes pourraient être en contact uniquement avec les synapses actives, par opposition aux synapses silencieuses (Ventura et Harris, 1999). Afin d'être un partenaire actif au sein de cette synapse tri-partite, les astrocytes doivent détecter l'activité neuronale.

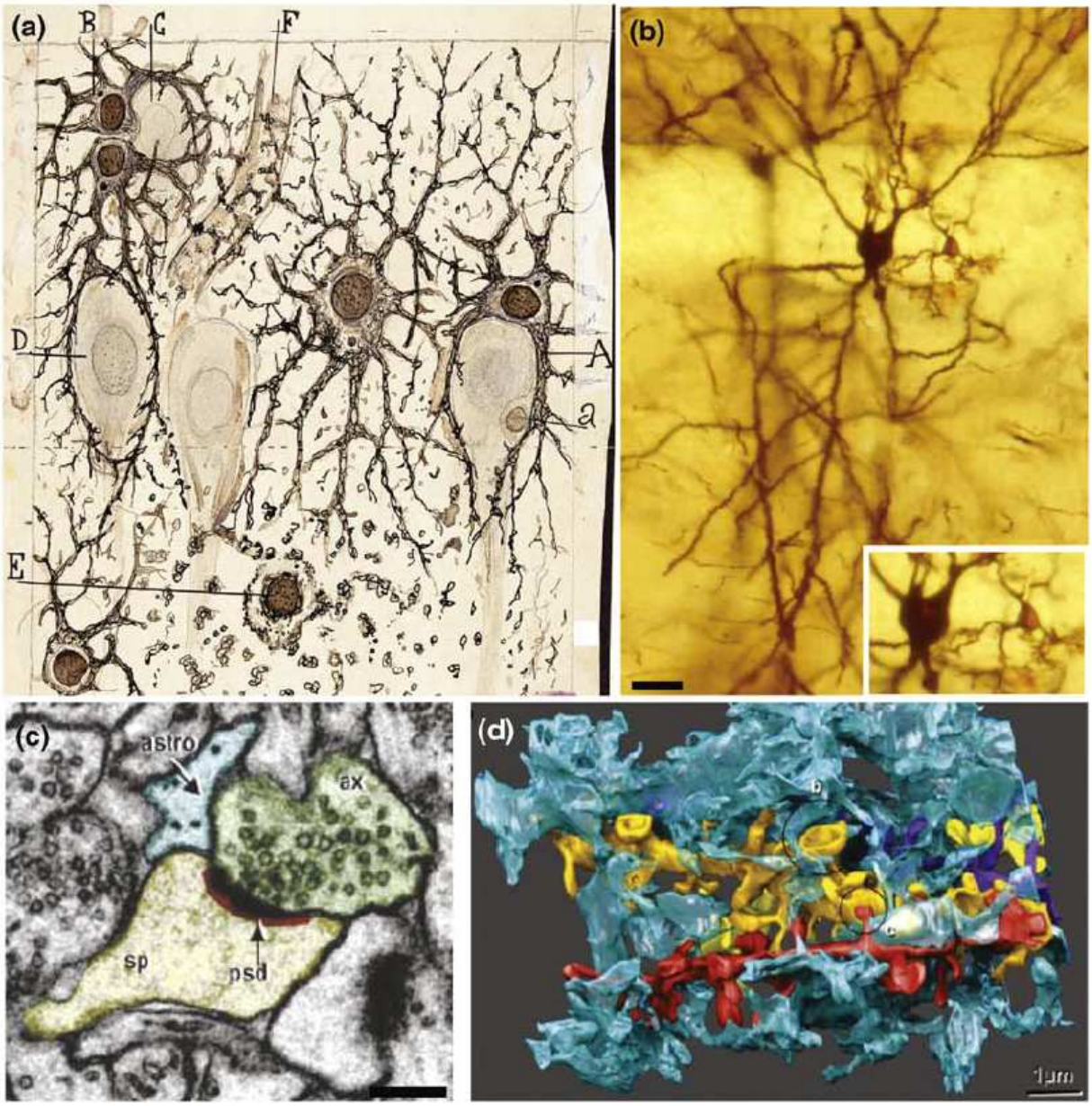


Figure 13 : Différente représentation illustrant l'intéraction morphologique neurone-astrocyte au niveau de la synapse tri-partite

(A) Dessin de Cajal illustrant une « neuroglie » au niveau des couches pyramidales d'un homme adulte. (B) Neurone et astrocyte marqué avec le la méthode Golgi provenant d'un hippocampe de rat (C) Image de microscopie électronique d'un prolongement astrocytaire au niveau des épines dendritiques d'un axone. (D) Reconstruction 3D d'un astrocyte (bleu) entremêlés à 4 dendrites distinctes (jaune, rouge, or et violet). Issue de Perea et al., 2009

2. Intégration des signaux et excitabilité astrocytaire calcique

• Détection de l'activité neuronale

Une étude princeps a révélé que les cellules gliales peuvent être activées par les neurotransmetteurs (Cornell-Bell et al., 1990). Il apparait que les astrocytes sont équipés afin de détecter un large panel de molécules présentes dans leur environnement. En effet, ils possèdent une multitude de récepteurs, leur permettant de détecter les neurotransmetteurs libérés au cours de la transmission synaptique entre neurones (Araque et al., 1999). Les astrocytes possèdent une grande diversité de récepteurs, tels que les récepteurs purinergiques de type P2Y et P2X, les récepteurs GABAergiques de types $GABA_A$ et $GABA_B$, les récepteurs au cannabinoïdes CB_1 (Carlsen et al., 2022 ; Bazargani et Attwell, 2016 ; Navarrete et Araque, 2008), les récepteurs glutamatergiques $mGluR_5$ (Panatier et Robitaille, 2016 ; Broadhead and Miles, 2020), $mGluR_2$, $mGluR_3$ (Haustein et al., 2014), ainsi que les récepteurs sérotoninergiques (Gonzalez-Arias et al., 2023) dopaminergiques et noradrénergiques (Orts-Del'Immagine et al., 2021; Montalant et al., 2024). Cet arsenal protéique permet aux astrocytes de détecter une activité neuronale intense impliquant de nombreuses synapses (Serrano et al., 2006 ; Henneberger et al., 2010), ainsi que des activités synaptiques très faibles au niveau local (Panatier et al., 2011). De plus, les astrocytes peuvent discriminer différents patterns d'activité en fonction de la fréquence et de l'intensité de l'activité synaptique (Panatier et al., 2011 ; Perea et Araque, 2005). Une fois ces signaux détectés, les astrocytes peuvent les intégrer.

• Intégration des signaux: la complexité du signal calcique astrocytaire

Bien que les astrocytes soient incapables de générer des potentiels d'action, ils ne sont pas pour autant silencieux et possèdent une forme d'excitabilité basée sur les variations de Ca^{2+} intracellulaire. Suite à l'activation de différents récepteurs, les astrocytes traduisent ces signaux en variations de Ca^{2+} intracellulaire (Semyanov et al., 2020). Cependant, la compréhension de ces variations de Ca^{2+} intracellulaire est très complexe, puisque celles-ci reposent sur une multitude de mécanismes différents.

D'une part, les augmentations de Ca^{2+} intracellulaire proviennent de multiples sources, notamment des récepteurs, des canaux, des échangeurs et des pompes présents sur la membrane plasmique ainsi que dans les organites intracellulaires tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les organites acides (Figure 14) (Shigetomi, 2016).

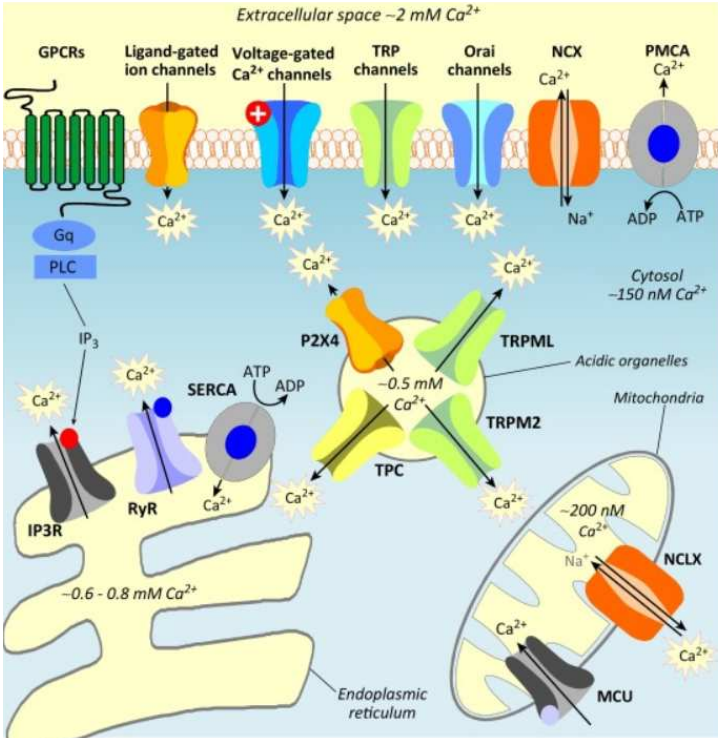


Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes sources de Ca^{2+} intracellulaires des astrocytes.
Les variations du Ca^{2+} cytosolique sont régulées de manière dynamique par l'interaction entre les canaux, les pompes et les transporteurs de Ca^{2+}. Il existe différents canaux Ca^{2+} qui sont exprimés à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane des organites. Issue de Shigetomi et al., 2016.

De plus, selon le compartiment astrocytaire étudié (soma, prolongement ou microdomaines), la dynamique des signaux varie énormément, même au sein d'un même astrocyte. En effet, l'activité au sein des microdomaines calciques des astrocytes apparaît de manière beaucoup plus fréquente et rapide dans les prolongements astrocytaires que dans le soma (Kanemaru et al., 2014). Ces observations ont également été rapportées dans des astrocytes d'hippocampe adulte, où les ramifications des astrocytes révèlent une activité locale intense. De plus, cette activité est dissociée de celle du corps cellulaire (soma), étant beaucoup plus fréquente et se produisant de manière asynchrone dans divers processus, comme s'ils étaient fonctionnellement indépendants.

En termes de cinétique, les variations de $[Ca^{2+}]_i$ observées dans les corps cellulaires astrocytaires sont nettement plus lentes et moins fréquentes que les activités transitoires dans les ramifications (Figure 15).

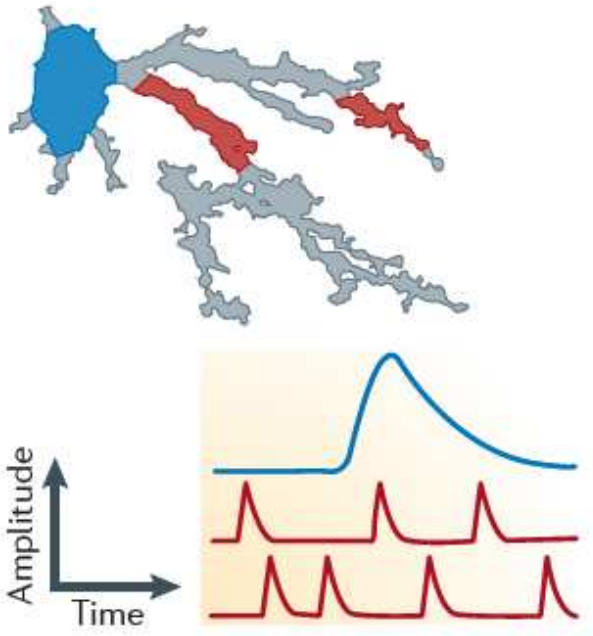


Figure 15 : Illustration de la dynamique spatio-temporelle des signaux calciques au niveau du doma et de leur prolongements.
Le soma des astrocytes présente des activités calciques spontanées plus amples, moins fréquentes et d'une durée plus longue que celles observées au niveau de leurs prolongements. Issue de Bayraktar., et al., 2014

Ces variations de Ca^{2+} pourraient donc se produire qu'à partir d'un certain seuil d'activation cellulaire et déclencher des processus biologiques qui ne sont pas activés par les activités Ca^{2+} transitoires confinées aux ramifications. Par exemple, des réponses Ca^{2+} lentes et amples au niveau somatique ont été associées à des signaux dépendant du niveau d'oxygène dans le sang (BOLD), ce qui suggère qu'elles contribuent à des réponses vasculaires persistantes (Schulz et al., 2012).

Les propriétés pharmacologiques des événements focalisés dans les ramifications astrocytaires suggèrent que ces événements sont indépendants des décharges neuronales mais pourraient provenir de la libération spontanée de neurotransmetteurs au niveau des synapses voisines (Di Castro et al., 2011). Leur rôle fonctionnel n'est pas encore élucidé, mais on peut supposer qu'ils agissent de concert avec les événements synaptiques miniatures pour stabiliser les connexions " tripartites " et/ou coordonner les adaptations plastiques de ces connexions (Di Castro et al., 2011 ; Clarke et Barres, 2013).

Des études révèlent en parallèle, dans les prolongements, que ces variations Ca^{2+} pourraient dépendre de la libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie, ou encore du Ca^{2+} extracellulaire via des canaux ioniques (Bazargani & Attwell, 2016). Au niveau du soma, elles dépendent majoritairement de la libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires (Bazargani & Attwell, 2016).

3. La gliotransmission

Suite à l'intégration des signaux Ca^{2+}, les astrocytes peuvent libérer des gliotransmetteurs qui modulent l'activité synaptique en se fixant sur les éléments pré- ou post-synaptiques des neurones. De nombreuses études ont démontré que les astrocytes peuvent libérer une grande diversité de gliotransmetteurs, tels que le glutamate, l'ATP/Adénosine, la D-Sérine, et le GABA, dans un grand nombre de structures cérébrales (Araque et al., 1998a ; Liu et al., 2004 ; Bezzi et al., 1998 ; Perea et Araque, 2005 ; Navarrete et Araque, 2010 ; Panatier et al., 2011 ; Pascual et al., 2005 ; Gourine et al., 2010 ; Panatier et al., 2006 ; Hennerberger et al., 2010 ; Koslov et al., 2006 ; Christensen et al., 2018 ; de Ceglia et al., 2023 ; Araque et al., 2014).

L'effet de la libération de ces gliotransmetteurs sur la synapse sont multiples et variés. Certaines études montrent une augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs (Araque et al., 1998b ; Liu et al., 2004 ; Santello et al., 2011). Des travaux illustrent une modulation de la dépression et de la potentialisation synaptique à long terme (LTD/LTP) (Hennerberger et al., 2010 ; Panatier et al., 2006 ; Pascual et al., 2005 ; Navarrete et al., 2012). Enfin, certaines études montrent même une régulation de la transmission neuronale basale (Panatier et al., 2011 ; Di Castro et al., 2011 ; Halassa et al., 2009) et une augmentation de l'excitabilité neuronale (Bezzi et al., 1998).

Cependant, il existe des travaux montrant l'absence de phénomène de gliotransmission (Fiacco et al., 2007 ; Cahoy et al., 2008 ; Sun et al., 2013 ; Chai et al., 2017). Cela pourrait s'expliquer par des différences développementales, des approches utilisées ou des régions étudiées (Savtchouk et Volterra, 2018).

Une récente étude utilisant des approches transcriptomiques a identifié une hétérogénéité astrocytaire pouvant expliquer la divergence de ces résultats. En effet, il apparait que parmi 9 sous types d'astrocytes, l'un possède une « signature glutamatergique »

lui conférant tout l'équipement nécessaire afin de réaliser l'exocytose du glutamate (de Ceglia et al., 2023). Ces premiers indices ont été confirmés par imagerie du glutamate (GluSnFR) montrant qu'un sous type d'astrocyte était capable de libérer du glutamate dans des zones spécifiques. Il semble que les transporteurs vésiculaires au glutamate de type 1 et 2 (VGLUT1 et VGLUT2) sont des éléments clés dans ce mécanisme (de Ceglia et al., 2023).

Cependant il est important de noter que la gliotransmission ne se résume pas qu'à la libération vésiculaire ; d'autres mécanismes existent, comme les hémicanaux, l'inversion de certains transporteurs membranaires ou encore par les canaux anioniques (Rossi et al., 2000 ; Yang et al., 2019 ; Chever et al., 2014 ; Pan et al., 2014).

Si la gliotransmission reste un mécanisme majeur dans la régulation de l'activité synaptique, les astrocytes peuvent également moduler les propriétés intrinsèques des neurones par d'autres mécanismes, notamment par la régulation du K^+ environnant.

4. Influence de la modulation astrocytaire du K^+ sur l'excitabilité neuronale

Précédemment, nous avons décrit que les astrocytes jouent un rôle clé dans la régulation du K^+ extracellulaire au sein du SNC. Cet ion est essentiel pour stabiliser le potentiel de membrane des neurones et des astrocytes (Barbay et al., 2023 ; Tong et al., 2014 ; Somjen, 1979). En effet, lors d'expériences sur tranches de tissu, l'application de concentrations croissantes en K^+ induit une dépolarisation réversible du potentiel de membrane des cellules (Barbay et al., 2023 ; Tong et al., 2014). De même, des incrémentations de courant au sein de neurones dans des conditions élevées en K^+ extracellulaire, induisent une réduction de la rhéobase (Tong et al., 2014 ; Bataveljic et al., 2024) ainsi qu'une augmentation du gain (Bataveljic et al., 2024), ce qui constitue des critères d'hyperexcitabilité neuronale.

Dans ces études, la restauration de la recapture du K^+ extracellulaire altérée, jusqu'à des taux et une cinétique physiologique, permet de retrouver une excitabilité neuronale basale (Tong et al., 2014 ; Bataveljic et al., 2024). Il apparait également que la modulation du K^+ extracellulaire perturbe le patron de décharge des neurones. Au sein de l'habenula latérale, la surexpression des canaux Kir4.1 induit un passage de l'activité neuronales de type bouffée à tonique (Cui et al., 2018). Cette observation a inspiré l'un des travaux de ma thèse sur la moelle épinière (voir section résultat).

Les astrocytes sont donc des partenaires de choix pour moduler l'activité des neurones. Cependant, cette interaction peut être fortement perturbée au cours de multiples pathologies, précipitant l'émergence des symptômes.

G. Réactivité astrocytaire

1. Définition : vers un consensus général ?

Lorsque le SNC subit une agression, telle qu'un traumatisme, une infection ou une neurodégénérescence, les astrocytes subissent un processus appelé astrogliose réactive. Cette dernière comporte des modifications de leur morphologie, de l'expression de leurs gènes et de leur fonction (Figure 16) (Linnerbauer et al., 2020 ; Escartin et al., 2021 ; Anderson et al., 2014). En effet, les modifications de la forme, de la taille ou du nombre des cellules gliales dans divers contextes pathologiques ont été fréquemment décrites (Freeman, 2010). En particulier, l'hypertrophie des astrocytes a été reconnue très tôt comme un signe presque universel de pathologie du SNC (Virchow, 1846 ; Virchow, 1858).

Les termes "astrogliose", "gliose réactive", "astrocytose", "réactivité astrocytaire", ont tous été utilisés pour décrire les réponses des astrocytes à des événements anormaux dans le SNC, notamment les maladies neurodégénératives et démyélinisantes, l'épilepsie, les traumatismes médullaires et corticaux, l'ischémie, les infections et le cancer. Un consortium international de chercheurs a récemment proposé l'expression "astrogliose réactive" pour définir le processus par lequel, en réponse à une pathologie, les astrocytes s'engagent dans des programmes définis sur le plan moléculaire, impliquant des changements dans la régulation transcriptionnelle, ainsi que des remodelages biochimiques, morphologiques, métaboliques et physiologiques, qui aboutissent finalement à l'acquisition de nouvelles fonctions ou à la perte ou à l'augmentation des fonctions homéostatiques (Figure 16) (Escartin et al., 2021).

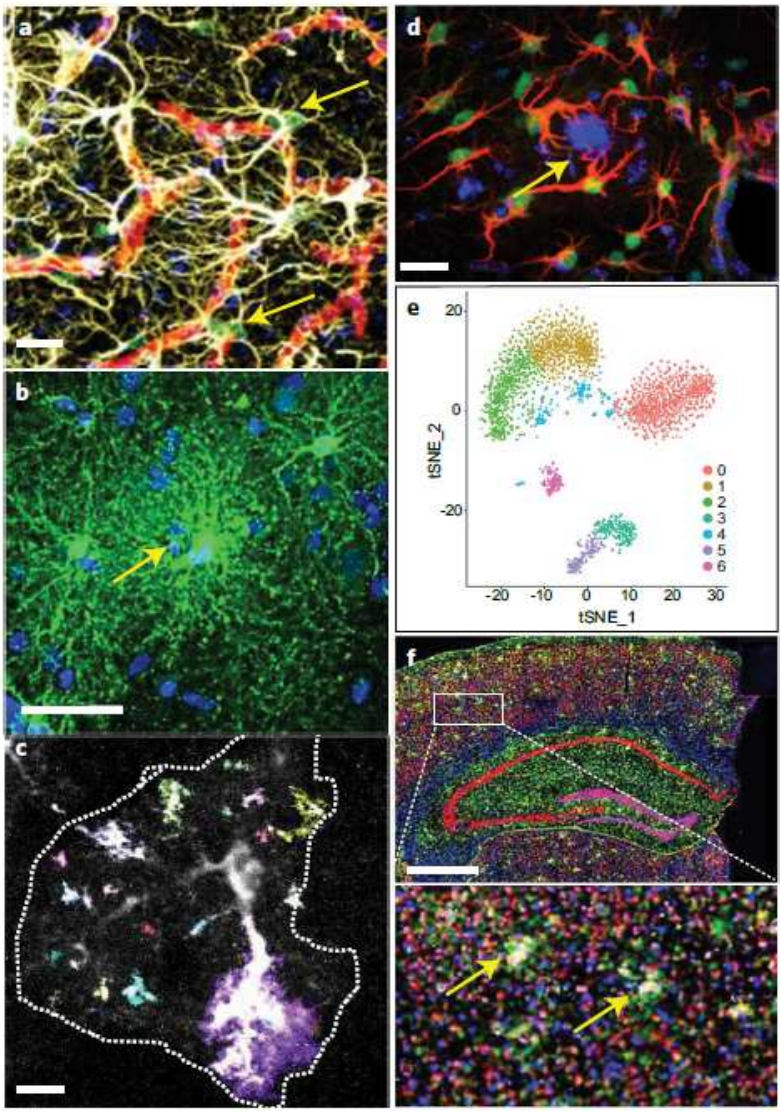


Figure 16 : Evaluation multivariée des astrocytes réactifs.

(A) Prolifération des astrocytes réactifs à proximité des vaisseaux sanguins évaluée par coloration conjointe de BrdU (vert ; flèches), DAPI (bleu), GFAP (blanc) et cD31 (rouge) après une lésion du cortex de souris. Barre d'échelle, 15 µm. Image non publiée des auteurs S.Sirko et M.Götz. b. Astrocytes protoplasmiques corticaux humains dont un d'entre eux a été injecté avec du jaune Lucifer (flèche, site d'injection) qui traverse les jonctions gap dans les astrocytes voisins. Xu, Sosunov et McKhann, Université de Columbia. c. Détermination des réponses Ca^{2+} dans un astrocyte exprimant le GcaMP6 (entouré d'une ligne pointillée) dans des tranches corticales de souris à l'aide de l'analyse quantitative des astrocytes (AQuA). Les couleurs indiquent les événements AQuA se produisant dans une seule image de 1 s d'un film de 5 minutes. Barre d'échelle, 10 µm. d, Activation du facteur de transcription STAT3 (vert) évaluée par l'accumulation nucléaire dans les astrocytes réactifs GFAP+ (rouge) entourant une plaque amyloïde (bleu, flèche) dans un modèle murin de la maladie d'alzheimer. Barre d'échelle, 20 µm. e, ScRNAseq dans la phase de rémission d'un modèle murin de sclérose en plaques révèle plusieurs groupes astrocytaires transcriptionnels. Ces sous-populations d'astrocytes peuvent être validées par la transcriptomique spatiale, comme indiqué en f dans un modèle de maladie d'alzheimer. f, Distribution de 87 gènes astrocytaires (vert), neuronaux (rouge), microgliaux (jaune) et oligodendrogliaux (bleu) par séquençage génique multiplex in situ dans une section coronale d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. La méthode "lit" les codes-barres des sondes ADN antisens qui ciblent simultanément de nombreux ARNm. Barre d'échelle : 800 µm. La zone encadrée est agrandie dans l'image du bas, montrant les plaques amyloïdes-β 6E10+ (blanc ; flèches). Issue de Escartin et al., 2021.

"La réactivité des astrocytes" ou "les astrocytes réactifs" font alors référence aux astrocytes qui répondent à toute condition pathologique dans le SNC. Les astrocytes sont considérés comme réactifs lorsqu'ils deviennent hypertrophiques et surexpriment la protéine GFAP. Cette "définition minimaliste" des astrocytes réactifs est donc basée sur les deux caractéristiques les plus universelles de la réactivité, mais cela n'exclut pas que des changements transcriptionnels, morphologiques et fonctionnels supplémentaires se produisent de manière spécifique à chaque pathologie.

La GFAP, une protéine majeure constituant les filaments intermédiaires des astrocytes, est le marqueur le plus largement utilisé des astrocytes réactifs (Escartin et al., 2021). En effet, la régulation à la hausse de l'ARNm et de la protéine GFAP, comme le montrent de multiples techniques, notamment la PCR quantitative (qPCR), le séquençage de l'ARN (RNAseq), l'hybridation in situ, la microscopie électronique et l'immunomarquage, est une caractéristique importante de nombreux astrocytes réactifs, mais pas nécessairement de tous. Il est souligné que la régulation à la hausse et l'hypertrophie de la GFAP sont des marqueurs utiles mais insuffisants pour caractériser la réactivité des astrocytes qui doivent être complétés par d'autres marqueurs et approches (Figure 16) (Escartin et al., 2021). En effet, il apparait que les astrocytes réactifs sont donc très hétérogènes et contribuent à la pathologie des maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques, mais aussi à la réparation du SNC.

2. Hétérogénéité des astrocytes réactifs

Une première étude avait suggéré que, à l'instar de la microglie, les astrocytes réactifs présentent une polarité, se divisant en deux types : A1 et A2. De cette étude, est né le concept d'astrocytes bénéfiques et délétères (Liddelow et al., 2017). Le sous-type d'astrocytes réactifs A1 montrerait des propriétés neurotoxiques, contribuant à la mort des neurones et des oligodendrocytes dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Liddelow et al., 2017). En revanche, le sous-type A2, induit à la suite d'une ischémie cérébrale, aurait des effets neuroprotecteurs via la sécrétion de facteurs essentiels à la survie et la croissance des neurones (Zamanian et al., 2012). Cependant, cette vision « simpliste » est aujourd'hui considérée comme erronée, et plusieurs études suggèrent que la réactivité astrocytaire est un phénomène dynamique qui peut varier dans le temps et l'espace, avec la

co-existence de différentes sous-populations d'astrocytes réactifs dans la même région du SNC (Sofroniew, 2020).

Étant donné l'hétérogénéité des astrocytes réactifs, leur modulation spécifique dans chaque maladie neurologique est complexe. Par exemple, l'inactivation de la transcription dépendante du facteur de transcription STAT3 dans les astrocytes réactifs entraine une détérioration de la récupération locomotrice fonctionnelle chez des souris médullo-lésées, en partie à cause de la propagation du processus inflammatoire (Herrmann et al., 2008). Ces observations soulignent l'importance de définir et de cibler sélectivement les sous-types d'astrocytes réactifs. Bien que plusieurs marqueurs soient couramment utilisés pour caractériser la réactivité des astrocytes, l'étude fonctionnelle des sous-types d'astrocytes définis de manière moléculaire n'en est qu'à ses débuts. L'application de techniques de séquençage à haut débit, y compris le scRNA-seq et la transcriptomique spatiale, a permis d'identifier des sous-ensembles d'astrocytes réactifs et de nouvelles voies impliquées dans leur régulation (Linnerbauer et al., 2020 ; Wheeler et al., 2020 ; Bayraktar et al., 2020). Cela représente une base de données importante sur laquelle s'appuyer pour développer des outils thérapeutiques efficaces.

3. Les astrocytes réactifs dans la moelle épinière pathologique

Les astrocytes réactifs constituent une signature sous-jacente à de nombreuses pathologies du SNC allant de la maladie d'Alzheimer (Guillemaud et al., 2020 ; Ceyzériat et al., 2018 ; Ben Haïm et al., 2015a), à la maladie de Huntington (Abjean et al., 2023 ; Ben Haïm et al., 2015a) en passant par la maladie de Parkinson (Heo et al., 2020 ; Jaisa-Aad et al., 2024). La moelle épinière ne fait pas exception à cette caractéristique et fait également état de réactivité astrocytaire.

- La sclérose en plaque

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurodégénérative auto-immune qui affecte le cerveau et la moelle épinière, les deux composantes du SNC. Cette maladie neurodégénérative imprévisible est caractérisée par des poussées inflammatoires à la fois cause et conséquence d'une destruction de la substance blanche du SNC, et progressivement une destruction de la matière grise. Cela conduit à une progressive et irréversible d'un handicap neurologique caractérisé par des perturbations motrices, sensitives et cognitives. De

multiples populations de cellules immunitaires, plus particulièrement les lymphocytes T et B, sont impliquées dans la pathogenèse de la SEP. Dans les phases tardives de la SEP, l'inflammation chronique du SNC serait due à l'activation des cellules gliales résidentes, notamment les astrocytes et la microglie (Linnerbauer et al., 2020 ; Baecher-Allan et al., 2018). Les premières preuves du rôle des astrocytes dans la pathologie de la SEP remontent au XIXe siècle, lorsque Jean-Marie Charcot a identifié les astrocytes comme des composants clés des lésions de la SEP (Charcot, 19ème siècle). Des études sur le modèle rongeur ont ensuite révélé les divers rôles des astrocytes dans l'inflammation du SNC. Dans un modèle murin de SEP, l'inhibition pré-symptomatique des astrocytes réactifs à l'aide d'outils génétiques augmente la gravité de la maladie et l'inflammation du SNC (Liedtke et al.,1998 ; Voskuhl et al., 2009 ; Toft-Hansen et al., 2011). En revanche, l'inhibition des astrocytes réactifs pendant la phase chronique (c'est-à-dire après l'apparition des symptômes) améliore la pathogenèse de la maladie, en limitant le recrutement et l'activation de la microglie et des monocytes (Mayo et al., 2014). Ces rôles apparemment opposés des astrocytes soulignent encore une fois leur hétérogénéité fonctionnelle dans le cadre de la SEP.

- L'atrophie musculaire spinale (AMS)

L'atrophie musculaire spinale (AMS) est un trouble neuromusculaire caractérisé par une faiblesse et perte musculaire causé par la dégénération des motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière. L'origine de ce trouble repose sur une délation ou mutation au niveau du gène *survival of motor neuron 1* (SMN) qui code pour la protéine SMN (Lefebvre et al., 1997 ; Lorson et al., 1999 ; Lunn et Wang, 2008 ; Vitte et al., 2007). Si la grande majorité des études interrogent le rôle des motoneurones, le rôle des astrocytes au sein de ce trouble neuromusculaire reste encore mal compris. Une étude récente a proposé que les astrocytes réactifs joueraient un rôle majeur dans la dégénérescence des motoneurones au sein de cette pathologie. Utilisant un modèle de souris de l'AMS, il a été démontré que la réactivé astrocytaire précède la dégénérescence des motoneurones (Schmitt et al., 2023). De plus, cette réactivité astrocytaire s'accompagne d'une diminution d'expression du gène *excitatory amino acid transporter 1* (EAAT1) qui a pour cause d'augmenter les taux en glutamate au niveau de la moelle épinière ce qui induit en retour la dégénérescence des motoneurones (Schmitt et al., 2023). Dans cette même étude, prévenir la réactivité astrocytaire avec de

l'acide arundic permet de diminuer la dégénérescence des motoneurones, préserver la densité musculaire ainsi que les fonctions motrices (Schmitt et al., 2023).

- La cicatrice gliale à la suite à une lésion de la moelle épinière

Parmi les astrocytes réactifs de la moelle épinière, ceux appartenant à la cicatrice gliale sont les plus étudiés. Au niveau du site de lésion, une importante réponse inflammatoire va se mettre en place par le biais de cytokines telles qu'IL-1β, TNF, IL-6 (Bartholdi et Schwab, 1997 ; Klusman et Schwab, 1997), LIF (Kurek et al., 1998 ; Sugiura et al., 2000) et MCP-1 (Bartholdi et Schwab, 1997 ; Song et al., 2001 ; Bareyre et Schwab, 2003), conduisant à la formation de la cicatrice gliale. Cette cicatrice est composée d'astrocytes réactifs, de microglies, de précurseurs d'oligodendrocytes et de cellules méningées recrutés au niveau du site de lésion. Elle se forme entièrement après la lésion et constitue un maillage de GFAP et de vimentine autour de la lésion (McKeon et al., 1991).

Une étude montre que les astrocytes formant cette cicatrice gliale sont composés presque entièrement d'astrocytes nouvellement formés ayant une forme allongée et des prolongements qui se chevauchent (Wanner et al., 2013). Cette cicatrice a longtemps été considérée comme étant nécessaire pour réduire l'inflammation au niveau site de lésion (Herrmann et al., 2008 ; Sofroniew, 2020).

À la suite d'une lésion de la moelle épinière, les axones endommagés ne parviennent pas à repousser spontanément au sein du tissu lésé. L'une des principales explications de ce manque de repousse axonale est la cicatrice gliale. Pendant longtemps, les astrocytes de la cicatrice gliale ont été considérés comme une barrière à la repousse axonale. En effet, plusieurs études ont montré qu'atténuer la formation de la cicatrice gliale permet une repousse axonale spontanée (Windle et al., 1952 ; Windle, 1956). Une des explications serait que les astrocytes produisent de la *condroitin fulfate proteoglycans* (CSPGs), qui inhibent la repousse axonale *in vitro* (Silver et Miller, 2004). Une autre étude a démontré qu'après une hémisection de la moelle épinière chez des souris KO pour la GFAP et la vimentine, la cicatrice gliale est atténuée et une amélioration des fonctions motrices est observée (Menet et al., 2003). Cependant une étude plus récente remet en question ces conclusions.

En 2016, une équipe montre que prévenir la formation de la cicatrice gliale en utilisant des souris KO pour le gène STAT3 ne permet pas une repousse axonale spontanée (Anderson

et al., 2016). Cependant, à la suite d'une administration d'un hydrogel contenant des molécules de facteurs de croissance, une repousse axonale est observée. De plus, chez les souris où la cicatrice gliale est inhibée, la repousse axonale induite par l'hydrogel est réduite, montrant alors ainsi le rôle clé des astrocytes dans la repousse axonale. Les auteur.e.s de l'étude ont également effectué des expériences utilisant du séquençage ARN et ont montré que les astrocytes exprimaient des molécules favorisant la repousse axonale (Anderson et al., 2016). Cette étude met en lumière l'hétérogénéité des astrocytes réactifs, notamment au sein de la moelle épinière. Bien que la présence des astrocytes réactifs ait été établie dans un grand nombre de pathologies, les pertes de fonction éventuelles qui leurs sont associées demeurent parfois encore mystérieuses.

4. Réactivité astrocytaire et perte de fonction : négligence des astrocytes ?

Si le processus de réactivité astrocytaire s'accompagne de changements morphologiques, il engendre également l'acquisition de nouvelles fonctions ainsi que la perte de fonctions essentielles au maintien du SNC. Ces pertes et gains de fonctions peuvent survenir en même temps à la suite de divers remodelages de l'activité transcriptionnelle des astrocytes. Nous allons ici détailler certaines pertes de fonctions clés des astrocytes réactifs que j'ai eu l'occasion d'étudier au cours de ma thèse. Bien évidemment, il existe d'autres pertes de fonctions liées aux astrocytes réactifs que je ne pourrai malheureusement pas aborder dans ce manuscrit.

- Aberrance des signaux calciques astrocytaires

De nombreuses études font état de dysfonctionnements de l'activité Ca^{2+} des astrocytes dans diverses pathologies. Par exemple, une étude sur un modèle murin de la maladie d'Huntington montre un dysfonctionnement de l'activité Ca^{2+} au niveau des astrocytes : leur activité Ca^{2+} spontanée est réduite, mais les signaux Ca^{2+} induits stimulation électrique sont quant à eux augmentés (Jiang et al., 2016). Chez des souris APP/PS1, utilisées comme modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les astrocytes actifs sont soit plus nombreux et fortement synchronisés (Kuchibhotla et al., 2009), soit diminués (Shah et al., 2022). Dans la sclérose latérale amyotrophique, les signaux Ca^{2+} au niveau des microdomaines sont

également augmentés en raison de la relocalisation des mitochondries dans ces compartiments (Agarwal et al., 2017).

Les altérations Ca^{2+} ne sont pas spécifiques aux maladies neurodégénératives, elles sont également observées dans des modèles murins du spectre autistique et de dépression. Par exmple, des souris mutées au niveau du gène codant pour le récepteur IP3R2, connu pour induire le relargage de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires, présentent des troubles au niveau des interactions sociales et des comportements répétitifs (Wang et al., 2021). Récemment, dans un modèle de dépression, les astrocytes présentent des réductions des signaux Ca^{2+} spontanés et induits par la sérotonine (Gonzalez-Arias et al., 2023).

Initialement, ces signaux Ca^{2+} n'étaient que de simples observations, mais certaines études actuellent proposent de les moduler pour restaurer un phénotype non pathologique. Par exemple, dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, la restauration de l'activité Ca^{2+} par un senseur calcique (STIM1) permet d'augmenter la plasticité synaptique à long terme (Lia et al., 2023). De même, augmenter l'activité Ca^{2+} *in vivo* dans des modèles de dépression réduit leurs symptômes (Gonzalez-Arias et al., 2023). Dans cette même étude, diminuer artificiellement l'activité Ca^{2+} astrocytaire suffit à provoquer des troubles cognitifs chez la souris (Gonzalez-Arias et al., 2023).

De ce fait, la perturbation des signaux Ca^{2+} au niveau des astrocytes ne semble pas être uniquement une conséquence des pathologies, mais semble également participer à l'aggravation, voire à l'émergence des symptômes.

- Perte du couplage jonctionnel

Les astrocytes, grâce à leurs nombreux prolongements, établissent des contacts entre eux afin de former un couplage jonctionnel. Une étude réalisée sur des tissus de patients épileptiques a révélé une altération du couplage jonctionnel, réduisant la recapture du K^+, ce qui pourrait favoriser l'activité épileptique (Bedner et al., 2015). De plus, chez des souris SOD1, modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique, une autre étude a révélé que le couplage jonctionnel est diminué, affectant également la recapture du K^+ sans aucun changement d'expression du canal Kir4.1 (Stevenson et al., 2023).

- Perturbation de l'homéostasie K^+

Une diminution de la recapture du K^+ constitue également une perte de fonction liée aux astrocytes réactifs. Si des travaux ont identifié les canaux Kir4.1 en tant qu'acteurs clés dans la recapture K^+, des études récentes en contexte pathologique ont également confirmé leur rôle crucial.

Une étude portant sur un modèle animal de la maladie d'Huntington a démontré qu'un sous-type astrocytaire contenant des inclusions nucléaires de mHTT (huntingtine mutée) possédait une expression réduite en Kir4.1, entraînant une réduction fonctionnelle du courant médié par ces canaux (Tong et al., 2014). Une thérapie par AAV visant à restaurer l'expression des canaux Kir4.1 a permis de (i) restaurer les propriétés biophysiques des astrocytes, (ii) réduire l'excitabilité des neurones striataux (MSN), (iii) restaurer une concentration physiologique de $[K^+]_e$, et (iv) réduire certains symptômes moteurs tout en prolongeant la durée de vie des souris (Tong et al., 2014).

Dans une étude très récente, les canaux Kir4.1 ont également montré leur potentiel thérapeutique chez des modèles murins du syndrome de l'X fragile. Les neurones de l'hippocampe de ces souris montrent des signes d'hyperexcitabilité associés à des élévations anormales de K^+ extracellulaire (Bataveljic et al., 2024). Le dysfonctionnement des canaux Kir4.1 dans les astrocytes semble être le coupable. Sur le même principe que l'étude menée par Tong et ses collaborateurs/collaboratrices, une thérapie visant à restaurer l'expression des canaux Kir4.1 permet de retrouver une excitabilité neuronale physiologique et de réduire les symptômes cognitifs par le biais de l'homéostasie K^+ (Bataveljic et al., 2024).

Enfin, au niveau de cicatrice gliale dans les tumeurs, un dysfonctionnement de la recapture K^+ est observé, associé à une faiblesse de la recapture glutamatergique (Campbell et al., 2020). De même, une diminution d'expression des canaux Kir4.1 est observée- au niveau de la cicatrice gliale de la moelle épinière (Olsen et al., 2010).

Face à ces différentes pertes de fonction liées à la réactivité astrocytaire, cibler ce phénomène apparait comme une approche thérapeutique prometteuse.

H. Les points clés du chapitre

- **Les astrocytes, un type de cellules gliales, ont longtemps été sous-estimé**
- **Les astrocytes sont identifiables par leur morphologie complexe, la présence de marqueurs spécifiques tels que l'Aldh1L1 et la GFAP ainsi que par leurs propriétés électriques**
- **Une grande hétérogénéité astrocytaire est présente d'un point de vue morphologique et fonctionnel tant au niveau d'une même région qu'entre diverses régions du SNC**
- **Les astrocytes sont les gardiens de l'homéostasie K^+ du SNC notamment par le biais des canaux Kir4.1**
- **Les astrocytes sont un acteur clé de la synapse tri-partite, ils sont moléculairement équipés afin détecter, intégrer et influencer en retour les synapses voisines**
- **Les astrocytes influent l'excitabilité des neurones en modulant l'homéostasie K^+**
- **Les astrocytes peuvent devenir réactifs dans un contexte pathologique et voir certaines de leur fonction perturbée**
- **Plusieurs études associent réactivité astrocytaire et perturbation de l'homéostasie K^+**

II – La locomotion : reflet de la rythmogénèse spinale

A. La rythmogénèse au sein du SNC

La rythmogénèse se manifeste par des mouvements rythmiques stéréotypés qui se répètent sur un intervalle de temps défini. Les travaux de Feldman et Grillner en 1983 proposent que la base neuronale sous-tendant tout mouvement rythmique puisse être décomposée en quatre parties fonctionnellement distinctes. Premièrement, un centre supérieur est impliqué dans le contrôle de l'initiation du mouvement (départ) ainsi que dans son adaptation en réponse à divers stimuli environnementaux (olfactifs, visuels ou sensoriels). Deuxièmement, le niveau implique nécessairement les motoneurones qui innervent directement la contraction des muscles et donc le mouvement. Au troisième niveau, on retrouve les récepteurs sensoriels périphériques activés pendant le mouvement afin de fournir un rétrocontrôle positif ou négatif pour ajuster le mouvement en cours. Enfin, des réseaux de neurones sont capables de produire une activité rythmique grâce à la coordination de populations spécifiques de neurones (Feldman et Grillner, 1983). Ces réseaux, appelés "générateurs de patrons centraux" (GPC), se trouvent au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière, et peuvent produire un motif d'activité rythmique même en l'absence de stimuli sensoriels périphériques ou d'entrées provenant des centres supérieurs, ce qui indique que le GPC est autonome. Cette rythmogénèse est au cœur de plusieurs fonctions physiologiques vitales telles que la digestion, le sommeil, la mastication, la respiration et la locomotion. Cette dernière est au cœur de l'un de mes travaux de thèse.

B. La locomotion dans le règne animal

Face à une adaptation et à une sélection constante des espèces à leur environnement, la locomotion est apparue très tôt dans l'arbre phylogénétique. La plupart des espèces vivantes partagent cette faculté pour accéder à une plus grande surface dans leur environnement, ce qui leur permet de trouver de la nourriture, d'éviter d'éventuels dangers, de faciliter les interactions sociales ou encore de perpétuer la reproduction de l'espèce. Très tôt, Aristote, à travers ses observations, a jeté les bases de ce que l'on appelle aujourd'hui la

biomécanique. En effet, il avance que tout mouvement nécessite deux points d'appui immobile : un principe interne, pouvant correspondre aux articulations, et un second, dit externe, correspondant à une surface d'appui telle que le sol, l'eau, l'air ou les branches des arbres. La locomotion n'est contrainte que par deux éléments : la gravité et l'environnement. Si la première contrainte est inhérente au monde vivant, la locomotion s'adapte en revanche à l'environnement dans lequel évolue l'espèce en question. Ainsi, au cours de l'évolution, plusieurs types de locomotion ont émergé allant de la bipédie, au vol, en passant par la nage et le brachiation (Figure 17).

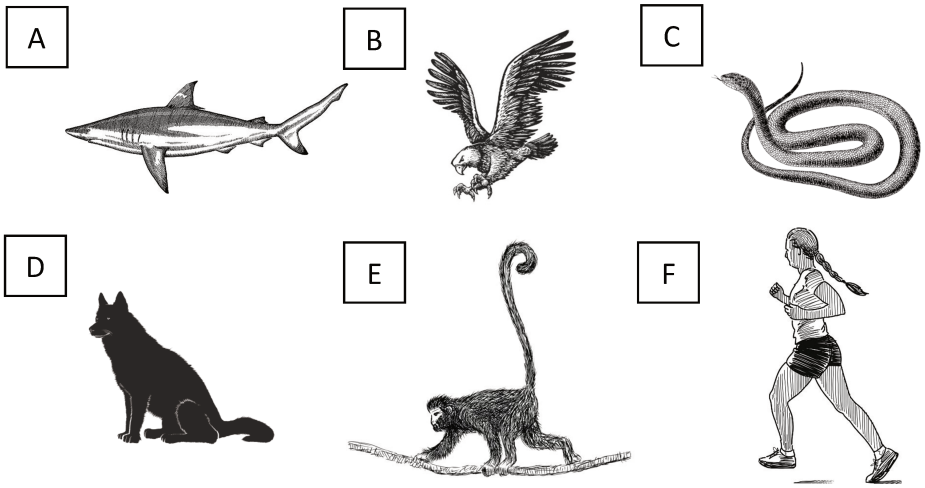


Figure 17 : Les différents modes de locomotion dans le règne animal.
La morphologie de l'espèce est adaptée à l'environnement dans lequel l'espèce en question évolue afin de permettre une fonction locomotrice adaptée. (A) La nage chez le requin dans le milieu aquatique, (B) le vol chez l'aigle, (C) l'apodie chez le serpent, (D) la quadrupédie chez le chien, (E) le brachiation en quadrupédie chez le singe et (F) la bipédie (marche, course) chez l'Homme.

En ce qui concerne le sous-embranchement des vertébrés, les mouvements sont rendus possibles grâce à l'association de plusieurs systèmes, à savoir : (1) le système squelettique, dont les os articulés servent de support pour l'insertion, (2) le système musculaire qui, par sa contraction, applique une force sur le squelette, entraînant ainsi son mouvement, et (3) le système nerveux qui assure le contrôle de cette contraction musculaire. Pour permettre un mouvement coordonné dans un environnement spécifique face à une problématique donnée, la coordination de ces trois systèmes au niveau d'un membre est essentielle. Dans le cadre de ma thèse, je vais me concentrer plus particulièrement sur la locomotion des membres postérieurs chez les vertébrés, en particulier chez la souris. Chez les quadrupèdes, le

mouvement des membres postérieurs lors de la marche aboutit à la mise en place d'un cycle locomoteur constitué d'une phase d'appui et d'une phase de transfert (Figure 18). La répétition rythmique de ces cycles définit alors le patron et le rythme locomoteur (Figure 18), finement contrôlés par différentes structures au sein du SNC.

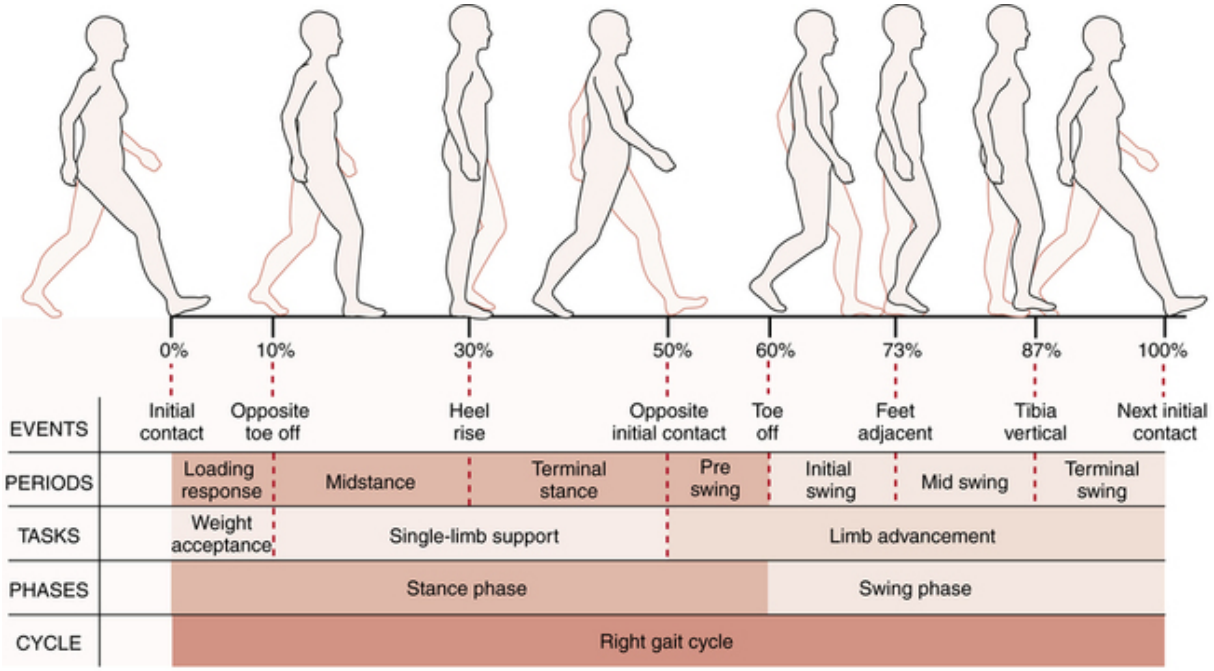


Figure 18 : Cycle de pas de la jambe droite chez l'Homme.

Le cycle de pas d'une jambe est assurée par la contraction coordonné des différents muscles fléchisseurs et extenseurs lors des phases d'appuis (stance phase) et de transfert (swing phase). La phase d'appui débute lorsque le pied entre en contact avec le sol. Une extension du genou permet ensuite la propulsion du corps vert l'avnt aboutissant à une phase dite de transfert. Ensuite à lieu l'extension du genou en vue de préparer le prochain contact avec me sol. Issue clinicalgate.

C. Le SNC dans la locomotion

Nous pouvons identifier deux natures de contrôle de l'activité musculaire : le mouvement volontaire ou involontaire (automatique). Les mouvements volontaires permettent l'exécution de tâches motrices spécifiques (préhension), le plus souvent dirigé vers un but précis tandis que les mouvements involontaires (respiration) sont exempts de tout commande volontaire. La locomotion fait appel aux processus intentionnels comme pour initier et affiner la trajectoire d'un individu en fonction des contraintes environnementales rencontrées (obstacle) mais également aux processus automatiques produit par les GPC (Kiehn, 2016 ; Grillner et El Manira).

1. Les centres supraspinaux dans la locomotion

Ces processus intentionnels intervenant dans le processus de locomotion sont majoritairement assurés par des structures supraspinales (Kiehn, 2016 ; Grillner and El Manira et al. 2020). Brièvement ces structures sont impliquées dans l'initiation, l'ajustement face aux contraintes de l'environnement et l'arrêt. Pendant une longue période, le contrôle moteur était vu comme une fonction majoritairement volontaire, de ce fait, le cortex cérébral, siège de la conscience à fait l'objet d'un grand nombre d'études. Même si les projections corticospinales directes soient à l'origine des mouvements volontaires, il apparait qu'elles ne sont pas indispensables au processus de locomotion (Muir et Whishaw, 1999 ; Dubuc et al, 2008). L'étau se rétrécit et les études se penchent sur les régions sous-corticales. Des préparations utilisant le chat décérébré (e.g présentant une section transversale au-dessus des colliculi supérieurs) ont permis de mettre en évidence la possibilité d'initier et de moduler la marche à la suite d'une stimulation électrique d'une région mésencéphalique (Shil et al, 1966) ; ou de structures ayant des projections sur celle-ci (Rossignol et al, 2006). Cette structure porte le nom de Région Locomototrice Mésencéphalique (MLR) (Figure 19) et permet également de moduler la vitesse de cette locomotion à la suite de stimulations électriques croissantes (Caggiano et al, 2018. Shik et al, 1966). Plusieurs travaux ont démontré que la fonction motrice de la MLR repose principalement sur la transmission excitatrice de neurones glutamatergiques (Brocard et Dubuc, 2003 ; Caggiano et al, 2018 ; Roseberry et al, 2016 ; Carbo-Tano et al. 2023). Cette région clée est localisée à l'interface des noyaux cunéiformes (CN) et pédonculo-pontins (PPN) (Figure 19) et apparait être impliquée dans la genèse de l'initiation de la locomotion, cependant celle-ci ne projette pas directement sur la moelle épinière. Pour cela l'information va être relayé au niveau du locus coeruleus (LC) et des neurones réticulaires pontiques (RN) et médullaires (MRF) (Dubuc et al, 2008, Noya et al, 2017) qui a leur tour projettent sur les interneurones du GPC locomoteur ainsi que sur les motoneurones (Figure 19) (Floeter et Lev-Tov, 1993 ; Jankowska, 2008). À noter que des stimuli répétés d'une région du cervelet peut également déclencher la locomotion (S.Mori et al, 1998). Toutes ces projections vers la moelle épinière lombaire se mettent en place à partir de E17 jusqu'à la deuxième semaine post-natal (Vinay et al, 2002). De manière intéressante des animaux ayant subi une transsection complète de la moelle épinière restent en mesure de réaliser des mouvements locomoteurs des membres postérieurs sur tapis roulant,

suggérant l'existence de centres spinaux contrôlant la locomotion des membres postérieurs de manière automatique, indépendamment de tout contrôles volontaires supraspinales (Barbeau et Rossignol, 1987 ; Antri et al, 2005 ; Barra et al, 2022 ; Capogrosso et al, 2021).

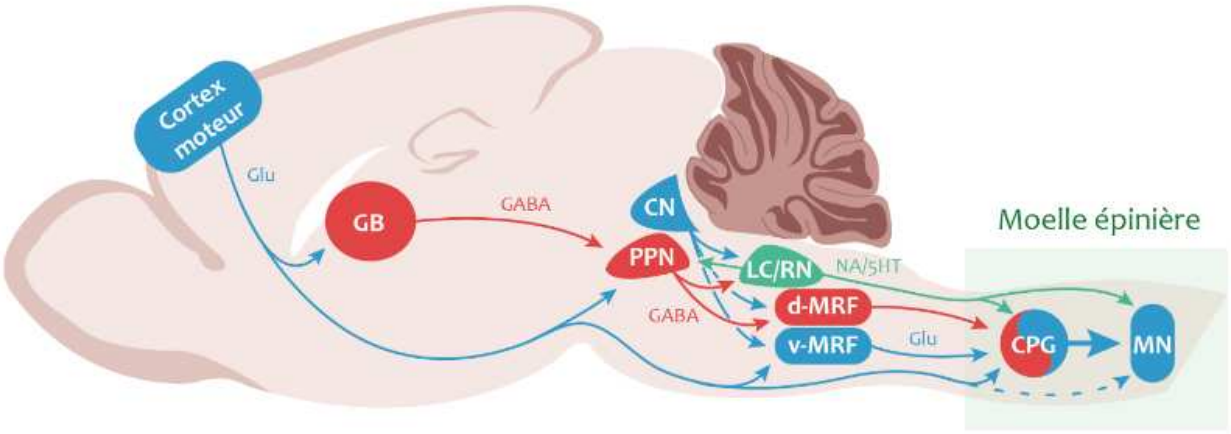


Figure 19 : Projections des centres supra-spinaux sur le réseau locomoteur spinal.
Représentation schématique des différentes projections activant, et régulant, le réseau locomoteur spinal. L'initiation de la locomotion est assurée par la région locomotrice mésencéphalique (MLR) localisée dans la région à l'interface entre le noyau cunéiforme (CN) et le noyau pédonculo-pontin (PPN). Elle active ensuite le Locus Coeruleus (LC) ainsi que les neurones réticulaires localisés dans le noyau réticulaire pontique (RN) et dans la formation réticulée médullaire (MRF). Ces structures vont alors libérer du glutamate (Glu), du GABA, de la noradrénaline (NA) et de la sérotonine (5HT) au niveau du CPG locomoteur permettant l'émergence du rythme.

2. La moelle épinière dans la locomotion

• Émergence du concept de générateur de patron centraux (GPC) spinal

Le début du XXème siècle s'inscrit dans l'opposition de deux visions sur cette origine spinale de l'activité locomotrice. D'un côté la vision de Charles Scott Sherrington en 1910, qui propose que l'activité motrice repose sur une succession de boucles réflexes cutanées proprioceptives. La seconde, supporté par Thomas Graham Brown en 1914, propose quant à lui, la présence au sein de moelle de d'hémigénérateurs, un flexogène et un extensogène produisant le rythme et le patron locomoteur par leur inhibition réciproque (Clarac, 2008). Ce n'est qu'en 1967, grâce aux travaux de Lundberg, que la balance entre les deux visions bascule en démontrant que l'activité des muscles extenseurs précèdent le contact de la patte avec le sol, ce qui contredit l'hypothèse de Sherrington en faveur de Brown (Grillner et al., 1967 ;

Jankowska et al., 1967a, 1967b). L'hypothèse de Brown est confirmée quelques années plus tard grâce aux travaux de Viala et Buser, démontrant qu'une activation pharmacologique de la moelle épinière sur un lapin curarisé et suffisante pour induire une alternance d'activités entre les nerfs innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs, confirmant ainsi la présence d'un générateur endogène (Viala et Buser, 1969). Dans la foulée, se développent de nouvelles préparations innovantes de moelle épinière isolée *in vitro*, sur lesquelles une locomotion dite fictive peut être induite pharmacologiquement en absence de mouvement, d'afférences sensorielles et de centres supraspinaux (Kudo et Yamada, 1987). Cette activité est caractérisée par des activités rythmiques et alternées entre les racines ventrales droite/gauche et confirme définitivement dans les grandes lignes, l'hypothèse de Brown. En revanche, il ne demeure pas que l'hypothèse de Sherrington était complètement fausse. En effet, si aujourd'hui il est admis que les afférences sensorielles ne sont pas requises pour l'émergence du rythme et du patron locomoteur, elles permettent en revanche de moduler et voire d'arrêter la locomotion (Conway et al., 1987 ; Rossignol et al., 2006 ; Wyart, 2017). Ces travaux concluent que le rythme locomoteur repose sur une activité autorythmique de réseaux de neurones intra-spinaux formant ce que l'on nomme, le GPC locomoteur. Cependant, même si la présence de ce générateur endogène au sein de la moelle épinière est démontrée, la localisation précise ainsi que l'architecture de celui-ci est encore un mystère.

- Localisation et architecture du GPC

La quête d'établir la localisation précise ainsi que l'architecture du GPC locomoteur est alors lancée. Les travaux princeps ont été réalisé chez des vertébrés « inférieurs » tel que la lamproie, où la complexité du système nerveux est plus simple. Chez ce modèle animal il est démontré que l'activité locomotrice se propage le long de la moelle épinière selon un axe rostro-caudal (Grillner et Wallén, 2002). Dans cette idée, des lésions de moelle épinière ont démontré que chaque segment de moelle épinière est capable de produire une activité locomotrice alternée (Grillner et Wallén, 1984). De plus, une section longitudinale montre que chaque hémi-moelle conserve cette capacité (Cangiano et Grillner, 2003). Cependant les travaux entrepris par la suite chez le rongeur ne permet pas de corroborer l'intégralité des résultats, il y a une divergence sur certains points. Premièrement, chez le rat, le marquage de neurones actifs durant la locomotion permet de révéler que le GPC des membres postérieurs

n'est pas réparti de façon homogène au sein du segment lombaire. Celui-ci est localisé au niveau des couches VII, VIII et X (Kjnaerulff, Barajon, et Kiehn, 1994) des deux premiers segments lombaire (L1-L2) (Figure 20) (Cazalets et al., 1995). L'ensemble de ces études soulignent que l'architecture du GPC locomoteur présentent des différences structurelles inter-espèces (Delivet-Mongrain, 2008). Des études plus poussées suggèrent que l'architecture du GPC locomoteur des mammifères pourraient être organiser de façon hiérarchique avec différents sous-types de neurones, chacun responsable d'une fonction particulière comme la genèse du rythme et du patron locomoteur (Perret et Cableguen, 1980).

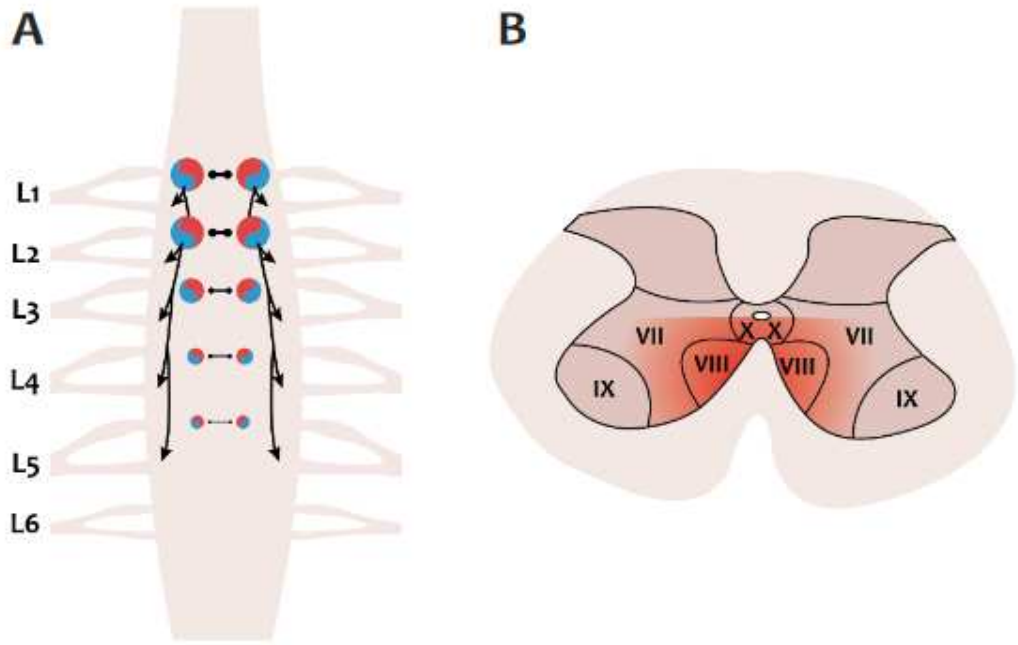


Figure 20 : Localisation du GPC locomoteur chez le rongeur nouveau-né.
Représentation schématique de la moelle lombaire (A) illustrant l'importance du CPG locomoteur au travers des différents segments. Le rythme locomoteur est majoritairement généré au niveau des deux premiers segments, plus particulièrement dans la zone ventrale des couches X, VII et VIII (B).

D. Diversité neuronale dans la genèse du rythme et du patron locomoteur

Les études focalisées sur la diversité neuronale au sein du GPC locomoteur chez le rongeur ont permis d'établir plusieurs populations d'interneurones ventraux-médian (localisation du GPC) nommées de V0 à V3 différenciées par leur expression en divers facteurs de transcription (Goulding et al., 2002 ; Stepien et Arber, 2008). S'ajoute à ce degré de complexité, la localisation de ces neurones, leur projection et la nature de leur

neurotransmission. L'utilisation d'outils génétiques permettant l'inactivation spécifique de chaque sous-population combiné à des approches électrophysiologies et comportementales a permis d'identifier leur rôle dans la fonction locomotrice. Si la locomotion fait au premier abord penser à une fonction simple et unique, celle-ci est en réalité régit par des circuits neuronaux complexes. De plus, la locomotion présente différents répertoires fonctionnels moteurs comme la marche, le trot, le sprint, l'arrêt, les mouvements fins, la coordination, les asymétries sans même aborder la proprioception et les différentes pathologies.

1. Le générateur du patron locomoteur

Le générateur du patron locomoteur correspond à la distribution séquentielle de l'activité nerveuse aux différents groupes musculaires afin d'assurer la coordination des mouvements. En d'autres termes, cela fait référence à la coordination d'un muscle et de son antagoniste ainsi qu'à l'alternance gauche droite (bilatéral). En effet, la plupart des espèces présentent un mode de coordination bilatérale prépondérant. Ce patron locomoteur repose essentiellement sur la transmission synaptique inhibitrice (Kiehn, 2006 ; Kiehn, 2016 ; Grillner et El Manira 2020). En effet, l'alternance des sorties motrices est abolie en présence de bloqueurs des récepteurs glycinergiques et GABAergiques (Beato et Nistri, 1999 ; Bertrand et Cazalets, 1998 ; K.C Cowley et Schmidt, 1995).

• L'alternance flexion / extension

D'une part le patron locomoteur repose sur l'alternance fléchisseur/extenseur au niveau de la sortie motrice des muscles antagonistes ipsilatéraux. Un sous type d'interneurones inhibiteurs, les V1 et V2b semblent être impliqués dans la production d'une sortie motrice alternée entre muscle fléchisseurs et extenseurs. Une étude démontre que l'ablation sélective des interneurones V1 entraine une hyperflexion des membres postérieurs tandis que l'ablation des V2b entraine une hyperextension avec un retard de transition au cours de la phase d'appui à la phase de transfert (Britz et al., 2015). De manière plus précises, les interneurones V1 sont divisé en deux sous classes : les Ia et les cellules de Renshaw. Les interneurones Ia jouent un rôle clé dans l'alternance flexion/extension. En effet, à la suite de l'étirement d'un muscle, d'une part, les fibres proprioceptives recrutent de façon monosynaptique les motoneurones du muscle en question et active également les

interneurones Ia qui inhiberont les motoneurones du muscle antagoniste ipsilatéral. En parallèle les motoneurones émettent des collatérales sur les cellules de Renshaw ce qui favorise leur propre activation. En retour, ces cellules spécifiques vont exercer un rétrocontrôle négatif récurrent en libérant du GABA et de la glycine (Cullheim et Kellerth, 1978 ; Schneider et Fyffe, 1992). En revanche diverses études reportent que leur absence n'affecte pas le patron locomoteur (Nishimaru et al., 2006) mais modifie le gain des sorties motrices (Noga et al., 1987 ; Pratt et Jordan, 1987 : Nishimaru et al., 2006). En résumé, le patron d'alternance des muscles fléchisseurs et extenseurs repose sur les interneurones V2b et un sous type d'interneurones Ia.

- L'alternance gauche / droite

L'alternance gauche-droite repose sur la connectivité entre les deux hémimoelles qui fait appel aux interneurones commissuraux (CIN). Des expériences reposant sur du traçage rétrogrades et antérogrades ont permis d'identifier quatre populations de neurone chez le rongeur en fonction de leurs projections. On retrouve les interneurones ascendants (CINa), les descendants (CINd), les bidirectionnels (CINad) ainsi que ceux projetant au sein du même segment spinal (Eide et al., 1999 ; Stokke et al., 2002). Même si leur localisation n'est pas spécifique à une région ou une couche, ils sont principalement retrouvés au sein des couches VII et VIII des segments T13 à L2 (Figure 21).

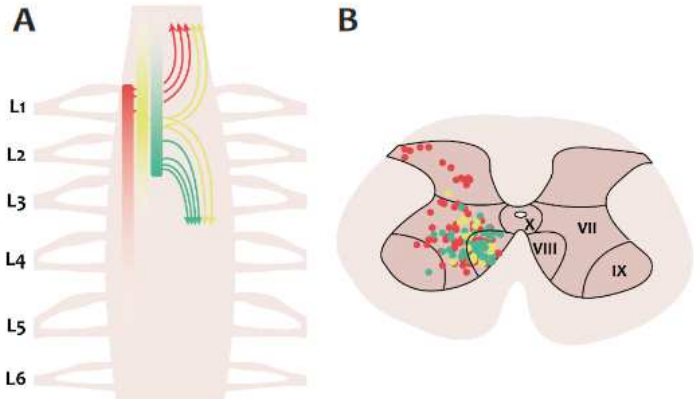


Figure 21 : Localisation des interneurones commissuraux.
Représentation schématique de la moelle lombaire (A) illustrant la localisation des interneurones commissuraux ascendants (rouge), descendants (vert) et projetant dans les deux directions (jaune). Le dégradé de couleur renseigne sur la quantité d'interneurones présents. (B) Localisation des corps cellulaires des différents CIN sur une coupe transversale de moelle lombaire.

Ces neurones exercent une fonction primordiale dans l'alternance gauche droite (Cazalets et al., 1995 ; Kiehn et Kjaerulff, 1996). En effet, une séparation des hémimoelles entre T13 et L2 perturbent complètement l'alternance gauche-droite sur l'ensemble de la région lombaire (Cazalets et al., 1995 ; Kiehn et Kjaerulff, 1996). Les CIN proviennent à la fois de la différenciation des interneurones V0 et V3 qui expriment respectivement le facteur de transcription Dbx1 et SIM1. Une mutagénèse dirigée contre le gène Dbx1 supprime l'expression des CIN de 30 % ce qui est corrélée à l'apparition d'activité en phase des racines lombaires droite et gauche (Lanuza et al., 2004) sans impacter l'alternance flexion/extension. De plus, une ablation sélective des interneurones V0 conduit à une faiblesse du patron gauche-droite (Figure 22) à différent degré de fréquence (Talpalar et al., 2013).

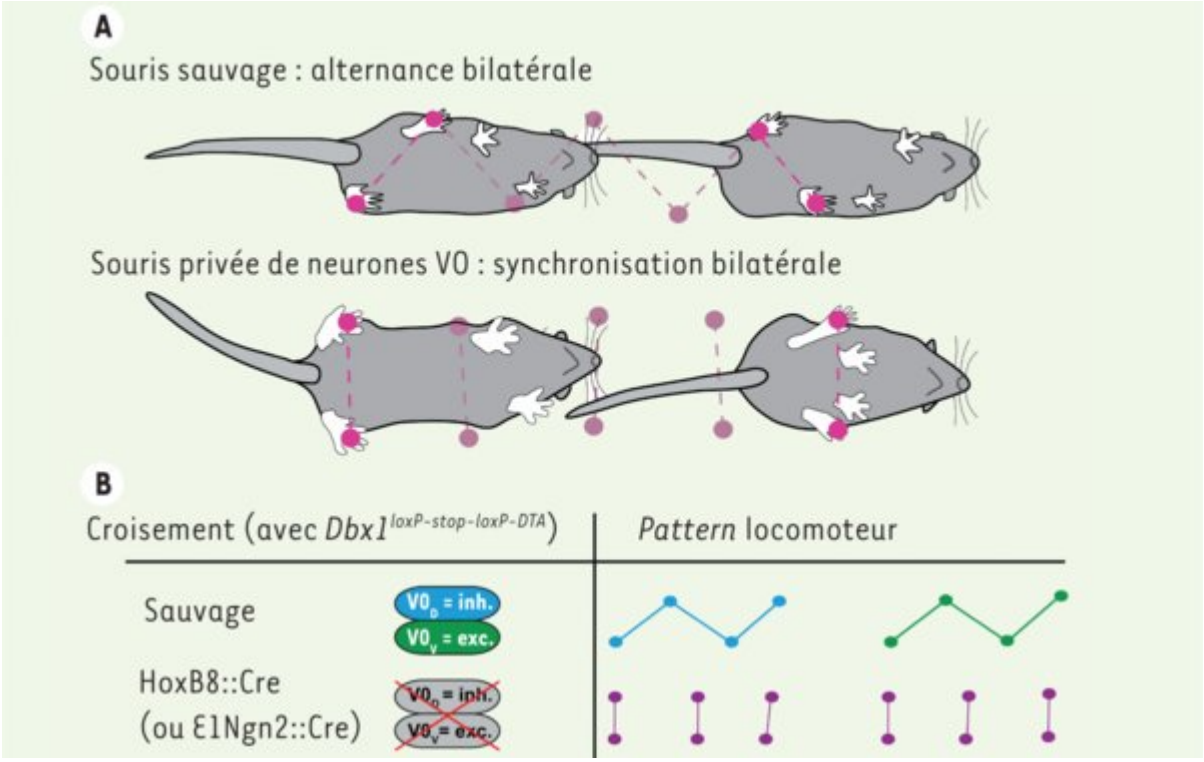


Figure 22 : Rôle des neurones V0 dans l'alternance bilatérale.
(A) L'animal se déplaçant dans un couloir transparent est filmé, et les mouvements des membres inférieurs recueillis et analysés. La perte complète des neurones V0 entraîne des mouvements anormalement synchronisés. (B) Les croisements de la lignée Dbx1$^{loxP\text{-}stop\text{-}loxP\text{-}DTA}$ avec diverses lignées Cre conduisent à l'élimination complète des neurones V0 dans la moelle épinière. Issue de Bouvier 2014.

Une série travaux s'est fixée comme objectif de mieux caractériser les types de CINs du GPC impliqués dans l'alternance gauche/droite. Au cours d'une activité locomotrice fictive, 80% des CINd présentent une activité rythmique. En revanche, les CINad déchargent de manière tonique, ce qui les exclut d'un tel impact fonctionnel. La délétion des interneurones

V3 n'affecte pas l'alternance gauche-droite, mais provoque une démarche instable chez la souris. De même, la locomotion fictive enregistrée sur moelle épinière isolée est déséquilibrée et moins robuste (Zhang et al., 2008).

2. Le générateur du rythme locomoteur

À partir des différentes expériences décrites précédemment, plusieurs critères ont émergé. Les neurones sous-jacents à la genèse du rythme locomoteur doivent être localisés au niveau de la région ventro-médiane de la moelle épinière et présenter une activité rythmique pendant la locomotion. De plus, le blocage ou la délétion des différentes populations inhibitrices affecte le rythme locomoteur mais ne l'abolit pas (Gosgnach et al., 2006). De ce fait le berceau de l'émergence du rythme locomoteur doit résider dans une ou plusieurs groupes d'interneurones excitateurs (Kiehn, 2016). Les neurones V0c, V3, V2a, Shox2 et Hb9 répondent à ces critères.

Les interneurones V0c expriment le facteur de transcription Pitx2 et sont de nature cholinergique. Au niveau de leur projection, ils sont ipsilatéraux ou commissuraux et sont à l'origine des boutons cholinergiques C que l'on retrouve au niveau des motoneurones (Figure 23) (Zagoraiou et al., 2009). Leur inactivation n'altère pas le rythme locomoteur mais réduit en revanche l'amplitude de la sortie locomotrice (Zagoraiou et al., 2009 ; Nascimento et al., 2020). Leur implication dans la genèse du rythme locomoteur est alors exclue.

Les interneurones commissuraux V3 expriment le facteur de transcription Sim et sont de nature glutamatergiques (Zhang et al., 2008). Ces neurones forment des synapses sur les motoneurones mais également sur les cellules de Renshaw et les interneurones Ia (Figure 23). Leur inactivation affecte le rythme mais sans l'abolir (Zhang et al., 2008). De ce fait, les interneurones V3 ne sont pas impliqués dans la production du rythme mais apparaissent cependant jouer un rôle dans son maintien et sa régularité.

Les neurones V2a sont glutamatergiques, expriment le facteur de transcription Chx10 et projettent sur les segments ipsilatéraux voisins (Figure 23) (Al-Mosawie et al., 2007 ; Crone et al., 2008 ; Lundfald et al., 2007). Ils peuvent activer les interneurones V0v et exercent une régulation directe sur les motoneurones. Cette interaction leur permet de stabiliser le rythme locomoteur notamment à des fréquences de décharge élevés (Crone et al., 2008 ; Dougherty et Kiehn, 2010 ; Zhong et al., 2011). En résumé, les populations d'interneurones V0c, V3 et

V2a, bien que primordial dans le rythme locomoteur, leur délétion ne suffit pas à supprimer le rythme locomoteur.

Une étude en 2013 met en lumière une population d'interneurones exprimant le facteur de transcription Shox2 qui apparait être impliqué dans le processus de rythmogenèse (Dougherty et al., 2013). Le facteur de transcription Shox2 est également exprimé dans partie des interneurones V2a. Il existe donc trois différentes sous-populations : les V2a- Shox2+, les V2a+ Shox2+ et les V2a Shox2- (Figure 23). Si l'ensemble des interneurones Shox2+ sont inhibées le rythme est perturbé tout comme la coordination motrice. De manière plus spécifique, une ablation des interneurones V2a+ Shox2+ influe uniquement sur l'amplitude de la sortie motrice (Dougherty et al., 2013). Dans cette idée, il apparait alors qu'uniquement les interneurones V2a- Shox2+ prennent part au rythme locomoteur. Cependant, encore une fois, bien qu'affecté le rythme locomoteur subsiste. Plusieurs hypothèses subsistent, soit une population encore inconnue est responsable de l'émergence du rythme soit il y a une redondance fonctionnelle au sein du GPC locomoteur.

Dans cette dynamique, une sous-population d'interneurones, les Hb9, qui a d'ailleurs suscité notre intérêt dans une de nos études (Barbay et al., 2023), se situe autour du canal central et présente une activité rythmique lors de la locomotion (Figure 23) (Hinckley et al., 2005 ; Wilson et al., 2005 ; Caldeira et al. 2017). Les interneurones Shox2 et Hb9 présentent des propriétés cellulaires et des connexions appropriées à la genèse du rythme locomoteur (Brocard et., 2010 ; Butt et Kiehn, 2003 ; Dougherty et al., 2013 ; Wilson et al., 2005). En effet, ces interneurones ont la capacité de générer des activités autorythmiques qui persiste en absence de transmission synaptique (Kiehn et al., 1996 ; Tazerart et al., 2008 ; Wilson et al., 2005). Ces propriétés sont dites « pacemaker » et déchargent en bouffées de potentiel d'action avec une fréquence équivalente à celle de la marche (Brocard et al., 2010). De ce fait, des études suggèrent une contribution active de ces cellules dans la production du rythme locomoteur (Caldeira et al.,2017 ; Drouillas et al.,2023).

Une étude récente ajoute une nouvelle dimension en identifiant le tractus cerebello-spinal comme un acteur clé du réseau locomoteur. En effet, les neurones ventraux de ce tractus possèdent des propriétés rythmogéniques et peuvent être activés électriquement ainsi que par les collatérales des motoneurones (Chalif et al., 2022). Leur activation optogénétique est suffisante pour initier la locomotion chez la souris nouveau-née, tandis que

leur inhibition supprime la locomotion chez la souris nouveau-née et la perturbe chez la souris adulte (Chalif et al., 2022).

De manière générale, ces activités autorythmiques sont maintenues grâce à un ensemble de conductances ioniques équilibrées. Lorsque ces conductances sont bloquées, le rythme locomoteur s'interrompt (Brocard, 2019 ; Tazerart et al., 2008).

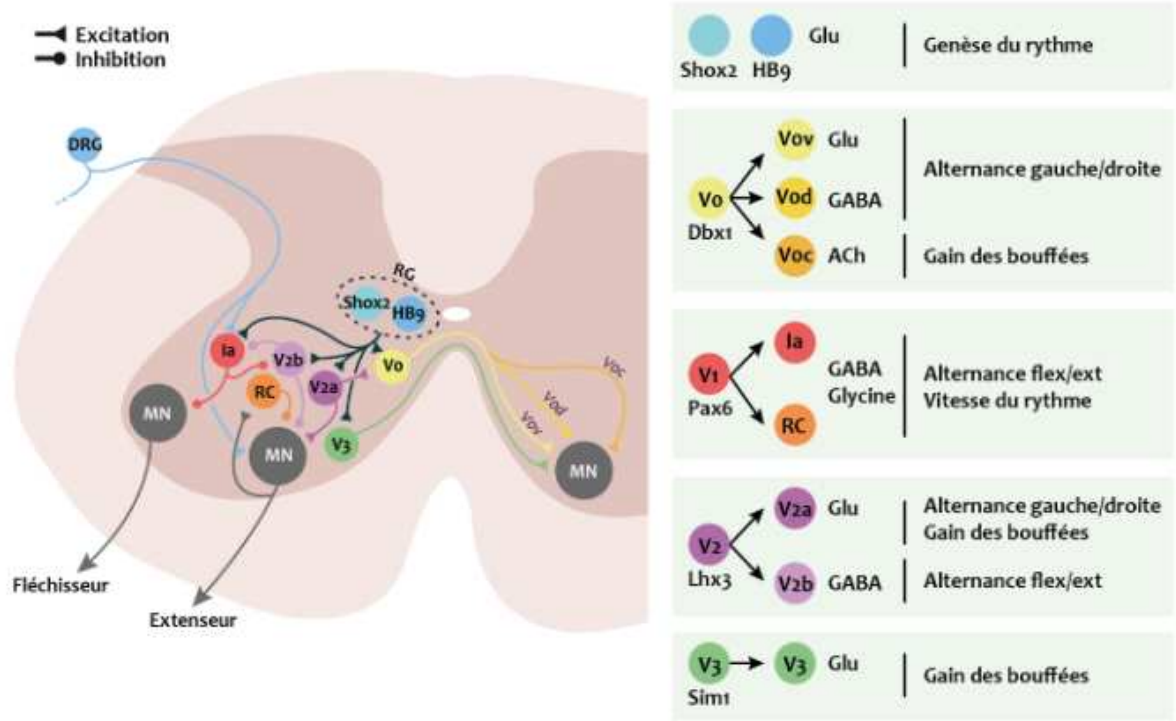


Figure 23 : Identification des interneurones du réseau locomoteur.
Représentation schématique des connexions entre les différents interneurones ventro-médians du réseau locomoteur spinal. Le rythme, généré par les interneurones non-V2a Shox2 + et Hb9, est diffusé aux quatre populations d'interneurones V0, V1, V2 et V3 qui affinent le patron locomoteur en agissant sur les motoneurones. Les paramètres de la locomotion affectés par chaque population sont résumés sur la droite. Chacune est définie par un facteur transcriptionnel ainsi que la nature de sa neurotransmission. DRG = Ganglion de la racine dorsal ; MN = Motoneurone ; RC = Cellule de Renshaw ; RG = Générateur du rythme locomoteur.

E. Les mécanismes cellulaires sous-jacents à la rythmogénèse

Cette capacité de certains neurones à décharger en bouffée de façon rythmique repose sur différentes propriétés. A l'échelle neuronale, une activité dite en bouffée, à l'opposé d'une activité dite tonique, est définit comme un regroupement de plusieurs potentiels d'action à haute fréquence surmontant un plateau de dépolarisation (Figure 24) (Kadala et al., 2015). Ces bouffées sont dites rythmiques lorsqu'elles se répètent dans le temps selon une certaine

périodicité. Nous allons voir ici les différents composants impliqués dans la régulation de ces bouffées rythmiques, substrat cellulaire de la locomotion.

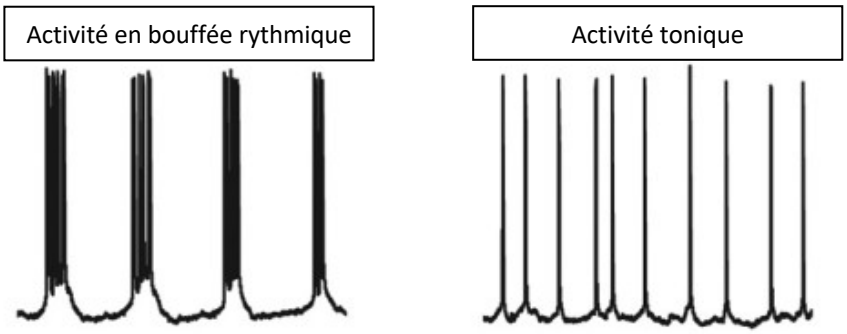


Figure 24 : Propriétés de décharge tonique *versus* bouffées rythmiques.
Enregistrement de type patch-clamp d'un interneurone ventromédian du GPC locomoteur illustrant deux types de pattern de décharges différents. A gauche un pattern de décharge en bouffée rythmiques face, à droite, à une activité dite tonique. Issue de Tazerart et al., 2008.

1. Couplage jonctionnel électrique et rythmogénèse

La transmission synaptique n'est pas le seul mécanisme de transmission au sein du SNC et certains neurones ont la capacité de se synchroniser au travers d'un couplage électrique reposant sur les jonctions gap (Bennett et Zukin, 2004 ; Long et al., 2002). De telles connexions sont notamment observées dans le réseau locomoteur, au niveau des interneurones Hb9, des CINd et des motoneurones (Hinckley et Ziskind-Conhaim, 2006 ; Walton et Navarrete, 1991 ; Wilson et al., 2007 ; Song et al. 2016). Elles permettent de propager et de stabiliser le rythme locomoteur. Ainsi, en absence de transmission synaptique la production de bouffées rythmiques est toujours possible grâce à la synchronisation au travers des jonctions gap (Tresch et Kiehn, 2000). Si ce couplage disparait chez les motoneurones au cours de l'âge, il persiste cependant au niveau des interneurones Hb9 du GPC locomoteur (Hinckley et Ziskind-Conhaim, 2006 ; Walton et Navarrete, 1991). Des travaux de l'équipe démontrent que près de la moitié de ces cellules dites « pacemaker » présentent un couplage par jonctions gap, permettant de synchroniser leurs activités autorythmiques et ainsi favorise l'émergence de la locomotion (Brocard et al., 2010 ; Tazerart et al., 2008). De plus, ce couplage électrique permet de modifier le mode de décharge des neurones non-pacemaker, favorisant une décharge en bouffées (Shevtsova et al., 2020). Enfin, ces connexions contribuent à stabiliser la fréquence de ces activités autorythmiques (Brocard et al., 2010 ; Shevtsova et al., 2020).

2. Les courants ioniques sous-jacents à la rythmogenèse

Plusieurs études ont montré que les propriétés intrinsèques de la membrane des neurones étaient cruciales pour la production de ce patron rythmique (Grillner et al., 2000 ; Marder et Bucher, 2001). En effet, les différents canaux ancrés à la membrane permettent l'influx et/ou l'efflux de conductance ionique clé dans l'apparition de bouffée rythmique.

• Le courant sodique persistant (I_{NaP})

Les canaux sodiques dépendant du voltage (Na_v) sont à la base de l'excitabilité des cellules du système nerveux, permettant le passage des ions Na^+ dans la cellule et générant ainsi des PAs le long de l'axone. Pendant les canaux s'ouvrent, le Na^+ traverse la membrane de manière transitoire (1 à 2 millisecondes) avant qu'ils ne se désactivent. Ce phénomène est appelé courant transitoire (I_{NaT}), contrairement à une faible proportion de canaux (1 à 2%) qui restent actifs, produisant un courant sodique persistant (I_{NaP}) (Cummins et al., 1994).

De façon intéressante, le blocage pharmacologique de I_{NaP} par le riluzole abolit le patron autorythmique des cellules pacemaker du GPC locomoteur, les faisant passer à une décharge tonique (Tazerart et al., 2008). De plus, l'application de riluzole lors d'expériences de locomotion fictive perturbe le rythme locomoteur ce qui souligne le rôle crucial de I_{NaP} dans la rythmogenèse du rythme locomoteur (Ryczko et al., 2010 ; Song et al., 2020 ; Svensson et al., 2017 ; Tazerart et al., 2007 ; Tong et McDearmid, 2012 ; Zhong et al., 2007).

Des travaux récents de l'équipe ont démontré qu'I_{NaP} est principalement porté par les canaux Nav1.1 et Nav1.6, responsables de la quasi-totalité d'I_{NaP} au niveau des interneurones ayant des propriétés auto-rythmiques (Drouillas et al., 2023). En accord avec ces résultats, des approches génétiques et pharmacologiques ont confirmé le rôle clé de I_{NaP} au niveau de l'émergence des propriétés autorythmique au niveau du GPC locomoteur (Drouillas et al., 2023). Une démonstration similaire a été faite au niveau du GPC respiratoire la même année (Da Silva Jr. et al., 2023).

• Le courant K^+ I_M

Le principe général de la rythmogenèse requiert une repolarisation du neurone afin de mettre fin à la décharge en bouffée (Harris-Warrick, 2010). De ce fait, les conductances K^+ sortantes sont des candidates idéales pour contrer la conductance I_{NaP} et mettre fin à la

bouffée de PA. Les travaux de l'équipe ont montré que le courant K^+ I_M, module l'excitabilité des neurones pacemaker du GPC locomoteur (Verneuil et al., 2020). De plus, le blocage pharmacologique de cette conductance induit des bouffées autorythmiques dans ces neurones, impacte la locomotion fictive et réduit la vitesse du rythme locomoteur *in vivo* chez la souris et le rat (Verneuil et al., 2020). De façon intéressante, la potentialisation de cette conductance produit les effets inverses sur les mêmes préparations ; *in vivo*, la vitesse du rythme locomoteur est augmentée (Verneuil et al., 2020). Une investigation plus approfondie a révélé que les canaux Kv7.2 constituent le substrat protéique de cette conductance K^+ et qu'elle fonctionne en tandem avec I_{NaP} (Verneuil et al., 2020). En effet, le blocage pharmacologique de I_M potentialise la conductance I_{NaP} ce qui entraine l'émergence de bouffée rythmiques.

- Le courant cationique entrant non sélectif activé par le calcium (I_{CAN}).

Cette conductance cationique entrante non sélective (I_{CAN}), majoritairement perméable au sodium, est activée suite à la mobilisation du Ca^{2+} provenant des stocks intracellulaires (Bos & Drouillas et al., 2021 ; Launay et al., 2002 ; Ullrich et al., 2005). Cette conductance I_{CAN} est décrite comme étant responsable de long plateaux dépolarisants observés dans les bouffées rythmiques t de différents types cellulaires (Bos & Drouillas et al., 2021 ; Bal et McCormick, 1993, Zhang et al., 1995). Plusieurs études ont démontré le rôle de I_{CAN} dans les bouffées rythmiques au sein de différentes structures allant du noyau réticulé thalamique chez le cochon d'inde (Bal et McCormick, 1993), motoneurones des ganglions cardiaques du crabe (Ransdell et al., 2013) et dans certains neurones du système respiratoire du complexe de Pré-Bötzinger (Pace et al., 2007 ; Pena et al., 2004). Des études de modélisation computationnelle ont appuyé le rôle de I_{CAN} dans les bouffées rythmiques (Rubin et al., 2009). Plus récemment, l'équipe a démontré au niveau des motoneurones, que les canaux trpm5 constituent le principal substrat moléculaire de I_{CAN} (Bos & Drouillas et al., 2021).

- Le courant de rebond activé par l'hyperpolarisation (I_h)

Le PA se compose de plusieurs phases distinctes : la dépolarisation mettant en jeu les ions Na^+, la repolarisation faisant appel à aux ions K^+, et enfin la phase d'hyperpolarisation. Dans le contexte des bouffées rythmiques un mécanisme spécifique est nécessaire afin de

permettre la récurrence de ces bouffées. En effet, un courant est nécessaire pour permettre de générer le prochain plateau dépolarisant. Le courant activé par l'hyperpolarisation, *aka* I_h, répond à tous ces critères. Il est activé par l'hyperpolarisation à la suite d'une bouffée et induit une rampe de dépolarisation qui conduit à la prochaine bouffée.

Des travaux princeps chez la salamandre ont démontré que le blocage pharmacologique de I_h affecte la décharge rythmique en augmentant la durée des phases d'hyperpolarisation (Chevalier et al., 2006). Au sein du GPC masticateur, une autre étude suggère que le blocage pharmacologique d'I_h augmente la fréquence des bouffées rythmiques et diminue la durée des plateaux sans les abolir (Brocard et al., 2006). Plus récemment, il a été démontré que le courant Ih des neurones ventraux du tractus cerebello-spinal est suffisant pour abolir le comportement locomoteur chez des souris nouveau-né et fortement le perturber chez des souris adultes (Chalif et al., 2022).

L'ensemble de ces travaux suggère une redondance fonctionnelle des différents canaux ioniques pour permettre l'émergence de bouffée rythmiques nécessaires à une locomotion fonctionnelle. Il en découle aussi que les variations d'ions de part et d'autre de la membrane constitue des éléments clés dans l'émergence du rythme locomoteur.

3. Base ionique de la rythmogénèse

L'amplitude des courants décrits précédemment dépend fortement du gradient de concentrations des ions impliqués dans chaque conductance. Il est donc crucial d'examiner l'impact même des ions en lien avec la rythmogénèse pour identifier leur rôle dans le comportement locomoteur. Dans cette section, l'effet de différents ions sur les bouffées rythmiques neuronales sera décrit. L'ensemble des ions ne sera pas couvert, non pas en raison d'une potentielle absence d'implication dans ce processus, mais simplement par manque d'études disponibles.

• Le chlore extracellulaire $(Cl^-)_e$

Des travaux de 2001 ont observé un effet de la $[Cl^-]_e$ sur l'émergence de bouffée rythmique sur des neurones Retzius. En effet, la décharge tonique de ces neurones a été remplacée par une décharge en bouffées rythmiques suite à une baisse de $[Cl^-]_e$ (>1mM) (Beck et al., 2001). D'après les auteur.e.s, cette baisse de $[Cl^-]_e$ induirait une potentialisation de I_{NaP}, favorisant l'émerge de ces bouffées, car celles-ci sont abolies lorsque les canaux sodiques sont

bloqués (Beck et al., 2001). D'autres études corroborent ces résultats au niveau de l'hippocampe de rats, où des bouffées rythmiques sont également induites par une baisse de $[Cl^-]_e$ (Hochman et al., 1999 ; Avoli et al., 1990). De façon concomitante à l'apparition de ces bouffées rythmiques, une hausse du Ca^{2+} intracellulaire synchrone avec les bouffées a été observée (Beck et al., 2001). D'autres études indiquent qu'une baisse du $(Ca^{2+})_e$ survient parallèlement à des diminutions de la $[Cl^-]_e$ (Heinemann et al. 1992). Ces éléments suggèrent un effet synergique du Cl^- et du Ca^{2+} sur l'émergence du rythme locomoteur par le biais d'I_{NaP}.

- Le sodium extracellulaire $(Na^+)_e$

Une bouffée rythmique étant composé de potentiels d'actions (PA), il apparait évident que le Na^+, composant majeure de l'initiation du PA et substrat de I_{NaP}, porte une place importante. Dans cette logique, une étude des années 1996 montre qu'une baisse de la $[Na^+]_e$ substitué par de la choline induit une diminution des bouffées jusqu'à leur suppression au sein des neurones supraoptiques de rat adulte (Li et Hatton, 1996).

- Le calcium extracellulaire $(Ca^{2+})_e$

L'impact du Ca^{2+} sur le patron de décharge englobe un grand nombre d'études. Plusieurs travaux indiquent qu'une baisse artificielle entraine de la $[Ca^{2+}]_e$ entraine des bouffées rythmiques dans un grand nombre de structures du SNC incluant la moelle épinière (Brocard et al., 2013 ; Drouillas et al., 2023 ; Verneuil et al., 2020 ; Barbay et al., 2023), l'hippocampe (Su et al., 2001), le noyau supraoptique (SON) (Li et Hatton, 1996), le GPC respiratoire (Del Negro et al., 2002a ; Onimaru et al., 1995) ainsi que dans le GPC masticateur (Morquette et al., 2015).

Dans ce même CPG, il at également été démontré qu'un aCSF dépourvu de Ca^{2+} entraine des bouffées rythmiques spontanées (Brocard et al., 2006 ; Tsuruyama et al., 2013). De manière intéressante, des mesures des $[Ca^{2+}]_e$ à l'aide d'électrodes sensibles au Ca^{2+} montrent que lors de la mise en place d'une locomotion fictive, la $[Ca^{2+}]_e$ diminue, précédant même l'apparition des bouffées rythmiques (Figure 25) (Brocard et al., 2013). Cette diminution de 1.2 mM à 0.9 mM apparait alors essentielle dans l'émergence du rythme

locomoteur sur moelle épinière isolée. Toutefois, cette concentration de $[Ca^{2+}]_e$ à elle seule ne suffit pas à déclencher des bouffées rythmiques (Tazerart., 2008).

Sur le plan mécanistique, la corrélation entre la baisse de la $[Ca^{2+}]_e$ et l'émergence de bouffées rythmique est expliqué par l'activation d'I_{NaP}. En effet, plusieurs études démontrent que la déplétion en Ca^{2+} extracellulaire déplace l'activation d'I_{NaP} vers des potentiels de membrane plus hyperpolarisés, augmentant ainsi son amplitude (Li et Hatton, 1996 ; Tazerart et al., 2008). Ces observations sont également confirmées par des approches computationnelles, où un simple changement de seuil d'activation d'I_{NaP} suffit à induire une décharge de type rythmique (Brocard et al., 2013).

En revanche une hausse de 4 à 6 mM de la $[K^+]_e$ est également observée au cours de la locomotion fictive sur moelle épinière isolée (Figure 25) (Brocard et al., 2013).

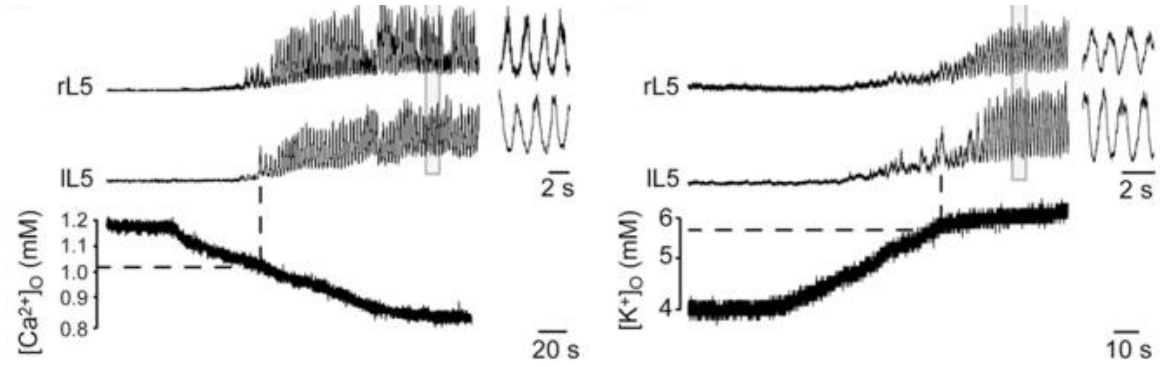


Figure 25 : Mesure des variations de concentrations extracellulaire en Ca^{2+} et K^+ au cours de la locomotion fictive sur moelle épinière isolée.
En haut à gauche et droite, des électrodes de succion enregistrent l'activité extracellulaire de la sortie motrice au niveau des racines ventrales L5 sur moelle épinière isolée. En bas à gauche et droite, en parallèle, des électrodes sensibles aux ions K^+ et Ca^{2+} sont placés dans la moelle épinière afin de corréler les variations de concentrations ioniques sous-jacent à la mise en place de la locomotion fictive. Cette expérience montre que les variations de concentration en Ca^{2+} et K^+ aboutissent à la mise de la locomotion fictive.

Si cette concentration en $[K^+]_e$ est maintenue et combinée au $[Ca^{2+}]_e$ mesurée au cours de la locomotion fictive, cela permet d'induire des bouffées rythmiques au niveau des interneurones ventromédian du GPC locomoteur (Figure 26) (Brocard et al., 2013). Cela suggère qu'une synergie entre le Ca^{2+} et le K^+ extracellulaire est nécessaire pour l'émergence de la rythmogénèse.

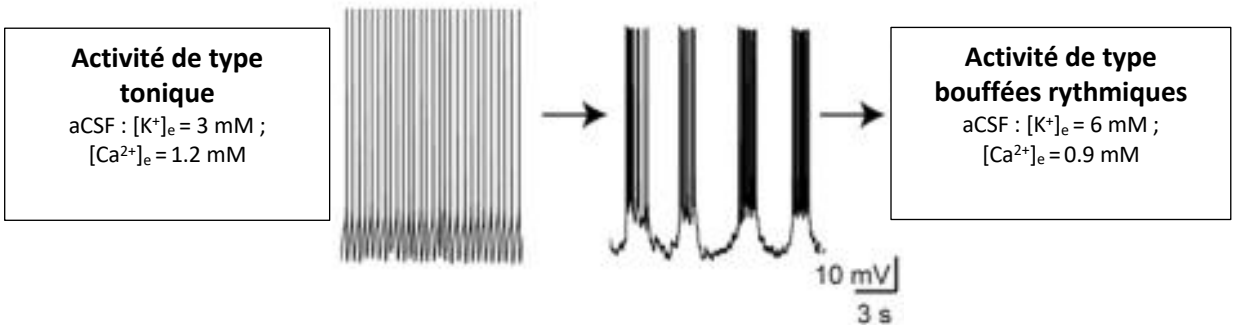


Figure 26 : Influence des concentrations extracellulaires en Ca^{2+} et K^+ sur le pattern de décharge.
Les concentrations extracellulaires mesurées en Ca^{2+} et K^+ dans les expériences figure 25 suffisent à induire des bouffées rythmiques au sein des interneurones ventromédian du GPC locomoteur. En effet le passage de 1.2mM à 0.9mM en $(Ca^{2+})_e$ et de 4mM à 6mM en $(K^+)_e$ permettent de passer d'une activité tonique à bouffées rythmiques, le pattern sous-jacent de la locomotion.

- Importance du potassium $(K^+)_e$ extracellulaire dans la rythmogénèse

Une étude révèle que l'apparition de bouffées rythmiques coïncident avec augmentation de la $[K^+]_e$ à des valeurs entre 6mM et 8mM pendant une expérience de locomotion fictive (Marchetti et al., 2001). D'autres études corroborent cette observation, démontrant également le lien étroit entre hausse de la $[K^+]_e$ et l'émergence des bouffées rythmiques au niveau de la médulla ventrolatérale en lien avec l'activité respiratoire du chat (Richter et al., 1978), lors de la nage fictive de la lamproie (Wallen et al., 1984) ainsi que pendant les oscillations lentes du sommeil (Amzica et Steriade, 2000). Cependant, il reste incertain si cette augmentation est une conséquence ou une cause de l'émergence de bouffées rythmiques.

Dans ce contexte, une étude montre bien que si l'augmentation de $[K^+]_e$ précède l'apparition des bouffées rythmiques, elle ne suffit pas à elle seule pour induire des oscillations au sein du GPC locomoteur (Brocard et al., 2013). À contrario, d'autres études révèlent qu'une augmentation seule de la $[K^+]_e$ est suffisante pour induire l'émergence de bouffée rythmiques. En effet, une hausse de 4.5mM à 8mM serait responsable de l'apparition de ces bouffées (Bracci et al., 1998). En revanche, comme expliqué dans la section précédente, la $[K^+]_e$ est étroitement associée à la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$, favorisant ainsi l'émergence des bouffées rythmiques.

Bien que le K^+ seul n'apparait pas être un prérequis absolu à l'émergence de bouffées rythmiques, il apparait en revanche indispensable pour le maintien de leur fréquence. Lors

d'une expérience de locomotion fictive, une concentration de $[K^+]_e$ initialement bénéfique (4.5mM à 8mM), devient perturbatrice lorsque celle-ci atteint des niveaux plus élevés (12.5 mM), entrainant une perturbation croissante du rythme locomoteur jusqu'à sa disparition complète (Figure 27) (Bracci et al., 1998). Cela suggère fortement que des mécanismes de régulations de $[K^+]_e$ sont cruciaux pour maintenir un rythme locomoteur fonctionnel.

Sur le plan mécanistique, l'augmentation de $[K^+]_e$ induit une dépolarisation du neurone, facilitant l'émergence de bouffées par le biais du plateaux dépolarisants. De plus, il est probable qu'une hausse de la $[K^+]_e$ diminue l'amplitude du courant I_M, potentialisant ainsi I_{NaP} et favorisant l'émergence de bouffées rythmiques. Cette hypothèse est renforcée par des travaux ayant démontré qu'une augmentation de $[K^+]_e$ accroît l'amplitude de I_{NaP} dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Somjen et Muller, 2000). Cependant, ce résultat n'a pas été reproduit au sein des neurones « pacemaker » Hb9 du GPC locomoteur (Brocard et al., 2013). En effet, l'enregistrement de I_{NaP} à différentes concentrations de K^+ n'a montré aucune perturbation de son amplitude (Brocard et al., 2013).

Les astrocytes étant un acteur clé dans la régulation ionique du SNC, ils apparaissent alors possèder un rôle important dans l'émergence et le maintien de la rythmogénèse.

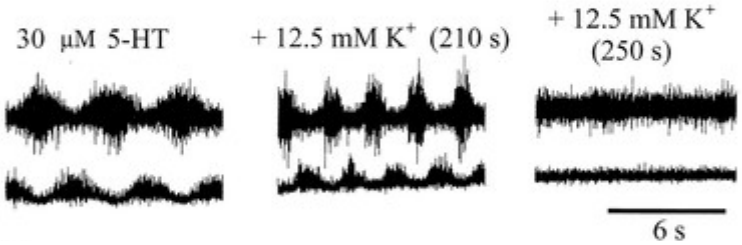


Figure 27 : Effet de la concentration extracellulaire en K^+ sur la locomotion ficitve.
La locomotion fictive est induite pharmacologiquement par la sérotonine (5-HT) et enregistrée au niveau des racines ventrales L5 gauche et droite. L'augmentation en concentration extracellulaire de K^+ vient augmenter la fréquence des bouffées avant de les abolir au profit d'une activité tonique soutenue. Issue de Bracci et al., 1998

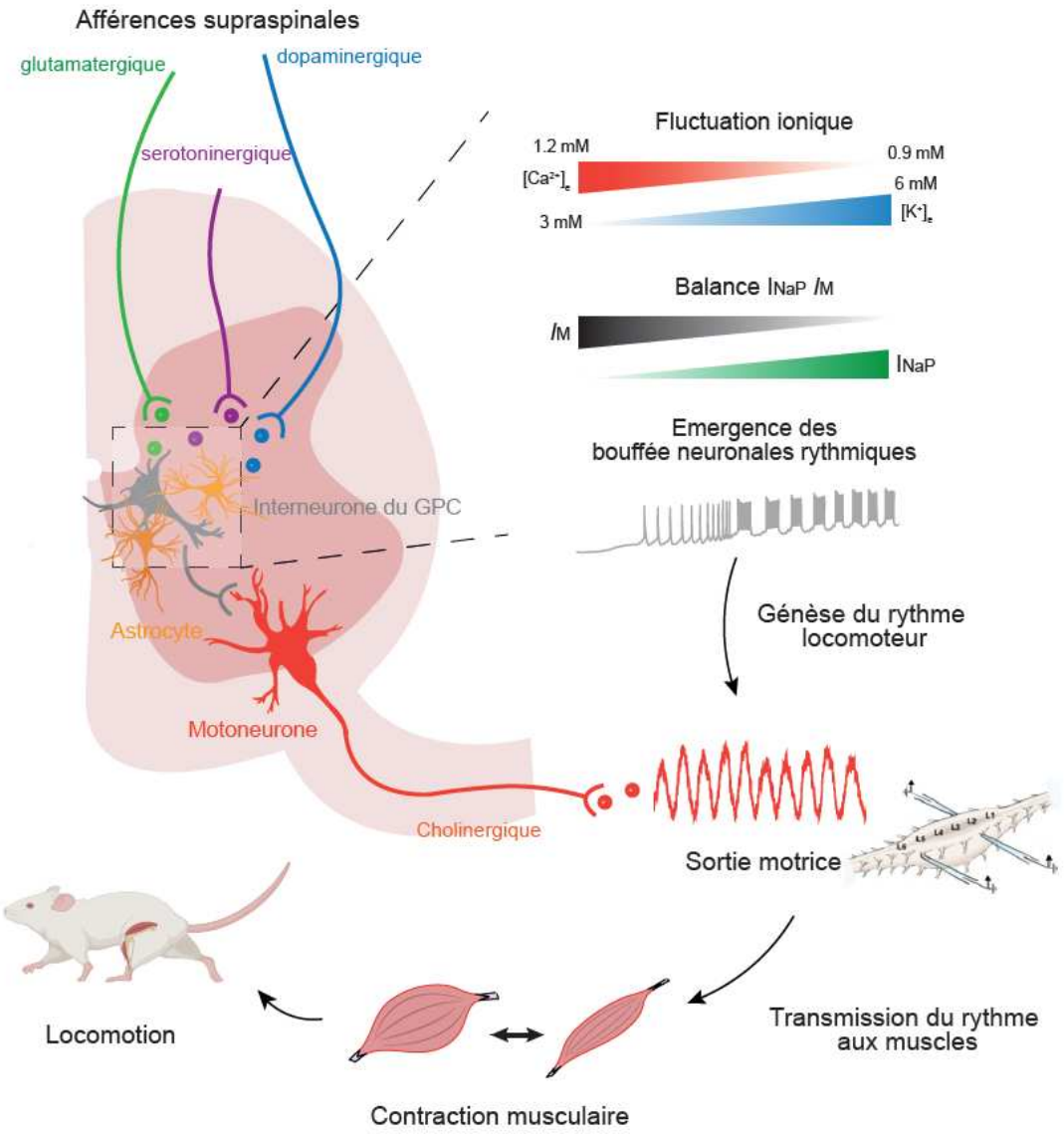


Figure 28 : Émergence de la locomotion, de la base ionique à la contraction musculaire.
Schéma illustrant les afférences supraspinales (vert, violet et bleu) sur le GPC locomoteur contenant des interneurones (gris) ainsi que les astrocytes (orange). Le motoneurone (rouge) reçoit les afférences du GPC et innerve les muscles pour générer la sortie motrice, que l'on peut enregistrer en expérience de locomotion fictive. Au niveau mécanistique, il est établi qu'une diminution de la $[Ca^{2+}]$ concomitante avec une hausse de la $[K^+]$ couplé à une potentialisation de I_{NaP} permet la genèse du rythme locomoteur. Les motoneurones intègrent le rythme généré par le GPC et permet la contraction musculaire adaptée pour générer une locomotion fonctionnelle.

4. Implication fonctionnelle des astrocytes dans la rythmogénèse

Les activités rythmiques sont sous-jacentes à un grand ensemble d'activités motrices comme la respiration, la locomotion ou encore la mastication. Bien que la circuiterie neuronale responsable de l'émergence des bouffées rythmiques soit désormais bien comprise, la découverte des astrocytes en tant qu'intégrateurs et modulateurs de la

transmission synaptique et de l'activité neuronale remet en question le fonctionnement du réseau. En effet, plusieurs études démontrent le rôle des astrocytes dans la modulation et la genèse des activités motrices rythmiques telles que la locomotion, la respiration, la mastication ou encore lors de certaines pathologies comme les tremblements (Broadhead et Miles., 2020 ; Mu et al., 2019 ; Morquette et al., 2015 ; Condamine et al., 2017 ; Carlsen et al., 2021 ; Gourine et al., 2010 ; Barbay et al., 2023).

- Modulation astrocytaire de la respiration

Une étude parue en 2010, démontre que les astrocytes modulent la respiration chez le rat anesthésié. En effet, l'activation optogénétique spécifique dans les astrocytes de la surface ventrale de la medulla oblongata (VS) chez le rat anesthésié, stimule la respiration à partir du relargage d'ATP par les astrocytes (Gourine et al., 2010). D'autres études démontrent qu'une dysfonction de la signalisation purinergique ou de la transmission vésiculaire des astrocytes du preBötC perturbe la réponse respiratoire dans des conditions d'hypoxie (Angelova et al., 2015 ; Rajani et al., 2018 ; Sheiknbahaei et al., 2018). De plus, le relargage d'ATP par les astrocytes active les récepteurs métabotropiques P2Y1 et stimule la respiration (Lorier et al., 2007 ; Rajani et al., 2018). Une autre étude propose un mécanisme encore plus précis, suggérant que les astrocytes du noyau rétrotrapézoïde (RTN) peuvent internaliser les canaux TRPA1, provoquant ainsi leur accumulation à la membrane plasmique (Uchiyama et al., 2020). Cette accumulation entraîne un flux important d'ions Ca^{2+} vers l'extérieur et le relargage d'ATP, déclenchant ainsi l'activité respiratoire (Uchiyama et al., 2020).

- Modulation astrocytaire de la locomotion

Les préparations de locomotion fictive sur moelle épinière isolée ont grandement permis de confirmer le rôle des astrocytes dans la modulation de l'activité locomotrice. D'une part, une étude a démontré que le relargage d'ATP, qui est hydrolysé en ADP, module la transmission synaptique inhibitrice et de ce fait réduit la fréquence des bouffés rythmiques locomotrice (Witts et al., 2012). Plus récemment, des travaux ont montré que les astrocytes spinaux augmentent leur activité calcique au cours d'une locomotion fictive ainsi que durant des bouffés rythmiques des interneurones du GPC induites pharmacologiquement (Broadhead et Miles, 2020 ; Barbay et al., 2023).

Plus précisément, un des projets de ma thèse, qui a fait d'objet d'une publication (voir section « résultats »), a permis de distinguer des sous-types astrocytaires actifs uniquement pendant ou avant l'émergence des bouffées rythmiques, suggérant une hiérarchie astrocytaire au sein du comportement locomoteur (Barbay et al., 2023). Si les astrocytes détectent l'émergence de la locomotion, ils sont également capables de la moduler en retour. Par exemple, l'activation optogénétique des astrocytes spinaux réduit la fréquence locomotrice de 10%, suggérant que les astrocytes jouent un rôle dans la régulation de la fréquence locomotrice (Broadhead et Miles, 2020). De manière paradoxale, un empoissonnement des astrocytes à l'aide de la gliotoxine fluoroacetate entraîne une augmentation de la fréquence de l'activité locomotrice (Witts er al., 2012), suggérant à nouveau une hiérarchie astrocytaires potentielles dans la locomotion. Dans chacune des études, la présence d'un bloqueur des récepteurs A1 abolit l'effet des astrocytes, impliquant ainsi l'ATP libéré par les astrocytes (Acton et Miles, 2015 ; Broadhead et Miles, 2020 ; Witts et al., 2012).

Pour conclure, l'un de mes projets a mis en évidence l'importance de l'homéostasie du K^+ via le canal astrocytaire Kir4.1 dans le maintien et l'émergence des bouffées rythmiques, tant *ex vivo* qu'*in vivo*. Ce mécanisme impacte le comportement locomoteur en influençant le patron locomoteur et les performances locomotrices chez la souris (Barbay et al., 2023). Une récente étude chez le zebrafish a également mis en lumière une forte implication des astrocytes dans la locomotion. En effet, les chercheur.e.s ont observé que lorsque des animaux sont placés dans un environnement de réalité virtuelle avec un *feedback* visuel correspondant à leur activité motrice, l'absence de ce *feedback* induit rapidement un état de passivité (Mu et al., 2019). L'imagerie cérébrale montre que l'activité des astrocytes dans certaines régions cérébrales augmente avant le début de la passivité. De plus, deux expériences montrent que l'activation des astrocytes est liée à ce changement de comportement : l'ablation des astrocytes empêche la passivité, et l'activation sélective des astrocytes suffit à déclencher la passivité (Mu et al., 2019). En résumé, cette étude suggère que les astrocytes du tronc cérébral jouent un rôle crucial dans le passage d'un état comportemental à un autre après l'intégration des informations sensorielles.

- Enquête au niveau du GPC masticateur d'une gliotransmission non conventionnelle : implication du S100β

Bien que les mécanismes impliquant les astrocytes dans des processus rythmiques restent parfois flous dans les études précédentes, une étude au sein du GPC masticateur propose un mécanisme innovant. Cette étude, réalisé au sein des circuits du noyau trigeminal, responsable de la mastication chez le rat, apporte des éclaircissements. Il a été mentionné précédemment dans cette thèse, qu'une diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ induit l'émergence de bouffées rythmiques. Cependant, les potentiels mécanismes pouvant expliquer cette diminution demeuraient encore mystérieux.

Cette étude propose alors que les astrocytes du GPC masticateur seraient capables d'une gliotransmission dite non conventionnelle en sécrétant une protéine chélatrice de Ca^{2+} : la S100β. L'induction de bouffées rythmiques au sein des interneurones est rendue impossible lorsque le syncytium astrocytaire est chélaté en Ca^{2+} à l'aide de BAPTA (Figure 29-B), suggérant l'implication d'une molécule relarguée, essentielle à l'émergence de bouffée rythmiques. Dans ces mêmes conditions, l'ajout de S100β exogène permet de restaurer l'apparition de bouffées rythmiques (Figure 29-C). L'ajout de riluzole (bloqueur de I_{NaP}) révèlera que le relargage de S100β par les astrocytes diminue la $[Ca^{2+}]_e$ ce qui potentialise I_{NaP} et induit ainsi des bouffées rythmiques (Morquette et al., 2015).

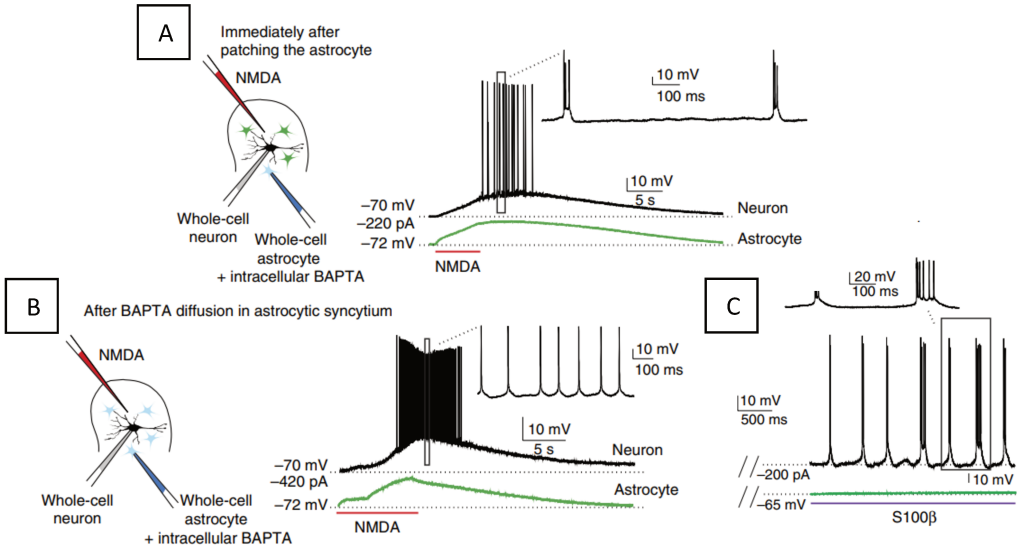


Figure 29 : : Le relargage de S100B par les astrocytes permet l'induction de bouffées rythmiques au niveau du GPC masticateur.

(A*) Un neurone du GPC masticateur est enregistré et des bouffées rythmiques sont induite par application de NMDA. (B) Dans ces conditions un astrocyte adjacent est enregistré et du BAPTA, un chélateur calcique est diffusé*

au sein du syncytium astrocytaire ce qui empêche l'émergence des bouffées rythmiques. (C) L'ajout de S100B, permet alors de restaurer l'apparition des bouffées rythmiques.

- Implication du couplage astrocytaire au niveau du GPC masticateur

Une étude menée par le même groupe sur la même structure neuronale a révélé un autre élément suggérant le rôle actif des astrocytes dans l'émergence de la rythmicité. En utilisant des enregistrements intracellulaires de type 'patch-clamp' sur les astrocytes, combinés avec le marquage du 'syncytium' astrocytaire par la biocytine, il a été démontré que le couplage astrocytaire est restreint dans des conditions de repos, mais augmente considérablement lorsque des bouffées rythmiques sont induites pharmacologiquement (Condamine et al., 2017). De plus, un blocage pharmacologique spécifique des jonctions gaps et des connexines 43 perturbe fortement les bouffées rythmiques induites par l'application de NMDA (Figure 30), mais pas celles induites par le S100β (Condamine et al., 2017). Cela suggère que les bouffées rythmiques induites par le S100β fonctionnent indépendamment du couplage astrocytaire et reposent donc sur des mécanismes différents.

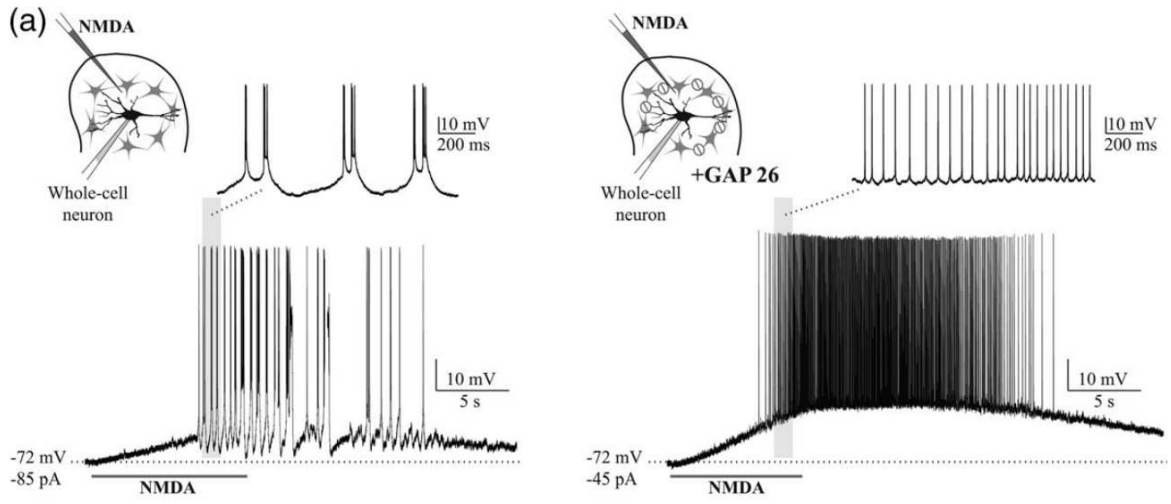


Figure 30 : : Le syncitium astrocytaire permet l'émergence des bouffées rythmiques.
A droite, l'application de NMDA au niveau de neurone du GPC masticateur permet d'induire des bouffées rythmiques. A gauche, l'application d'un bloqueur des connexines 43 (GAP26) affecte l'émergence des bouffées rythmiques induite par le NMDA.

F. La sortie motrice : les motoneurones

Si le GPC locomoteur, comportant une grande variété d'interneurones, est essentiel à la production d'un rythme, un autre type de neurones est nécessaire pour provoquer la contraction musculaire et permettre une locomotion fonctionnelle des membres postérieurs. En effet, les interneurones du GPC locomoteur sont directement connectés aux motoneurones (MNs) qui eux même innervent les différents muscles des membres postérieurs. Le MN intègre l'ensemble des commandes motrices avant de les transmettre à leur cible musculaire. C'est la voie finale commune selon Sir Charles Scott Sherrington. Le MN est la cellule qui possède le plus grand axone du SNC, avec une longueur pouvant atteindre jusqu'à 1.5 mètre chez l'humain. Son anatomie cellulaire est adaptée à son rôle crucial d'intégrateur avec une arborisation dendritique pouvant atteindre 1 millimètre de diamètre au niveau de la moelle centrale chez la souris. Au niveau anatomique, chez les mammifères, le MN innerve plusieurs fibres musculaires d'un même muscle et qu'une fibre musculaire est innervée que par un seul motoneurone (Liddell et Sherrington, 1925 ; Redfern, 1970 ; Van Essen et al., 1990). L'ensemble formé par un MN ainsi que de la totalité des fibres musculaires qu'il innerve constitue ce que l'on nomme : unité motrice (UM).

1. Les différents sous types de motoneurones

Il est important de noter que plusieurs types de MNs existent. On retrouve d'abord, les MNs gamma (γ) qui innervent les fibres intrafusales (Figure 31) sensibles à la variation de longueur du muscle (Manuel et Zytnicki, 2011). Puis les MNs alpha (α) qui innervent les fibres dites extrafusales (Figure 31) dont la contraction est à l'origine du mouvement (Manuel et Zytnicki, 2011). Chaque type de MN va venir innerver des types spécifiques d'unité motrice.

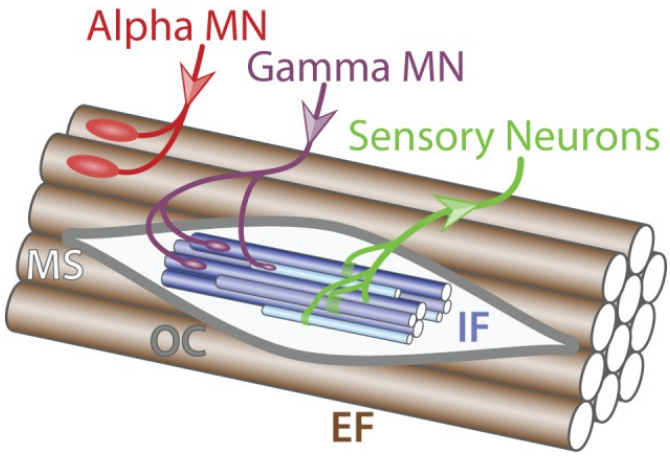


Figure 31 : Innervation musculaire.
Schéma des fibres musculaires sur la coupe longitudinale (adapté de Purves et Williams, 2004). Le MN alpha (rouge) innerve (flèche entrante) les fibres musculaires extrafusales (EF, marron) tandis que le MN gamma (violet) se connecte aux fibres intrafusales (IF, bleu) au sein du fuseau musculaire (MS, gris clair) entouré de la capsule externe (OC, gris foncé). Les neurones sensoriels (verts) transmettent lels informations des fibres intrafusales au système nerveux central (flèche sortante). Issue de Stifani, 2014.

2. Les différents types d'unités motrices

Au sein des MNs (α), on trouve 3 types d'unités motrices différentes, différenciées par la vitesse de contraction de leurs fibres musculaires et leur capacité à maintenir une contraction prolongée (Burke et al., 1971). Les unités motrices « Fast Fatigable » (FF) se caractérisent par une contraction rapide et forte, mais se fatiguent rapidement. Elles sont recrutées lors d'efforts nécessitant des contractions musculaires intenses et de courte durée. Les unités motrices « Fast Resistant » (FR) se contractent moins rapidement que les FF, peuvent produire un effort relativement intense et se fatiguent plus lentement, étant recrutées pour des contractions modérément intenses et de durée moyenne. Enfin, les unités motrices « Slow » (SFR), se contractent lentement mais peuvent maintenir une contraction pendant de longue durée.

Bien qu'il soit encore flou, un critère de taille permet de différencier ces MNs. La taille des somas ainsi que le diamètre de l'axone varient en fonction du nombre de fibres musculaire innervées. De ce fait, les MNs issus des fibres SFR ont des petits somas et un diamètre axonal réduit comparé à leurs homologues issus des fibres FFR, eux même plus petits que les MNs issus des fibres FF. Malheureusement il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique afin de différencier les sous types de MNs (α). Cependant, la métalloprotéinase-9 (MMP9) est fortement exprimée dans les gros par rapport aux petits. Ces MNs MMP9+ seraient donc plus susceptibles d'être issus de fibres de type FF. A l'inverse, les petits MNs, eux, expriment le

récepteur lié aux œstrogènes β (ERRβ) et seraient plus susceptibles d'être des SFR (Leroy et al. 2014).

Actuellement, l'unique moyen à ce jour de discriminer les sous-types de MNs est d'utiliser une combinaison de marqueurs MMP9, choline actéyltransférase (ChAT) et NeuN. Les MNs étant MMP9+, ChAT+ et NeuN+ sont des MNs (α) de type FF. Les MNs étant MMP9-, ChAT+ et NeuN+ sont des MNs (α) de type SFR alors que les MNs exprimant uniquement la ChAT sont de type (γ) (Kelley et al., 2018). En termes de signature électrophysiologique, les MNs (α) FF présentent une décharge retardée et soutenue en réponse à un bref courant dépolarisant alors que les MNs (α) SFR eux présentent une décharge immédiate et courte (Leroy et al., 2014 : Manuel et Zytnicki 2019 ; Harris-Warrick et al., 2024).

Chez les mammifères, chaque muscle possède ces 3 types différents d'unité motrices en proportions variables. Chez le chat par exemple, le *gastrocnemius* est constitué des trois types d'unités motrices en proportion équivalentes alors que le *soleus* se compose majoritairement des unités motrices de type SFR (Mephedran et al., 1965b). Cependant, il est à noter que ces proportions au sein d'un même muscle ne sont pas toujours similaires entre les espèces. Par exemple, le *soleus* chez la souris, est constitué d'unités motrices de type SFR et de type FFR (Hegedus et al., 2007).

3. Les différents types de fibres musculaires

En parallèle de l'hétérogénéité des unités motrices, on distingue 3 types de fibres musculaires (Burke et al., 1971). On retrouve les fibres de type I, IIA et IIB qui sont respectivement innervées par les unités motrices de type SFR, FFR et FF (Figure 32) (Burke et al., 2007). Chaque unité motrice contient un nombre différent de fibres musculaires. Ce nombre est faible chez les SFR et croit des FFR au FF.

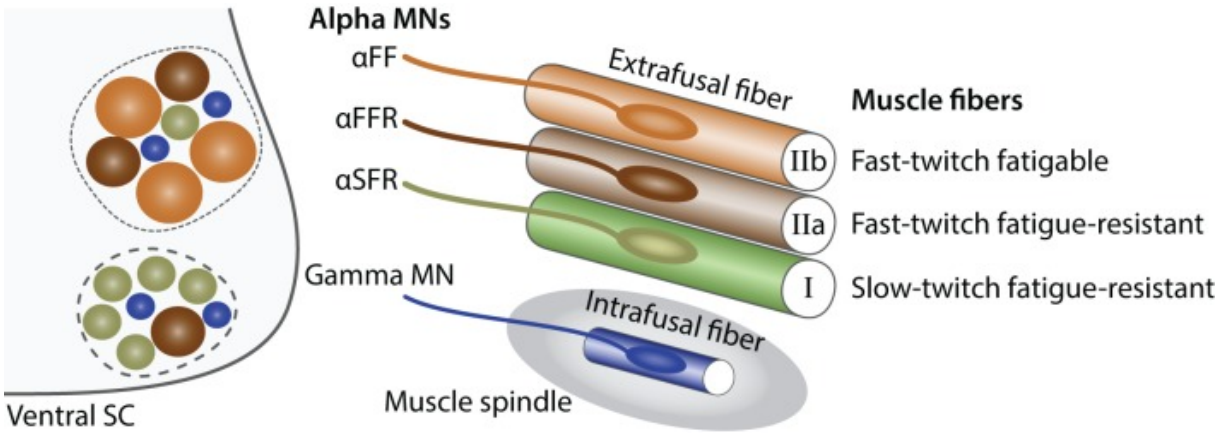


Figure 32 : Caractéristiques des MNs alpha et gamma.

Schéma montrant les principales caractéristiques des MNs (α) et (γ) (adapté de Kanning et al., 2010). Au sein de la moelle épinière ventrale (SC gris clair), les pools de MN (lignes pointillées) sont composés de MNs (γ) (bleu) ainsi que de trois types de MNs (α): αFF (marron clair), αFFR (marron foncé), αSFR (vert). Les MNs (α) ont un diamètre plus important que les MNs (γ). La proportion de sous-types de MN (α) varie d'un groupe de MN à l'autre. En périphérie, un muscle est composé de trois types de fibres extrafusales : les fibres musculaires fatigables à contraction rapide (marron clair, IIb) sont innervées par des MN αFF, les fibres musculaires résistantes à la fatigue à contraction rapide (marron foncé, IIa) sont innervées par des MN αFFR (α) et les fibres musculaires résistantes à la fatigue à contraction lente (vert, I) sont innervées par des MN αSFR. Les fibres musculaires intrafusales (bleu) résident dans un fuseau musculaire (gris) et sont exclusivement innervées par des MN (γ). Un seul MN innerve plusieurs fibres, toutes du même type ; cependant, pour la simplicité du schéma, une seule fibre est représentée. Issue de Stifani, 2014.

G. Points clés du chapitre

- **La locomotion, la mastication ainsi que la respiration sont des processus dépendant de la rythmogénèse**
- **La moelle épinière est capable de générer un rythme locomoteur en absence de projections des centres supraspinaux**
- **La locomotion repose sur l'activation rythmique et alternée des membres gauches / droites et des muscles fléchisseurs / extenseurs**
- **L'alternance gauche / droite est régulée par les neurones commissuraux V0 et V3 de la moelle épinière**
- **L'alternance fléchisseurs / extenseurs repose en partie sur l'action d'interneurones inhibiteurs V1 et V2b**
- **Les neurones Shox2+ non V2a, Hb9 et les neurones ventraux du tractus cerebello-spinal possèdent des propriétés autorythmiques et participent à la genèse du rythme locomoteur**
- **Une variété de conductances est impliquée dans le rythme locomoteur. L'inhibition du courant sodique persistant (INaP) abolit le rythme locomoteur**
- **Les variations de concentrations ioniques telles que le Ca2+ et le K+ apparaissent cruciales dans l'émergence des bouffées rythmiques.**
- **Bien que peu étudiés, les astrocytes semblent également jouer un rôle majeur dans l'émergence du rythme locomoteur.**
- **La régulation du K+ extracellulaire par les astrocytes est-il un élément clé pour le comportement locomoteur ?**

III - Physiopathologie de la spasticité à la suite d'une lésion de la moelle épinière

Malheureusement, à l'instar de l'encéphale et du cervelet, la moelle épinière n'échappe pas à une multitude de troubles et pathologies. On y trouve des maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques, des arrêts vasculaires spinaux, ainsi que des tumeurs spinales. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur un trouble moteur appelé spasticité, qui survient après une lésion traumatique de la moelle épinière.

A. Les lésions médullaires

1. Définition & Épidémiologie

Une lésion médullaire se définit comme une lésion traumatique aiguë de la moelle épinière résultant en déficits moteur, dysfonctionnements intestinaux ou de la vessie, de façon temporaire ou permanente (Thurman et al., 1995). Les origines de ces lésions peuvent être de deux types, non-traumatique (interne) dans le cas de tumeur ou de pathologie sous-jacente, ou bien d'étiologie externe (accident de la route, chute, violence ou iatrogène). L'incidence des traumatismes médullaires dans les pays industrialisés touche en moyenne 12,1 à 57,8 individus par million d'habitants (Wyndaele.M et Wyndaele.J-J, 2006). En France l'incidence est de 19.4 par million d'habitants, cela représente une estimation de 934 cas par an (Albert et Ravaud, 2005). Les hommes sont plus touchés avec un ratio 3.8 :1 par rapport aux femmes (Wyndaele.M et Wyndaele.J-J, 2006). Il s'agit le plus souvent d'hommes jeunes avec la plus grande incidence au niveau de la tranche d'âge des 20-30 ans (Wyndaele.M et Wyndaele.J-J, 2006 ; Golestani et al., 2022). La cause majeure est sans surprise causée par les accidents de la route (38-49%) suivi des chutes (29-40%). Au niveau de la localisation du site de lésion, les lésions cervicales possèdent la prévalence la plus fréquentes (37-49%) (Barbiellini Amidei et al., 2022). On estime que l'ensemble de ces chiffres devraient suivre une augmentation du fait d'une population vieillissante plus vulnérable. Il est important de souligner que ces chiffres sont sujets à de grosse variabilité en fonction de la définition apportée, des régions géographiques, et des types de lésion considérés.

2. Les différents types de lésion médullaire

Une des complexités majeures dans l'étude et la prise en charge des lésions médullaires réside dans sa grande hétérogénéité. Tout d'abord par son étiologie, qu'elle soit traumatique ou non-traumatique. La localisation de la lésion au niveau de l'axe rostro-caudal ajoute un degré de complexité. La plus grande source de variabilité réside dans le degré de gravité des lésions. En effet selon l'étiologie, la puissance de l'impact et l'état physique de l'individu les types de lésions peuvent être différent. On y retrouve les compressions de la moelle épinière (souvent à la suite d'un choc), l'hémisection, et enfin dans des cas plus extrêmes la transsection complète (souvent à la suite d'attaques au couteau ou balistiques) (Figure 33). À noter que le type de lésion est susceptible d'évoluer en fonction de la prise en charge et de l'âge du patient. À la suite d'une lésion médullaire, un large spectre de symptômes émerge chez les patients incluant notamment bien évidemment des symptômes moteurs mais également des symptômes non moteurs, souvent oublié du grand public.

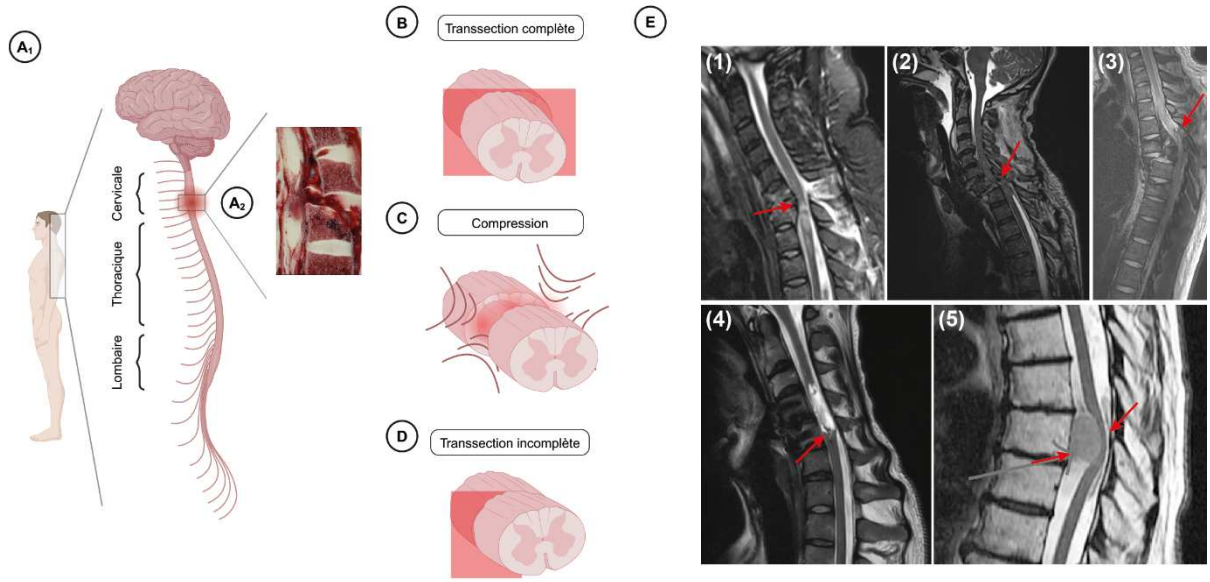


Figure 33 : Anatomie des différents types de lésion traumatiques de la moelle épinière.
(A1) Représentation schématique de la moelle épinière dans le prolongement de l'encéphale et du cervelet. (A2) Photographie à fort grossissement d'une contusion de la moelle épinière associé à une fracture d'un segment vertébral dorsal. (B) Représentation schématique simplifié d'une transsection complète de la moelle épinière. L'ensemble des afférences et efférences sont sectionnés empêchant tout contact avec les segments et centres supra-spinaux. (C) Représentation schématique simplifié d'une compression (contusion) complète de la moelle épinière. Ce cas clinique est le plus fréquent, la compression peut provenir d'origine et d'intensité variable. La compression peut survenir tant en dorsal, en ventral ou en latéral. Les afférences et efférences sont endommagées par compression. (D) Représentation schématique simplifié d'une transsection incomplète (hémisection) de la moelle épinière. Le degré de gravité de l'hémisection est variable, une proportion plus ou moins importantes des afférences sont sectionnés. (E) Sélection d'exemple de photographie issue d'IRM illustrant des lésions cervicales et thoracique de la moelle épinière. (E1)(E2)(E3)(E4) Lésion cervicale spinale d'origine traumatique avec

dislocation de segment vertébrale en E2 et E3 et sans en E1, E4 et E5. (E5) Lésion non traumatique de moelle épinière lombaire à la suite d'une compression du tissu nerveux par une tumeur. Les flèches rouges indiquent la lésion ou la compression.

3. Impact sur les fonctions sensorielles

Parmi les symptômes, on retrouve des symptômes sensoriels tel que les douleurs neuropathiques chroniques et la perte de sensibilité. Dès lors que l'intégrité des fibres afférentes (sensorielles) qui projette le long de la moelle épinière sont endommagés, cela résulte dans la majorité des cas à des douleurs neuropathiques ou à de la perte de sensibilité. La perte de sensibilité peut s'illustrer par des difficultés ou une impossibilité à ressentir le chaud, le froid ou la sensation de toucher d'un ou plusieurs membres. L'intensité de ces symptômes sont fortement corrélé à la gravité de la lésion. Par ailleurs, on estime que 50 à 61 % des patients souffrent de douleurs chroniques nécessitant une prise en charge urgente (Burke et al., 2015 ; Finnerup et al., 2018). Ces douleurs peuvent se manifester au niveau du site de la lésion ou s'étendre aux parties du corps situées en dessous. Certains patients éprouvent de l'hyperalgie, une douleur amplifiée en réponse à des stimuli habituellement non douloureux, ou de l'allodynie, une douleur provoquée par des stimuli normalement non douloureux (Figure 34). Ces douleurs entraînent des conséquences directes pouvant impacter la qualité du sommeil, induire de la dépression, affecter l'humeur (Figure 34) (Andrew et al., 2022) et constitue l'un des défis majeurs des cliniciens dans la prise en charge post traumatique des patients (Crul et al., 2020). La prévalence des douleurs neuropathiques est très contradictoire et aucun critère de prédisposition comme l'âge, le type de lésion ou le sexe apparait pertinent. Des anticonvulsants systémique tel que la pregabaline et gabapentine constituent les traitements de première intention suivis des antidépresseurs et opioïdes (Cardenas et Jensen, 2006). Des approches non pharmacologiques tel que l'exercice physique apparait intéressant en supplément mais ne parvient pas seul à améliorer la qualité des symptômes. Malgré le nombre croissant de recherche sur les mécanismes cellulaires sous-jacents aux douleurs chroniques, ils restent encore mystérieux.

4. Impact sur les fonctions végétatives

En parallèle, les symptômes affectant les fonctions autonomes du corps sont également observés. En raison de l'affaiblissement du système nerveux sympathique et parasympathique, la respiration, la digestion, la circulation sanguine et les fonctions sexuelles peuvent être altérées à la suite de la perte d'afférences supraspinales, contribuant ainsi aux comorbidités et à la mortalité chez les patients médullo-lésés (Henke et al., 2022 ; Haas et al., 2008 ; Karlsson, 2006).

Au niveau cardiovasculaire, ces altérations se manifestent par une diminution de la fréquence cardiaque maximale, une variabilité de la fréquence cardiaque, une vasodilatation et une hypotension orthostatique (Figure 34). De plus, la dysréflexie autonome, caractérisée par une hypertension soudaine en réponse à des stimuli nocifs en dessous du site de lésion, peut se manifester (West et al., 2013 ; Partida et al., 2016). Ces complications peuvent entraîner des événements cardiovasculaires graves, tels que des accidents vasculaires cérébraux et des crises hypertensives mettant en jeu le pronostic vital (Biering-Sorensen et al., 2018).

Au niveau respiratoire, une constriction des voies bronchiques, une hyperactivité et une sécrétion accrue de mucus peuvent être observées (Schilero et al., 2009 ; Berlowitz et al., 2016). Même lors d'un effort respiratoire accru, la bronchoconstriction et la production de mucus persistent, compromettant la fonction respiratoire (Henke et al., 2022).

En ce qui concerne les fonctions génitales, des contractions involontaires de la vessie et une perturbation sphinctérienne peuvent conduire à des pressions vésicales élevées avec un potentiel de reflux vésico-urétéral. Les dysfonctionnements urinaires sont souvent à l'origine de la dysréflexie autonome, avec diverses causes telles que la distension de la vessie et les infections urinaires (de Groat et al., 1990 ; Apodaca et al., 2003). De plus, les réponses sexuelles sont affectées, avec des dysfonctionnements érectiles et une lubrification réduite (Elliott, 2006 ; Kreuter et al., 2010).

Enfin, au niveau gastro-intestinal, des augmentations de la sécrétion d'acide gastrique et des dysfonctionnements biliaires, tels que la lithiase, sont observées (Figure 34) (Tandon et al., 1997). De plus, des transits intestinaux prolongés, de la constipation et de l'incontinence fécale sont récurrents (Figure 34) (Lynch et al., 2001). Ces dysfonctionnements intestinaux constituent la deuxième cause de dysréflexie autonome aiguë (Henke et al., 2022).

5. Impact sur les fonctions motrices

Les perturbations de la motricité plus ou moins importante d'un ou plusieurs membres constituent les symptômes les plus connus du grand public et constitue un axe important de recherche. La faculté de mouvoir un ou plusieurs membres après une lésion de la moelle épinière, dépend de plusieurs éléments.

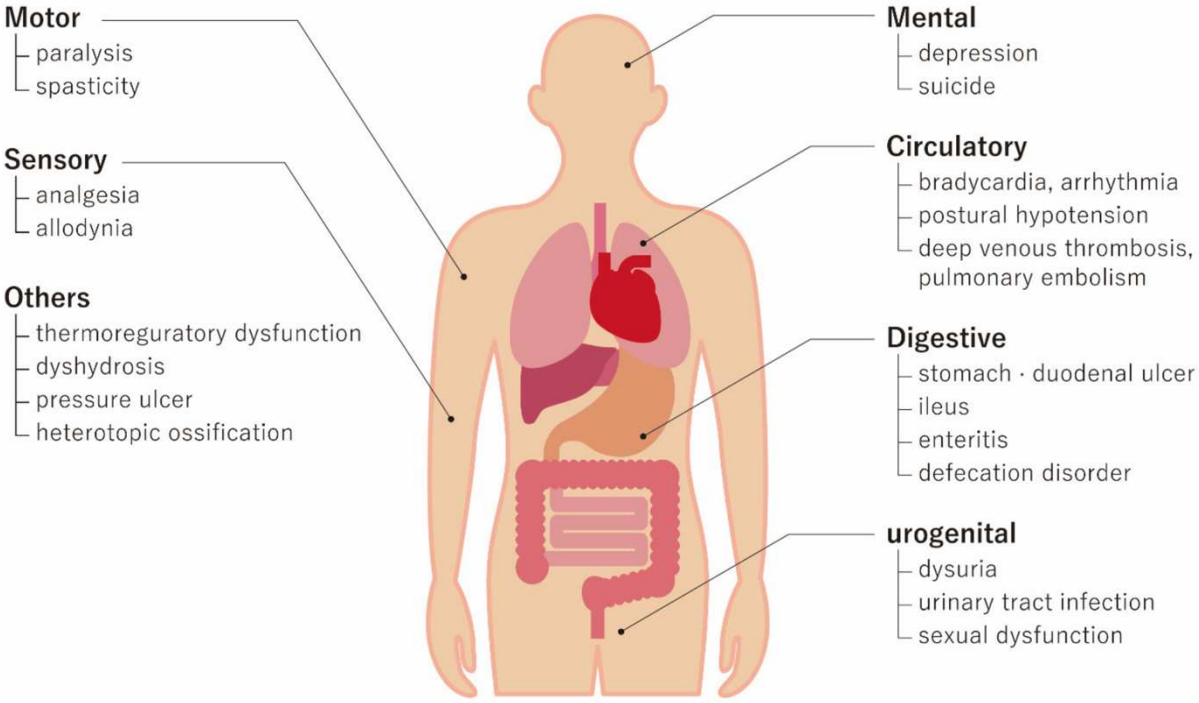


Figure 34 : Possible symptômes après une lésion de la moelle épinière.
Une lésion à la moelle épinière peut engendrer des déficits moteurs comme de la paralysie et de la spasticité. Des déficits sensoriels tel que de l'analgésie et de l'allodynie peuvent émerger. Au niveau mental, de la dépression aboutissant à un suicide est également possible. Des dysfonctionnements végétatifs de type cardiovasculaire, digestif et uro-génitale peuvent également impacter la qualité de vie des patients médullo-lésés. Issue de Yamazaki et al. 2020.

Le premier est la localisation de la lésion au niveau de la moelle épinière. L'ensemble des fonctions qu'elle soit motrices, sensorielles ou végétatives, au niveau et au-dessous du site de lésion vont être affecté (Figure 35). De ce fait, plus une lésion se situe en rostral de la moelle épinière plus un grand nombre de fonctions vont être altérées. De ce constat, découlent deux types de paralysie : la paraplégie et la tétraplégie (Figure 35). La paraplégie signifie que le tronc, les jambes et organes pelviens sont touchés mais pas les bras. En revanche la tétraplégie se caractérise par une affection du tronc, des jambes, organes pelviens ainsi que les bras et les mains.

Le second dépend de la gravité de la lésion. Dans le cas d'une lésion incomplète, bien qu'il existe différent degré, une partie de la motricité et sensibilité des membres est conservées. Les fonctions végétatives elles, sont affectées mais subsistent. Dans des cas plus dramatiques, une lésion complète induit une perte complète de motricité et/ou motricité. A noter que dans certains cas une motricité partielle peut être conservée avec une absence de sensibilité et *vice-versa*.

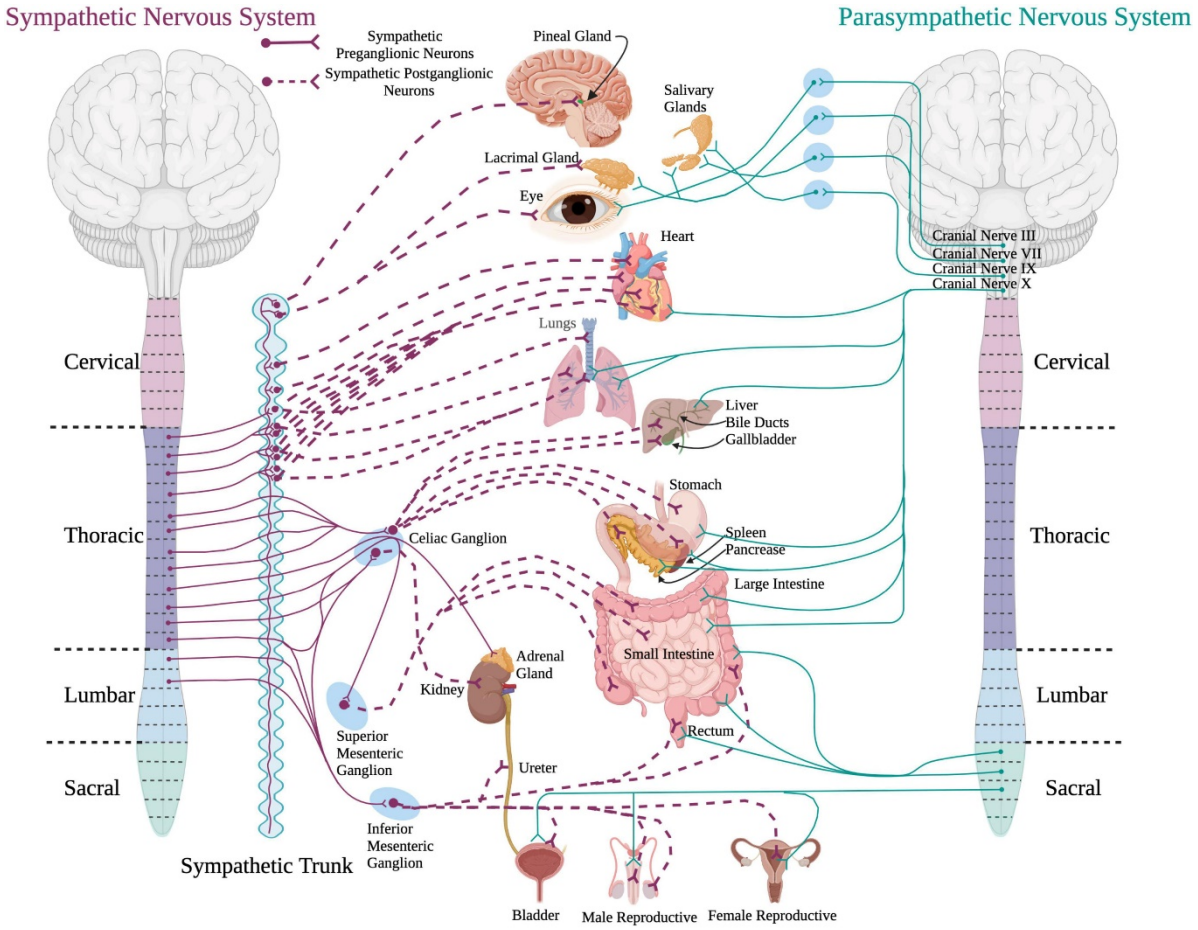


Figure 35 : Innervation des organes par la moelle épinière.

L'innervation du système parasympathique est localisée dans le tronc cérébral et la partie sacrée de la moelle épinière. En revanche, on retrouve les innervations du système sympathique tout le long des régions thoracique et lombaire de la moelle épinière. Ce schéma illustre la segmentation des fonctions végétatives le long de la moelle épinière. Dès lors, le niveau de lésion à la suite d'un traumatisme de la moelle épinière est déterminant pour les fonctions qui seront altérés par la suite. S'ajoute à ce schéma toutes les innervations sensoriels et motrices qui ne sont pas représentées. Issue de Wulf et al. 2023.

Si les symptômes décrit ci-dessus surviennent rapidement, en général au cours de l'hospitalisation, certains symptômes moteurs émergent dans un second temps, parfois plusieurs mois après l'accident, c'est le cas de la spasticité.

B. La spasticité

1. Définition

La spasticité est un trouble moteur fréquent chez les patients atteints d'une lésion de la moelle épinière (60-75 %) (Biering-Sorensen et al., 2006). On estime qu'environ 12 millions de personnes sont atteintes de spasticité induit par lésion médullaire. La première définition de la spasticité provient des travaux de Lance en 1980, qui la décrit comme « un désordre moteur caractérisé par une augmentation vitesse-dépendante du réflexe d'étirement (hypertonie musculaire), qui est associée à l'hyperexcitabilité de l'arc réflexe myotatique… » (Lance, 1980). Il apparait que l'étirement d'un muscle lors d'une mobilisation passive de l'articulation provoque une contraction réflexe qui s'opposera au mouvement. Plus cette contraction est forte, plus la spasticité est forte. Cependant, le tableau clinique de la spasticité est en réalité bien plus complexe que la définition apportée par Lance (Mukherjee et Chakravarty, 2010). Celle-ci s'accompagne de troubles variés, associés à l'étiologie de l'atteinte lésionnelle. Par exemple, l'hypertonie permanente (dystonie) peut apparaître en l'absence de tout étirement et modifie les propriétés viscoélastiques du muscle en le rendant moins extensible (raideur). À plus long terme, des raccourcissements musculo-tendineux (rétractions musculaires) déforment les articulations (Figure 36-A). Il n'est pas rare que la spasticité s'accompagne de clonies (des contractions brèves et répétées du muscle) et de spasmes (des contractions involontaires transitoires du muscle) qui peuvent survenir spontanément ou en réponse à une stimulation sensorielle. Les spasmes se manifestent par des co-contractions de muscles fonctionnellement opposés (Figure 36-B), rendant tout mouvement volontaire difficile. Pour étudier la spasticité différents modèles animaux ont été mis en place comme le rat (Bennett et al., 1999; Plantier et al., 2019 : Brocard et al., 2016 ; Li et al. 2017) ou la souris (Bellardita et al., 2017 ; Marcantoni et al. 2020) médullo-lésés. Au-delà des symptômes musculaires, la spasticité entraîne donc des conséquences importantes sur la qualité de vie, puisqu'elle réduit significativement la mobilité, les soins corporels, le sommeil, la fonction sexuelle, et l'estime de soi (Gillard et al., 2015).

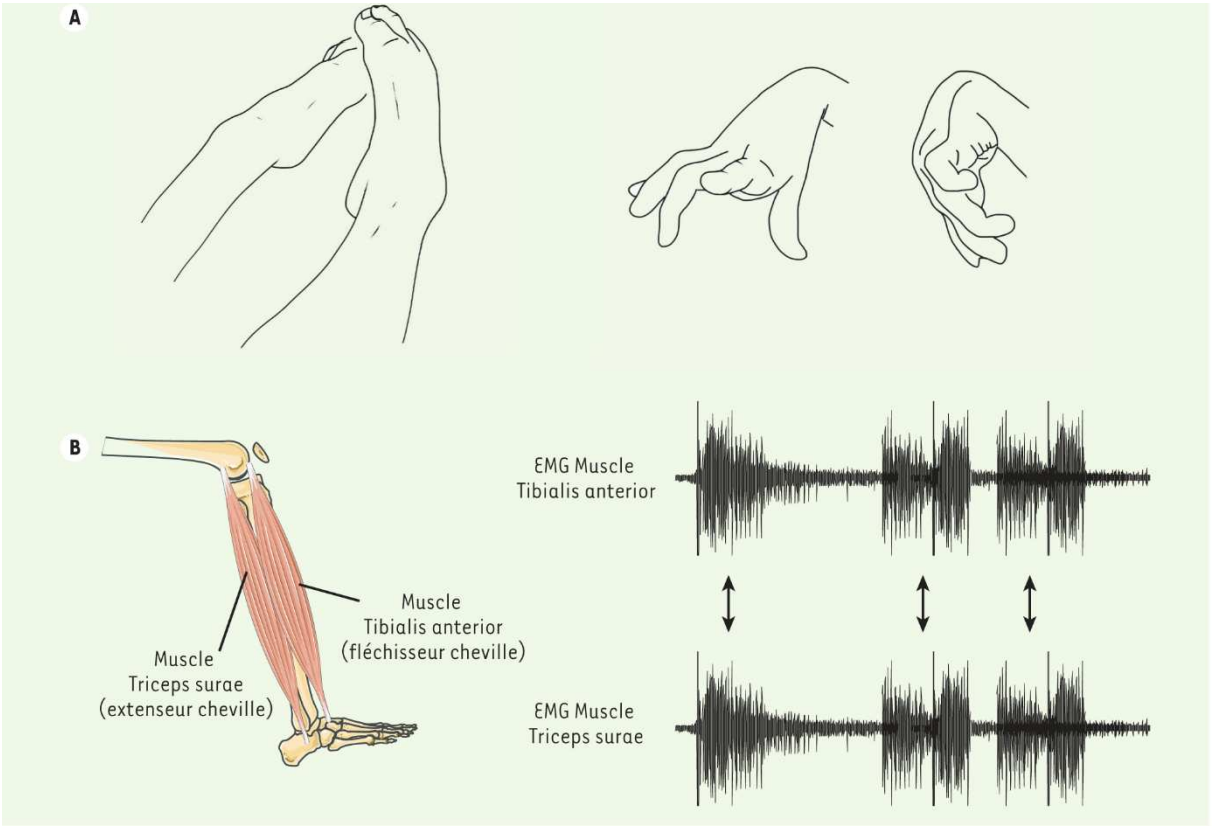


Figure 36 : Les signes cliniques de la spasticité.
(A) Déformations de l'articulation de la cheville et du poignet chez des patients souffrant de spasticité chronique (© Joel Sadoun). (B) Électromyogrammes (EMG) de muscles du membre inférieur (le Tibialis antérieur et le Triceps surae, respectivement fléchisseur et extenseur de la cheville) illustrant le phénomène de co-contractions (double flèche) des muscles antagonistes lors de spasmes enregistrés chez un patient médullo-lésé.

2. Les mécanismes sous-jacents

• La désinhibition de l'arc réflexe myotatique

Le réflexe myotatique ou réflexe de Hoffmann (réflexe H), est la contraction d'un muscle en réponse à son propre étirement. Lors de l'étirement, l'activation des fuseaux neuromusculaires génèrent une décharge des fibres sensorielles Ia transmise monosynaptiquement aux motoneurones α innervant le muscle étiré (Figure 37-A). Les motoneurones activés transmettront une commande motrice à l'origine d'une libération d'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire générant une contraction du muscle qui s'opposera à son étirement initial (Figure 37-A).

Des circuits polysynaptiques mettent en jeu des interneurones inhibiteurs pour moduler le réflexe myotatique à différents niveaux (Figure 37-B). Des interneurones inhibiteurs de

nature GABAergique qui projettent sur les terminaisons synaptiques des fibres sensorielles Ia (Eccles et al., 1962). Cette inhibition dite « présynaptique » réduit la libération de neurotransmetteurs excitateurs des terminaisons Ia afin d'éviter l'emballement du réflexe myotatique (Figure 37-B). De même, chaque motoneurone s'auto-inhibe grâce à un circuit d'inhibition récurrente (Hultborn et al., 1971). En effet, l'axone du motoneurone émet une collatérale qui s'articule avec un interneurone inhibiteur nommé « Renshaw », qui, en retour, inhibe le motoneurone par une boucle de rétroaction négative (Figure 37-B).

En dehors du contrôle spinal du réflexe myotatique, un contrôle inhibiteur s'exerce aussi par les centres supérieurs du système nerveux. Cependant, l'émergence de la spasticité à la suite d'un traumatisme médullaire ne relève pas d'une simple perte de l'inhibition en provenance des centres supérieurs. En effet, l'apparition de la spasticité post-lésionnelle n'est pas immédiate mais progressive, s'étalant sur plusieurs semaines. Une baisse progressive de l'inhibition présynaptique est corrélée à l'émergence de la spasticité de patients (Nielsen et al., 1993) ou de rats médullo-lésés (Thompson et al., 1992). Une réduction de l'inhibition réciproque est également décrite chez de nombreux patients (Crone et al., 2003) et pourrait rendre compte des phénomènes de co-contractions musculaires. Le contrôle inhibiteur du réflexe monosynaptique est donc fortement réduit après une lésion médullaire et il contribue au développement de la spasticité.

- Diminution du transporteur KCC2 et désinhibition

Les principaux neurotransmetteurs de la moelle épinière sont le GABA et la glycine et agissent sur des récepteurs membranaires perméables aux ions chlore (Cl^-) et bicarbonate ($HCO3^-$). L'action inhibitrice du GABA et de la glycine dépend essentiellement du gradient électrochimique des ions Cl^-. Dans des conditions normales, la concentration intracellulaire de ces ions est maintenue basse grâce à la présence du co-transporteur KCC2 (*K-Cl co-transporter 2*) à la membrane des neurones qui expulse l'ion de la cellule (Figure 37-C) (Jean-Xavier et al., 2007). En raison de leur faible concentration intracellulaire, les ions Cl^- entrent dans le neurone lors de l'ouverture des récepteurs $GABA_A$ (Lance, 1980) et glycine (Mukherjee et Chakravarty, 2010), et génèrent une hyperpolarisation du potentiel de membrane ce qui éloigne du seuil d'activation du neurone (Figure 37-C). Après une lésion de la moelle épinière, l'expression et la fonctionnalité de KCC2 sont fortement altérées (Figure 37-C) (Boulenguez et

al., 2010 ; Boulenguez et al., 2011). Il s'ensuit, au niveau des neurones, une augmentation de la concentration intracellulaire des ions Cl^- rendant l'action inhibitrice du GABA et de la glycine moins efficace (Bos et al., 2013 ; Jean-Xavier et al., 2006) (Figure 37-C). La levée de l'inhibition de la moelle épinière sous-lésionnelle en lien avec une perturbation de l'homéostasie des ions Cl^- contribue ainsi au développement de la spasticité (Boulenguez et al., 2010 ; Bos et al., 2013 ; Jean-Xavier et al., 2006).

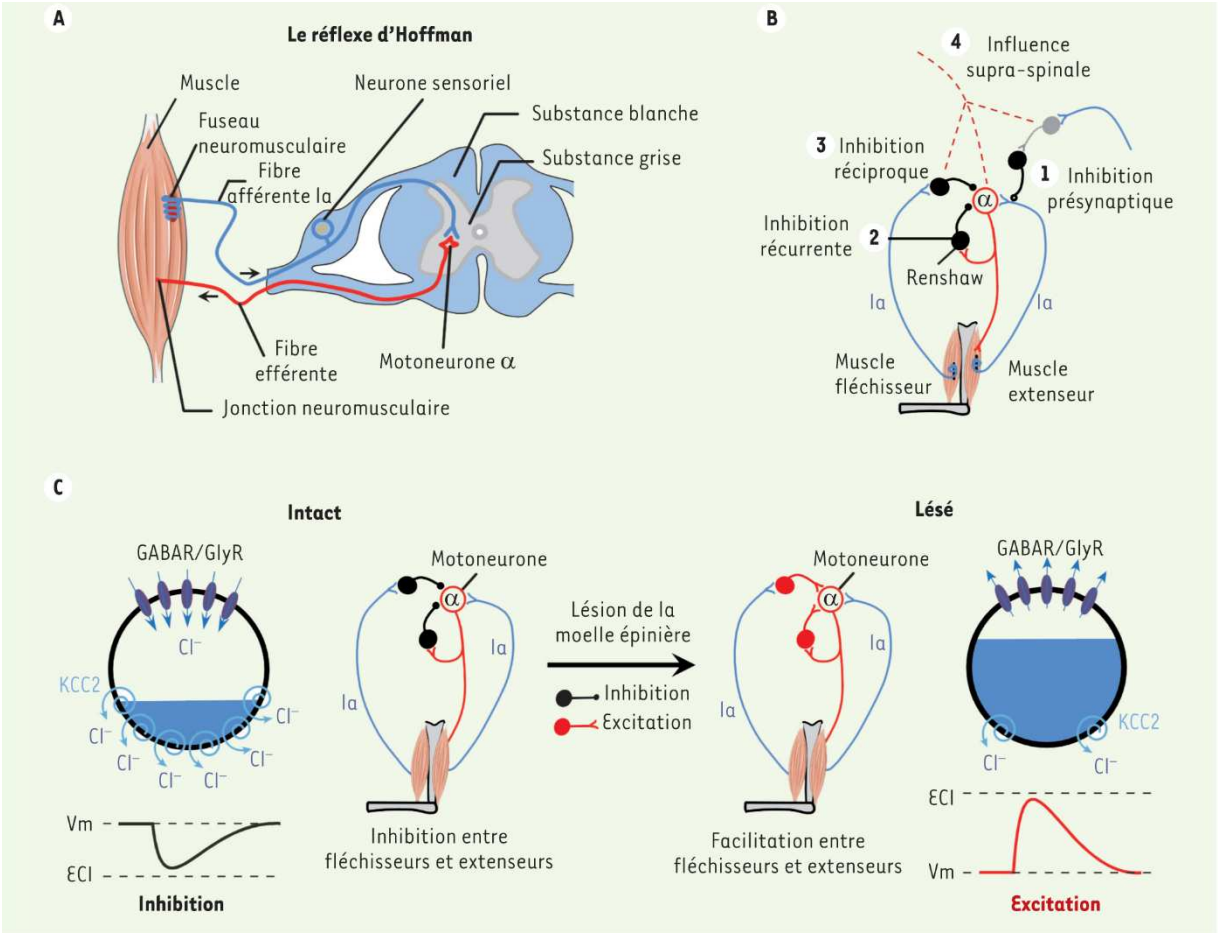


Figure 37 : La désinhibition post-lésionnelle liée à la baisse du co-transporteur KCC2.

(A) Schéma de l'arc reflexe myotatique. Les fibres sensorielles Ia activées par les fuseaux neuromusculaires recrutent monosynaptiquement les motoneurones dans la moelle épinière, qui vont libérer l'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire pour générer une contraction du muscle. (B) Le motoneurone α est au centre de plusieurs inhibitions qui régulent son activité : l'inhibition présynaptique ①, l'inhibition récurrente ②, l'inhibition réciproque ③ et l'inhibition due aux centres supérieurs ④. (C) Le comportement inhibiteur du GABA et de la glycine est sous le contrôle du gradient en ions chlorures (Cl^-) entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Dans des conditions normales, la concentration intracellulaire de ces ions est basse grâce à la présence du co-transporteur KCC2 à la membrane des neurones. KCC2 est responsable d'une sortie des ions Cl^-. Les neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA et glycine) engendrent alors une entrée d'ions Cl^-, qui génèrent une inhibition en déplaçant le potentiel de membrane (Vm) vers un potentiel d'équilibre au chlorure (ECl) hyperpolarisé. Après une lésion de la moelle épinière, l'expression de KCC2 diminue à la membrane des motoneurones. La conséquence fonctionnelle est une augmentation de la concentration en ions Cl^-, qui modifie le gradient électrochimique de ces ions plaçant

ECl au-dessus de Vm. Le GABA et la glycine engendrent alors une sortie de Cl^- et deviennent dépolarisants. Les circuits inhibiteurs (noir) deviennent alors facilitateurs (rouge) après un traumatisme de la moelle épinière.

- Augmentation du courant sodique persistant (I_{NaP}) et hyperexcitabilité motoneuronale

L'acteur en fin de chaine, responsable de la spasticité est le motoneurone. Durant de nombreuses années, le motoneurone était considéré comme un élément passif du SNC, ayant pour rôle unique d'intégrer les différentes afférences. En réalité, son rôle est bien plus complexe. Le motoneurone possède une propriété intrinséque de décharge dit « potentiel de plateau » (Bouhadfane et al., 2013). Cette propriété, intrinsèque au motoneurone, se manifeste par l'émission continue de potentiels d'action à la suite d'une brève dépolarisation (Figure 38-A et B). Des études ont démontré que le courant sodique persistant (I_{NaP}) est essentiel dans cette décharge en plateau (Boudfane et al., 2013). De plus, l'amplitude de ce courant augmente considérablement à la suite d'une lésion de la moelle épinière (Figure 38-C) et contribue à l'hyperexcitabilité motoneuronale en favorisant l'émergence des potentiels de plateau de très longue durée (Figure 38-C) (Brocard et al., 2016). Pour preuve, le blocage pharmacologique de I_{NaP} avec le riluzole, abolit les potentiels de plateau des motoneurones (Figure 38-C) (Brocard et al., 2016). Ainsi, l'augmentation de I_{NaP} associée à la désinhibition de la moelle sous-lésionnelle précipitent les motoneurones à générer des décharges en plateau, de longue durée, à l'origine des spasmes musculaires chez l'animal (Bellardita et al., 2017 ; Brocard et al., 2016) ou les patient.e.s médullo-lésé.e.s (Gorassini et al., 2004).

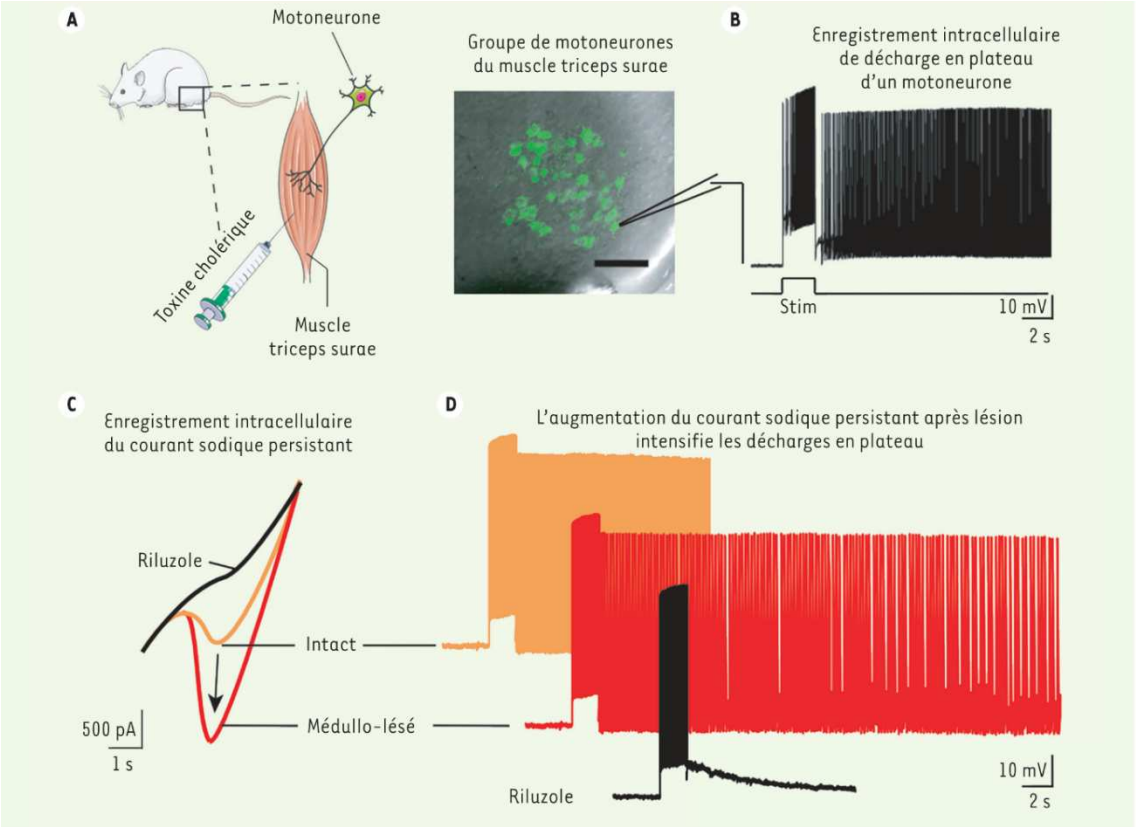


Figure 38 : L'hyperexcitabilité des motoneurones sous-lésionnels est en partie liée à l'augmentation du courant sodique persistant (I_{NaP}).

(A) Visualisation en microscopie à épifluorescence des motoneurones innervant le muscle triceps du rat et marqués de façon rétrograde par l'injection par voie intramusculaire de la toxine cholérique couplée à une sonde fluorescente de couleur verte. Les motoneurones infectés sont identifiés dans la moelle épinière (barre d'échelle : 100 µm). (B) Les enregistrements intracellulaires montrent l'expression d'un potentiel de plateau (décharge continue) évoqué par une brève stimulation (stim) dans ces motoneurones. (C) Enregistrement intracellulaire du courant sodique persistant (I_{NaP}) en réponse à une rampe de voltage chez un animal intact, médullo-lésé et après application de riluzole (5 µM). (D) Le blocage de I_{NaP} par le riluzole abolit les potentiels de plateau au niveau des motoneurones.

- Implication des astrocytes dans la spasticité : effet protecteur de Rac1

Bien que l'implication des astrocytes dans la spasticité ait été peu considérée jusqu'alors, une étude récente reconsidère les astrocytes entant qu'élément clef de la spasticité à la suite d'une lésion de la moelle épinière. En effet, une contusion de la moelle épinière induit chez les animaux une diminution de la dépression du reflexe H, ce qui est caractéristique d'une hyperreflexie et donc de spasticité (Boulenguez et al. 2010 ; Bos et al., 2013). Cependant, lors d'une ablation spécifique du gène codant pour le substrat de la toxine botulique C3 lié à la Ras

(Rac1) dans les astrocytes, les souris présentent un réflexe H quasi identique aux animaux non lésés. En parallèle de ce constat, les animaux Rac1KO sont accompagnés d'une réduction de la densité des épines dendritiques au niveau niveaux des motoneurones α de la corne ventrale ainsi qu'une augmentation du transporteur astrocytaire au glutamate 1 (GLT-1) (Benson et al., 2024). Cette dernière serait alors responsable d'une recapture plus forte du glutamate extracellulaire ce qui réduirait l'hyperreflexie observée chez les animaux lésés dépourvus en Rac1 au niveau des astrocytes (Benson et al., 2024).

3. Outils d'évaluation et prise en charge

La spasticité est un trouble généralement très vite diagnostiqué. Cependant faute de biomarqueurs mesurable, sa quantification est difficile. Cela constitue un problème majeur afin d'évaluer la potentielle amélioration symptomatique lors d'une prise en charge thérapeutique. Il existe plusieurs méthodes permettant de caractériser et quantifier la spasticité incluant des évaluations cliniques, biomécaniques et électrophysiologiques.

• Les méthodes cliniques

Parmi les méthodes cliniques on retrouve l'échelle modifiée d'Ashworth (Table 1), utilisé pour évaluer le degré d'hypertonie musculaire (scores de 0 à 5), cependant sa validité est discutée. En effet, plusieurs études montrent que la variabilité de score entre différents testeurs (testeur = individu qui teste la spasticité) fluctue énormément pour l'évaluation des membres inférieurs chez des patient.e.s médulo-lésé.e.s (Platz et al. 2005 ; Allison et al. 1996 ; Bohannon et Smit, 1987). De plus, le contexte dans lequel la spasticité d'un.e patient.e est évaluée (heure, température, état émotionnel et physique) complique la reproductibilité des résultats lors de l'évaluation clinique. S'ajoute à cela de la variabilité inter-testeurs sur un même patient et intra-testeur sur des tests différents (Allison et al. 2006). Aussi, il s'avère que la spasticité par définition est vitesse dépendante, dès lors de ce paramètre apparait essentiel à contrôler (Van der Salm et al. 2005).

Score	Observations
0	Pas d'augmentation du tonus musculaire.
1	Légère hypertonie avec réflexe ostéotendineux OU résistance en fin de mouvement.
2	Hypertonie avec réflexe ostéotendineux ET résistance au cours de la première moitié du mouvement.
3	Augmentation du tonus durant la course musculaire, mais le membre reste mobilisable.
4	Forte augmentation du tonus musculaire. Le mouvement passif est difficile.
5	Hypertonie majeure. Le membre affecté est rigide.

Table 1 : L'échelle modifiée d'Ashworth.

L'échelle modifiée d'Ashworth permet de scorer l'hypertonie musculaire entre 0 et 5.

La quantification clinique est souvent complétée par la mesure de la fréquence des spasmes à l'aide de l'échelle de Penn (Table 2) (Biering-Sorensen et al. 2006).

Score	Observations
0	Pas de spasmes
1	Les spasmes apparaissent seulement quand le muscle est stimulé
2	Les spasmes apparaissent moins d'une fois par heure
3	Les spasmes apparaissent entre une et dix fois par heure
4	Les spasmes apparaissent plus de dix fois par heure

Table 2 : L'échelle de Penn.

L'échelle de Penn permet de scorer les spasmes en fonction de leur occurrence.

- Les méthodes biomécaniques

L'utilisation de capteurs isocinétiques positionnés au niveau des différentes articulations en fonction du ou des membres testés permet une évaluation précise et standardisé de la spasticité. L'introduction du « Pendulum test » par Wartenberg en 1951 associé à l'utilisation de capteurs isocinétique permet également d'évaluer le degré de spasticité. Cependant, ce test est limité aux muscles autour de l'articulation du genou et ne permet pas de quantifier des degrés sévères de spasticité (Biering-Sorensen et al. 2006).

- Les méthodes électrophysiologiques

Le développement d'outils électrophysiologiques a permis d'affiner l'évaluation de la spasticité. Les enregistrements de type électromyographiques (EMG) pour enregistrer l'activité musculaire en combinaison des méthodes précédentes est apparu prometteur.

Plusieurs études ont utilisé des EMG en combinaisons avec un étirement du muscle, une stimulation mécanique du tendon (réflexe T) ou après une stimulation électrique du nerf périphérique innervant le muscle en question afin d'évaluer si la réponse est exagérée chez les patients spastiques. Cependant cette méthode souffre de nombreux biais puisque le placement des électrodes affecte énormément l'amplitude de la réponse musculaire. De ce fait, le suivi d'un même patient ainsi que la comparaison de plusieurs patients avec des degrés de spasticité différents apparait obsolète.

La mesure du réflexe H a également été utilisé dans plusieurs études pour évaluer la spasticité. L'activité musculaire enregistrée au niveau des muscles extenseurs de la cheville à la suite d'une stimulation électrique du nerf sciatique révèle deux réponses : une onde M initiale qui émerge de la mise en jeu directe des axones moteurs et une onde H, plus tardive, résultant de l'activation monosynaptique des motoneurones par les fibres afférentes Ia (Figure 39). Cette méthode permet de calculer le ratio entre le réflexe H et l'onde M. Ce ratio, utilisé comme marqueur de l'excitabilité des motoneurones est augmenté chez des patients spastiques (Angel et Hoffman, 1963).

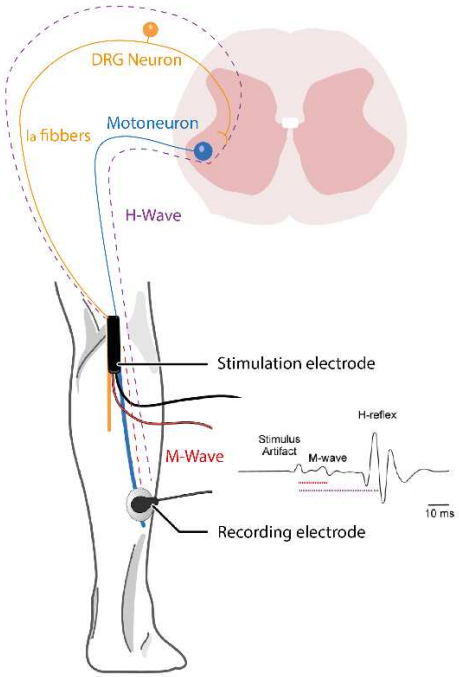


Figure 39 : Réflexe de Hoffman (réflexe H).
Illustration du réflexe de Hoffman. La stimulation du nerf mixte tibial innervant le muscle du soleus induit dans un premier temps une onde M (en rouge) caractérisée par les afférences directes des axones moteurs. L'onde H (en violet) est retardée car elle résulte de l'activation monosynaptique des motoneurones de la corne ventrale au niveau de l'élargissement lombaire de la moelle épinière par les fibres Ia. Les motoneurones innervant le muscle soleus cela créer une boucle réflexe entrainant la contraction de ce dernier. Modifié à partir de Bryce Peebles – AD Instruments, 2023.

- Prise en charge thérapeutique et non thérapeutique

En raison d'une méconnaissance des mécanismes qui en sont responsables, le traitement n'est que symptomatique et repose essentiellement sur l'utilisation de myorelaxants (dantrolène, baclofène et toxine botulique) dont les effets secondaires restent nombreux (somnolence, vertiges, désensibilisation) (Elbasiouny et al., 2010). En parallèle des traitements médicamenteux, des séances de kinésithérapie sont souvent co-prescrites. Cependant l'effet de la kinésithérapie, bien que présent, ne persiste pas et nécessite une assiduité du patient. La découverte d'un nouveau traitement plus efficace reste aujourd'hui une nécessité clinique. Si la majorité des mécanismes sous-jacents découverts à ce jour sont de nature neuronale, des études visant à étudier d'autres composants cellulaires comme les cellules gliales semble prometteur.

C. Les points clés du chapitre

- **Les lésions de la moelle épinière variant considérablement selon leur localisation, leur étiologie et leur gravité, et nécesitent une prise en charge d'urgence.**
- **Les symptômes sont nombreux et englobent des dysfonctionnements non moteurs et moteurs.**
- **La spasticité est un symptôme survenant chez 60-75% des patients touchés par des lésions de la moelle épinière.**
- **Les mécanismes de la spasticité sont multiples mais sont principalement dus due à une hyperexcitabilité des motoneurones.**
- **Cette hyperexcitabilité est causée par une perte de la balance excitation/inhibition due à une diminution de KCC2 à la membrane et par le clivage de Nav1.6 au niveau des motoneurones.**
- **Le diagnostic du patient est rapide mais la prise en charge thérapeutique n'est pas encore satisfaisante.**
- **D'autres cibles thérapeutiques impliquant d'autres types cellulaires tels que les cellules gliales, sont à envisager.**
- **Les astrocytes sont des candidats idéaux car ils modulent l'excitabilité neuronale.**

OBJECTIFS DE RECHERCHE DE LA THÈSE

La circuiterie régissant le rythme locomoteur chez le rongeur est bien décrite, malgré certaines zones d'ombres persistantes. Cependant, le rôle des cellules gliales, notamment des astrocytes, au sein des réseaux locomoteurs spinaux demeure encore mystérieux. Des études montrent que pour produire une locomotion fonctionnelle, la concentration extracellulaire en K^+ doit être finement régulée sous peine de perturber fortement le rythme locomoteur. **Cependant les acteurs et les mécanismes responsables de la régulation du $(K^+)_e$ au cours de la locomotion sont encore inconnus.** Les canaux astrocytaire Kir4.1, acteurs majeurs de la régulation du K^+ dans le SNC, constituent donc les candidats idéaux.

Dans quelle mesure et comment les canaux Kir4.1 participent à l'initiation et la maintenance du rythme locomoteur chez la souris ?

La spasticité est un trouble moteur pouvant survenir à la suite d'une lésion de la moelle épinière, caractérisée par une hyperexcitabilité des motoneurones. Si, les mécanismes cellulaires neuronaux sous-jacents sont connus, l'arsenal thérapeutique reste insatisfaisant notamment dû aux effets secondaires. **Il y a une forte nécessité de découvrir de nouveaux acteurs potentiels afin d'établir des pistes thérapeutiques efficientes.** Le $(K^+)_e$ modulant fortement l'état d'excitabilité des neurones, les canaux Kir4.1 au sein des astrocytes apparaissent être des candidats sérieux dans la perte du maintien de l'excitabilité d'un réseau neuronal en condition pathologique.

Dans quelle proportion et comment les astrocytes contribuent-ils à l'hyperexcitabilité neuronale dans le contexte de spasticité post-lésionnelle ? Quels sont les mécanismes astrocytaires sous-jacents ?

Les astrocytes peuvent-ils constituer une piste thérapeutique alternative aux symptômes spastiques ?

MATÉRIELS ET MÉTHODES

« Pour explorer le champ des possibles,
Le bricolage est la méthode la plus efficace »

Hubert Reeves
Astronome, Astrophysicien, Écologiste, Enseignant, Homme politique, Scientifique (1932-2023)



Couverture du Prix Nobel 1963
Huxley (à gauche) regarde Hodgkin en train d'ajuster un oscilloscope Tektronix 502A. Accompagné de John Carew Eccles, Andrew Fielding Huxley et Alan Loyd Hodgkin, ils remportent le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leur découverte sur les mécanismes ioniques sous-jacents l'excitation et l'inhibition des cellules nerveuses.

I. La souris juvénile comme modèle expérimental

A. Pertinence du modèle souris juvénile

L'utilisation d'approches électrophysiologiques ex vivo sur la moelle épinière adulte (> 21 jours après la naissance) est difficile. En revanche, chez les nouveau-nés et les juvéniles, le système nerveux présente une fine couche de substance blanche et une barrière hématoencéphalique très perméable. Cela permet une meilleure optimisation de l'apport en métabolites, oxygène et molécules pharmacologiques dans un bain de liquide cérébrospinal artificiel (aCSF), assurant une meilleure viabilité tissulaire et une visualisation plus claire du tissu par rapport aux stades matures.

De plus, une partie de mon étude se concentre sur l'influence des astrocytes sur les propriétés de décharge des motoneurones, qui possèdent une arborisation dendritique pouvant atteindre 1 mm^3. Le processus de tranchage est particulièrement nuisible pour leur survie à des stades avancés en raison de l'augmentation de leur arborisation dendritique. C'est pourquoi nous avons privilégié le modèle de souris nouveau-né, afin de conserver la majorité de leur arborisation avant qu'elle n'atteigne sa taille définitive.

B. Les modèles de souris transgéniques

Les travaux de cette thèse ont été réalisé sur des souris des deux sexes de souche C57/Bl6 et CD-1, âgées de P0 à P21. Les souris transgéniques utilisées, à savoir Hb9-eGFP (Jackson Laboratory - #005029) pour l'enregistrement d'interneurones pacemaker ventro-médian, et Aldh1L1-eGFP (fournies par Nathalie Rouach - Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France) pour l'enregistrement des astrocytes, proviennent respectivement des fonds génétiques C57/Bl6 et CD-1. L'utilisation et le maintien du bien-être des animaux durant ce travail de thèse sont conformes aux régulations françaises et approuvés par le comité d'éthique local (Comité d'Ethique en expérimentation animale CE n°071 (INT-Marseille, Nb B 13 014 04), autorisations APAFIS: Nb 17485-2018110819197361 et Nb 44572-2023072115506121)). De plus, tous les protocoles expérimentaux ont été conçus pour limiter le nombre d'animaux utilisés et dans une logique de raffinement.

Malheureusement, dans le cadre de mon projet de thèse, le remplacement des animaux par d'autres outils n'a malheureusement pas pu être mis en œuvre.

II. Chirurgie et injection de vecteurs viraux

A. Les virus adéno-associés

Au cours de ma thèse l'utilisation de plusieurs AAVs a été nécessaire pour mener à bien mes investigations. Tous ces vecteurs viraux sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Promoteur	Fonction	Type	Provenance	Titrage (GC/ml)
pZac2.1- gfaABC1D-Tdtomato	Astrocytaire	Marquage des astrocytes	AAV	Addgene, 44332-AAV5	$1,5 * 10^{13}$
pZac2.1 gfaABC1D-cyto-GCaMP6f	Astrocytaire	Imagerie calcique astrocytaire	AAV	Addgene, 52925-AAV5	$1,9 * 10^{13}$
pAAV.Syn.NES-jRGECO1a.WPRE.SV40	Neuronal	Imagerie calcique neuronale	AAV	Addgene, 100854-AAV9	$1,8 * 10^{13}$
AAV9-H1-Kir4.1-shRNA-CAG-eGFP	Ubiquitaire	Perte de fonction	AAV	NBT, Cui et al. 2018	$3,78 * 10^{11}$
AAV9-H1-Luciferase-shRNA-CAG-eGFP	Ubiquitaire	Control	AAV	NBT, Cui et al. 2018	$1,07 * 10^{12}$
AAV9-Zac2.1 gfaBC1D-EGFP-Kir4.1	Astrocytaire	Gain de fonction	AAV	NBT, Cui et al. 2018	$2,30 * 10^{11}$
AAV9-GFAP-eGFP-Cre	Astrocytaire	Control	AAV	NBT, Cui et al. 2018	$2,50 * 10^{10}$

Table 3 : Ensemble des vecteurs viraux utilisés

B. Injection intrathécale des virus

L'injection de virus est effectuée à travers l'espace intervertébrale au niveau des segments thoraciques et lombaires T13-L1 ou L3-L4. Les souris nouveau-nées sont cryo-anesthésiées, la peau est incisée et un micro-capillaire est introduit au centre de l'espace intervertébral pour atteindre l'espace sous-arachnoïdien au niveau du segment d'intérêt. Au préalable, l'extrémité du micro-capillaire biseauté (30-60µm) est chargée de particules d'AAV. Un volume total de 2 µl par souris nouveau-née est injecté progressivement (1 µl/5 s). La peau est ensuite suturée et les souris nouveau-nées sont maintenues au chaud sur une plaque chauffante (30°C) avec de la litière de leur cage d'origine jusqu'à leur réveil.

C. Le modèle de lésion spinal (SCI)

Après visualisation d'un estomac plein chez les souris nouveau-nées, celles-ci sont cryo-anesthésiées, puis une injection sous-cutanée de buprénorphine (0.025mg/kg) est effectuée. Une incision est réalisée le long de la ligne médiane dans le dos de l'animal, suivie d'une laminectomie au niveau des segments thoraciques T9-T10. Après la laminectomie, la moelle épinière est sectionnée de façon complète. Du tissu hémostatique est placé au niveau de la transsection, accompagné d'un dépôt de l'antibiotique amoxicilline à titre préventif. La peau est ensuite suturée et les souris nouveau-nées sont maintenues au chaud sur une plaque chauffante (30°C) avec de la litière de la cage d'origine jusqu'au réveil. Au réveil, les souris nouveau-nées sont nettoyées à la vétadadine puis replacées dans leur cage d'origine en présence de leur mère. Pour les animaux « sham », la même procédure est réalisée, à l'exception de la laminectomie et de la transsection de moelle épinière qui ne sont pas effectuées. Un suivi strict du poids post-opératoire est effectué 2 à 3 fois par semaine. Les animaux dont le poids est inférieur à 80% du poids moyen des animaux sham sont euthanasiés.

III. Dissection et mise en place des préparations in vitro

Les procédures d'euthanasie ont été réalisées sous couvert des directives gouvernementales. À la suite d'une injection intra-péritonéale d'un cocktail de kétamine (100mg/kg) et xylazine (10mg/kg), les souris sont décapitées puis éviscérées. Une laminectomie est ensuite réalisée en commençant par la région sacrée et en remontant vers la partie thoracique. Une fois la moelle épinière exposée, la partie la plus superficielle des méninges appelée dure-mère, est retirée.

A. La moelle épinière isolée

La dissection s'effectue dans un aCSF froid (<4°C) et oxygéné (O2 95% / CO2 5%) dont la composition (en mM) est la suivante : 120 NaCl ; 4 KCl ; 1,25 NaH_2PO_4 ; 1,3 $MgSO_4$; 1,2 $CaCl_2$; 25 $NaHCO_3$; 20 D-Glucose ; pH=7.4. Une fois la moelle épinière libérée de la dure-mère, les racines lombaires sont sectionnées à leur sortie du canal vertébrale pour les conserver les plus longues possibles. Pour extraire la moelle, une section est réalisée au niveau du segment

T10. La préparation est ensuite transférée et fixée dans une chambre d'enregistrement continuellement perfusée par l'aCSF. La température de la chambre (entre 30°C et 32°C) est maintenue par un thermorégulateur à effet mixte (réchauffement et refroidissement).

B. Les tranches de moelle épinière

La dissection s'effectue dans un aCSF froid (<4°C) et oxygéné (O2 95% / CO2 5%) dont la composition (en mM) est la suivante : 232 sucrose ; 3 KCl ; 1,25 NaH_2PO_4 ; 4 $MgSO_4$; 0,2 $CaCl_2$; 26 $NaHCO_3$; 25 D-Glucose ; pH=7.4. Une fois la moelle épinière libérée de la dure-mère, les racines lombaires sont sectionnées au plus proche de la moelle et deux sections sont réalisées afin de n'extraire que la région lombaire. Celle-ci est placé sur un bloc d'agar (4%) et recouverte d'agarose (1%). Le bloc est plongé dans l'aCSF refroidit afin de figer l'agarose puis le bloc est fixé et monté sur un vibratome (Leica VT1000S) pour réaliser des tranches lombaires de 325 µm. Ces dernières sont placées dans une chambre remplie d'aCSF oxygéné et chauffé à 30°C, composé (en mM) de : 120 NaCl ; 3 KCl ; 1,25 NaH_2PO_4 ; 1,3 $MgSO_4$; 1,2 $CaCl_2$; 25 $NaHCO_3$; 20 D-Glucose ; pH=7.4. Après un minimum de 1h de repos, les tranches sont individuellement transférées dans la chambre d'enregistrement perfusée avec le même aCSF, chauffé à la même température. Les tranches sont visualisées à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel par infrarouge sur lequel est monté un objectif à immersion (40X). L'image est captée par une caméra CCD sensible aux infrarouges, puis affichée sur un moniteur vidéo.

IV. Enregistrements électrophysiologiques

A. Enregistrement extracellulaire

1. La locomotion fictive

La locomotion fictive est induite par l'ajout de N-methyl-DL-aspartate (NMA,12 µM) et de 5-hydroxytryptamine (5-HT, 5 µM) dans l'aCSF d'enregistrement (30°C). L'activité des racines ventrales (L2 gauche et droite) est enregistrée par des électrodes de succion connectée à un amplificateur à courant alternatif (x2000). Le signal est filtré (bande passante :

70 Hz – 3k Hz), échantillonné à 10 kHz puis rectifié et intégré à l'aide d'amplificateurs modifiés sur mesure.

2. Enregistrement électromyographique (EMG)

Les souris ont été testées à 10, 15 et 20 jours après la lésion de la moelle épinière (SCI), lorsque des signes de comportements moteurs spastiques, tels que des contractions/mouvements involontaires excessifs et des réflexes exagérés, étaient évidents. Pour l'évaluation électrophysiologique de la spasticité, une électrode à aiguille en acier inoxydable a été insérée par voie transcutanée dans le muscle gastrocnémien latéral (extenseur de la cheville). Deux électrodes de référence ont été placées sous-cutanément sur le dos et en contact avec le tendon rotulien. Comme les souris étaient spinalisées, elles ne ressentaient aucune douleur pendant cette procédure. Après une période d'acclimatation de 30 minutes à l'environnement d'enregistrement, les souris ont été immobilisées avec du ruban adhésif. Les réponses motrices spontanées ont été enregistrées pendant 15 minutes. Les réponses motrices évoquées par une pincée de la queue (50,5 ± 5,6 g, 0,5 ± 0,2 s) ont été enregistrées jusqu'au retour à l'activité de base. Chaque souris a subi cinq stimuli sensoriels consécutifs, chacun séparé par une période de repos d'au moins 30 secondes. Les extrémités proximales des fils d'enregistrement ont été connectées à un amplificateur A-M Systems (Modèle 1700, Everett, WA). Les signaux EMG ont été amplifiés (1000x) et filtrés en bande passante (100 Hz à 5 kHz), puis échantillonnés à 13,5 kHz (Digidata 1440A, Molecular Devices). La pression appliquée (mesurée en grammes) sur le tiers distal de la queue a été enregistrée par un capteur de pression miniature (#FS1901-000-0500-G, Farnell) placé entre le pouce et la queue, et surveillée en temps réel.

B. Enregistrement intracellulaire: patch clamp en configuration cellule entière

Au cours de cette thèse, trois types cellulaires distinct ont été enregistrés : les motoneurones, les interneurones Hb9 et les astrocytes. Dans chacun de ces cas, le signal est amplifié par un électromètre Multiclamp 700B (Molecular Devices) puis recueilli par une interface Digidata 1550B connectée à un ordinateur équipé du logiciel Clampex 10 (Axon

instrument, USA, fréquence d'échantillonnage 10 kHz). Les électrodes en verre (World Precision Instruments, diamètre externe : 1,5mm ; diamètre interne : 1,12 mm) utilisées pour les enregistrements sont fabriquées à l'aide d'une étireuse (Sutter Instrument). Tous les enregistrements ont été effectués dans une période stable environ 2 à 3 minutes après avoir établi l'accès en cellule entière. Les courants capacitifs sont supprimés et, après l'ouverture de la cellule, la résistance série est compensée et ajustée.

1. Les motoneurones

Les motoneurones sont identifiés comme des cellules à large soma (>400 μm^2) situées dans la partie latérale de la corne ventrale des segments lombaires L4-L5. Les électrodes, dont la résistance d'entrée varie entre 2 et 4 MΩ, sont remplies de milieu intracellulaire de composition suivante (en mM) : 140 K^+-gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl2, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 ATP, 0.4 GTP, pH 7.3 (280-290 mOsm).

2. Les interneurones ventromédian

Les interneurones Hb9 sont identifiés à l'aide de la GFP et par leur localisation au niveau des lamina VIII et X de la région ventro-médiane des segments lombaires L1-L2, à proximité du canal central, une région connue pour contenir la majorité du CPG locomoteur. Les électrodes, dont la résistance d'entrée varie entre 4 et 6 MΩ, sont remplies de milieu intracellulaire de composition suivante (en mM) : 140 K^+-gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl2, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 ATP, 0.4 GTP, pH 7.3 (280-290 mOsm).

3. Les astrocytes

Les astrocytes sont identifiés dans ces deux régions à l'aide de la GFP (Aldh1L1-eGFP). Dans certaines expériences, les astrocytes sont identifiés par leur morphologie (petit soma environ de 10 µm, entouré de plusieurs prolongements) et leurs propriétés électriques (faible résistance, potentiel de repos hyperpolarisé, absence de potentiel d'action suite à des incréments positifs de courant, et une relation I/V linéaire). Les électrodes, dont la résistance d'entrée varie entre 5 et 7 MΩ, sont remplies de milieu intracellulaire de composition suivante (en mM) : 105 K+-gluconate, 10 NaCl , 20 KCl, 0.15 MgCl2, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 ATP, 0.3 GTP, pH 7.3. Il est à noter que dans nos préparations de tranches de moelle épinière, le marquage classique des astrocytes par la sulforhodamine 101 (SR101) ne fonctionne pas, contrairement

aux tranches du cortex préfrontal et d'hippocampe dorsal sur lesquelles j'ai effectué des enregistrements dans le cadre de collaborations.

V. Imagerie bi-photonique

Les mesures de fluorescence ont été obtenues à l'aide d'un microscope bi-photonique équipé d'un scan à double tête (FemtoS-Dual, Femtonics Ltd, Budapest, Hongrie) et visualisées à l'aide d'un objectif Olympus XLUMPlanFL N 20x,1.00 (Olympus America, Melville, NY). Le système du microscope est contrôlé par le logiciel d'acquisiton MESc (https://femtonics.eu/femtosmart-software/, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary). Un plan unique d'acquisition est sélectionné, et l'ensemble des images est capturé en configuration résonnante à une fréquence de 30,5202 Hz. La zone scannée est de 468 µm x 474 µm. Le microscope est équipé de deux canaux distincts de détection pour l'acquisition de la fluorescence.

A. Imagerie calcique intracellulaire

1. Préparation du tissue

Pour visualiser les fluctuations Ca^{2+} intracellulaires neuronales, l'AAV-Syn.NES-jRGECO1a a été utilisé, et pour les astrocytes, l'AAV-gfaABC1D-GCaMP6f. Nos essais précédents montrent que l'infection est optimale 10 jours post-infection. Dans certaines expériences, en raison d'un conflit de fluorescence avec la GFP, les tranches ont été incubées avec la sonde Rhod-2 AM (Invitrogen; #R1245MP), un indicateur Ca^{2+} qui marque préférentiellement les astrocytes (Carlsen et al., 2021; Otsu et al., 2015). Les tranches sont incubées à 32-34°C pendant 1h, à l'abri de la lumière dans de l'aCSF oxygéné contenant 0.02% d'acide pluronic F-127 (Merck Sigma Aldrich; #P2443) et 0.2% de DMSO (Merck Sigma-Aldrich; #D4540) en présence de 10 µM de Rhod-2 AM. Après incubation, les tranches sont rincées pendant au moins 15 minutes pour permettre la dé-estérification de la sonde.

2. Acquisition

L'acquisition du signal de jRGECO1a et de la GCaMP6f est réalisée de manière simultanée à l'aide d'un laser à impulsions femtosecondes (Chameleon Ultra II; Coherent,

Santa Clara, CA) avec une longueur d'onde d'excitation de 960 nm. Pour l'acquisition du signal de la Rhod-2 AM, le fluorophore est excité à 840 nm.

B. Imagerie du pH intracellulaire astrocytaire

1. Préparation du tissue

Pour visualiser les fluctuations du pH intracellulaire des astrocytes, les tranches ont été incubées avec la sonde fluorescente BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetomxymethyl Ester)). L'incubation des tranches se fait à 32-34°C pendant 45 min à l'abri de la lumière dans de l'aCSF oxygéné contenant 0.02% d'acide pluronic F-127 (Merck Sigma Aldrich; #P2443) et 0.1% DMSO (Merck Sigma-Aldrich; #D4540) en présence de 5 µM de BCECF-AM. Après incubation, les tranches sont rincées pendant au moins 15 min pour permettre la dé-estérification de la sonde. Cette sonde est sensible au pH intracellulaire dans une gamme physiologique allant de pH 6 à 8. À pH élevé, l'intensité de fluorescence est forte, tandis qu'à des pH bas, l'intensité de fluorescence diminue. Bien que le BCECF marque préférentiellement les astrocytes (Theparambil et al, 2020), le phénotype astrocytaire est confirmé par une co-visualisation avec la Tdtomato exprimée sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire.

2. Acquisition

L'acquisition du signal de BCECF est effectuée à l'aide d'un laser à impulsions femtosecondes (Chameleon Ultra II; Coherent, Santa Clara, CA) avec une longueur d'onde d'excitation de 820 nm.

VI. Composés pharmacologiques

Au cours de cette thèse plusieurs solutions et composés pharmacologiques différents ont été utilisés. L'ensemble de ces solutions et composés est répertorié dans le tableau ci-après.

Composé	Concentration	Fonction	Solubilité		Provenance	Référence
Tetrodoxin (TTX)	0.5 µM	Supprimer les potentiels d'action	H_2O	aCSF	Tocris Bioscience	#1078
Barium chloride (Ba^{2+})	100 µM	Bloquer les cannaux Kir4.1	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#217565
N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)	20 µM	Induire la locomotion fictive / Induire des oscillations neuronales	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#M3262
N-methyl-DL-aspartic acid (NMA)	12 µM	Induire la locomotion fictive / Induire des oscillations neuronales	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#M2137
5-hydroxytryptamine creatine sulfate (5-HT)	20 µM	Induire la locomotion fictive / Induire des oscillations neuronales	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#S2805
Dopamine hydrochloride (DA)	50 µM	Induire la locomotion fictive / Induire des oscillations neuronales	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#H8502
1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N0,N0-tetraacetic acid (BAPTA)	30 mM	Chélater le calcium intraceullaire	H_2O	Solution intracellulaire	Sigma-Aldrich	#A9801
S0859	100 µM	Bloquer le transporteur NBCe1	H_2O	aCSF	Abmole Europe Branch (Forlab)	#M5069
DHK	300 µM	Bloquer le transporteur GLT-1	H_2O	aCSF	Tocris Bioscience	#0111/1
DL-TBOA	100 µM	Bloquer le transporteur GLT-1/GLAST	DMSO 0,1%	aCSF	Tocris Bioscience	#1223
L-glutamate	1 mM / 10 µM	Augmenter l'activité du réseau	H_2O	aCSF / pipette de puff		
Cadmium (Cd^{2+})	0.1 mM	Bloquer les canaux calciques voltage dépendant	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#265365
TEA	10 mM	Bloquer les canaux potassiques voltage dépendant	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#T2265
Sodium Propionate	5mM	Acidification	H_2O	aCSF	Sigma-Aldrich	#P1880

Table 4 : Ensemble des composés pharmacologiques

VII. Immunohistochimie

A. Préparation du tissu

Après extraction, les moelles épinières sont fixées pendant 5-6h dans 4% de paraformaldéhyde (PFA), rincées dans un tampon salin phosphate (PBS) puis placées dans une solution de PBS à 20% de sucrose à 4°C toute la nuit. La région lombaire est isolée et congelée dans un milieu OCT (Tissue Tec) au congélateur (-80°C) jusqu'à utilisation. À l'aide d'un cryostat des coupes sériées de 30 µm sont réalisés au niveau des segments d'intérêts. Les coupes sont (i) rincées 3 x 5min au PBS ; (ii) bloquées avec une solution de PBS contenant 1% de BSA, 3% NDS et perméabilisées avec du 0.2% triton X-100 ; incubées à 4°C dans une solution contenant les anticorps primaires pendant 12h ou 24h selon les anticorps ; (iii) rincées 3 x 5min au PBS ; (iv) incubées pendant 2h dans la solution de blocage ; (v) rincées 3 x 5min au PBS ; (vi) puis recouvertes d'un milieu aqueux gélatineux content Hoechst, un marqueur nucléaire. Si l'étude se compose de deux groupes d'animaux distincts, les deux phénotypes sont montés sur la même lame.

La liste des différents anticorps primaires utilisés au cours de cette thèse sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Cible	Espèce hôte	Catégorie	Type	Dilution	Provenance	Référence
GFAP	Rabbit	Polyclonal	Primaire	1:1000	Dako	Z0334
Kir4.1	Rabbit	Polyclonal	Primaire	1:1000	Alomone/Merck	APC-035/AB5818
NeuN	Mouse/Rabbit	Monoclonal/polyclonal	Primaire	1:200	Millipore	MAB377 / ABN78
MMP9	Goat	Monoclonal	Primaire	1:500	Sigma-Aldrich	M9570
C3d	Goat	Polyclonal	Primaire	1 :20	RD systems	AF2655
Stat3	Rabbit	Polyclonal	Primaire	1:200	Cell signaling	P40763

Table 5 : Liste des différents anticorps utilisés

B. Acquisition des marquages

Pour toutes les acquisitions, les coupes sont observées à l'aide d'un microscope confocal (LSM700, Zeiss) équipé d'objectifs à air 10X ou 20X ou d'objectifs à huile 40X ou 63X. Les paramètres d'acquisitions sont définis à l'aide du logiciel Zen (Zeiss). Si l'étude se compose de deux groupes d'animaux distincts, les paramètres du laser sont strictement conservés pour l'ensemble des acquisitions.

VIII. Western Blot

Après extraction, les moelles épinières sont immédiatement congelées à -80°C jusqu'à extraction des protéines. Les tissues sont homogénéisés sur glace à l'aide d'un tampon de lyse (250 mM sucrose, 3.9 mM Tris pH 7.5, 10 mM iodoacetamide) combiné à des inhibiteurs de protéases (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche 11836170001). Le reste du matériel cellulaire non solubilisé est séparé par une centrifugation à 7000g pendant 5 min à 4°C puis éliminé. Le surnageant est confronté à une deuxième centrifugation à 19 000 g pendant 70 min à 4°C. Les débris issus de cette centrifugation correspondent à la fraction enrichie en membrane cellulaire. Cette fraction est re-suspendue sur glace dans un tampon de lyse (PBS 1X, 1% IGEPAL, CA-630 1%, SDS 0.1%) combiné à des inhibiteurs de protéases (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche 11836170001). Les concentrations en protéines sont déterminées à l'aide d'un kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher 23227).

Les expressions des protéines d'intérêts sont analysées grâce à un système de western blot à capillaires automatiques à partir du module de séparation allant de 12 à 230 kDa. Un total protéique de 0,1 mg/ml est utilisé.

Les échantillons sont chargés soit avec l'anticorps Kir4.1 (1 :60 ; Alomone APC-035 ; Polyclonal ; lapin) ou l'anticorps NBCe1 (1 :90 Alomone ANT-075 ; Polyclonal ; lapin). Les échantillons sont normalisés en fonction de la détection de leur propre total protéique (DM-TP01 ProteinSimple).

IX. Test comportementaux

Toutes les expériences sont réalisées en aveugle par l'expérimentateur.

A. Analyse du pattern locomoteur avec le système catwalk

Le système CatWalkXT (v10,3, Noldus Information Technology, Pays Bas) a été utilisé dans le but de mesurer le pattern et performance de la marche chez la souris. Le comportement locomoteur a été analysé chez des souris agées entre P12 et P18, dès lors que le poids de l'animal est suffisant pour une détection optimale des patterns de pas. Chaque animal est déposé dans un couloir (Largeur 5cm ; Longueur 1m50) afin de marcher librement

sur un revêtement en verre éclairé par des faisceaux lumineux situé dessous. Pour qu'un essai de marche soit validé, l'animal doit effectuer un passage fluide, linéaire et sans arrêt, 3 à 5 essais sont recueillis par animal. Au cours du passage les empreintes de pas sont recueillis à l'aide d'une caméra placée au-dessous du revêtement de verre. Les paramètres spatio-temporels de la marche à partir des empreintes de pas sont ensuite analysés à l'aide du logiciel CatWalk.

B. Rotarod

Les souris ont été placées sur un rotarod (BioSeb) tournant selon une accélération allant de 4 rpm à 40 rpm en 5 min. La durée que met l'animal à tomber du dispositif est mesurée à partir du départ jusqu'à la chute de l'animal sur la plateforme de manière automatique. Chaque souris expérimente 3 essais séparés de 1 min de repos.

C. Test de nage forcée

Le test de nage forcé est complémentaire aux tests précédents puisqu'il s'affranchit du support de poids de l'animal du fait de l'absence de contrainte gravitaire. Les souris ont été placés individuellement au centre d'une cuve (18900 cm^3) remplie d'eau chauffé à 30-32 °C. À la fin de l'essai, la souris est immédiatement retirée de la cuve, séchée avec une serviette de papier et remise dans sa cage d'origine sous une lampe chauffante. La distance et la vitesse de nage sont quantifiées à partir des vidéos à l'aide du système de suivi vidéo automatisé Ethovision (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). Du fait de la haute intensité et stress occasionnés par ce test, celui-ci est limité à un seul et unique essai et cela sans aucun autre test comportemental effectué le même jour.

D. Analyse cinématique des spasmes musculaires

Pour quantifier l'occurrence des spasmes après une lésion de la moelle épinière de manière non invasive, un algorithme de machine learning nommé DeeplLabCut a été utilisé. Celui-ci permet de suivre la position de point défini sans marqueur physique placé sur l'animal (Figure 40). Les points de suivi ont été placés sur le pied gauche et droit de la souris, la cheville,

le genou et la hanche. Les animaux sont placés en contention manuelle puis (i) enregistrés à l'aide d'une caméra en 240 FPS pendant 20 s.



Figure 40 : Exemple de suivi automatique de points spécifique par DeepLabcut chez une souris.

Après une étape de (ii) positionnement manuelle des points de suivi par l'expérimentateur ; (iii) l'algorithme resnet50 est entrainé pour 300 000 itérations afin d'atteindre une marge d'erreur < 5 pixels ; (iv) les vidéos sont analysés par l'algorithme et les coordonnées (x ;y) des points de suivi sont transférés dans un fichier excel. À l'aide de script python personnel plusieurs paramètres sont quantifiés tel que : la fréquence (spasmes/min), l'accélération (fram/deg) et l'amplitude des spasmes (variation de l'angle de la cheville).

X. Analyse des données

L'ensemble des analyses des différentes données seront détaillés au sein de la section résultats dans les sections « matériels et méthodes ».

XI. Tests statistiques

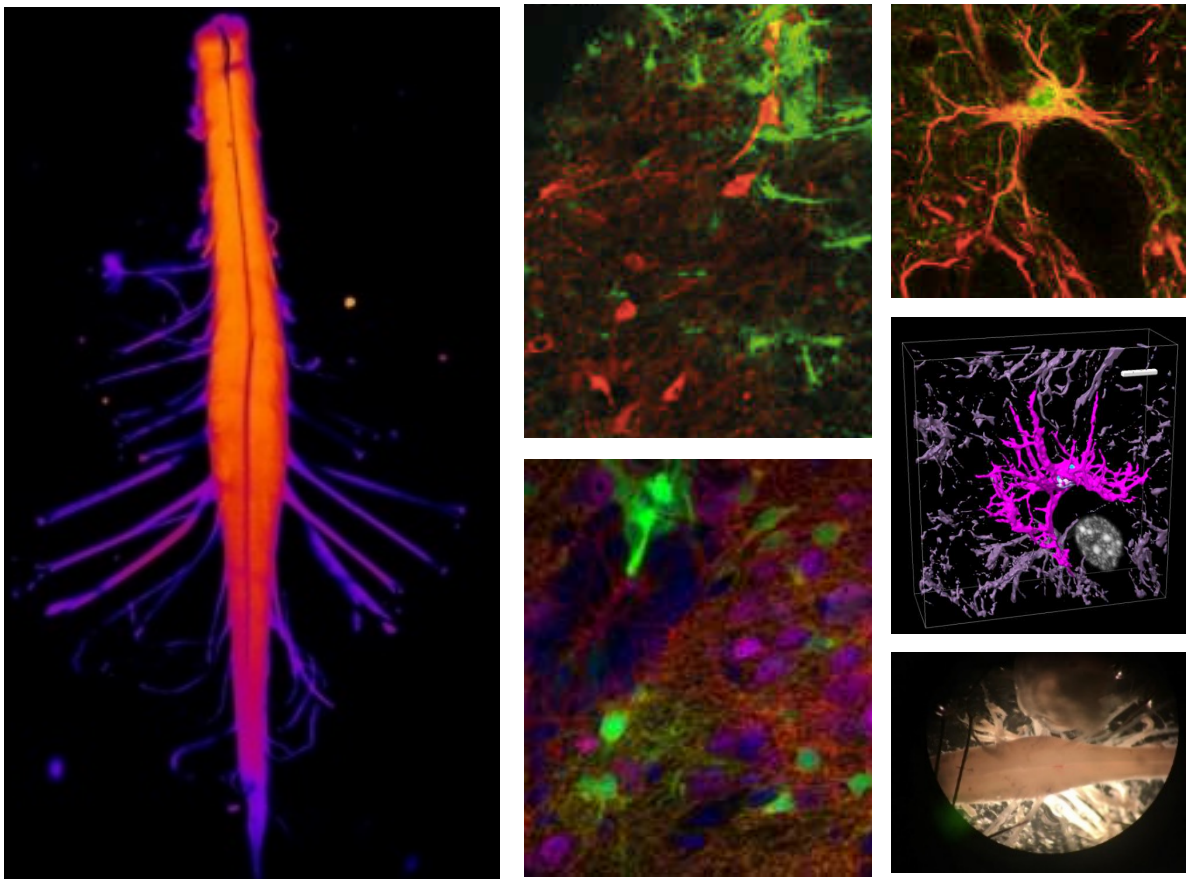
L'ensemble des résultats de cette thèse sont présentés sous la forme de type moyenne +- l'erreur standard. Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 8. La normalité des distributions des données est testée pour les effectifs supérieurs à 50 par un test de Shapiro Wilk. Si les données suivent une loi normale, le t-test est utilisé pour comparer deux groupes et une ANOVA pour les comparaisons multiples (>2). Pour les effectifs < 50 ou pour les données ne suivant pas une loi normale, le test Mann-Whitney est utilisé pour comparer deux groupes et le test de Kruskal-Wallis pour les comparaisons multiples (>2). Pour des comparaisons multiples de plusieurs groupes différents, le test de comparaisons multiple de Sidak est utilisé. Dans le cas de données de type apparié, le test Wilcoxon est utilisé. Pour quantifier des différences dans des données

sous forme de proportion le test de Fischer est réalisé. Les différences significatives sont représentées dans les figures par des astérisques (*p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001).

RÉSULTATS

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.
Ici, nous avons réuni théorie et pratique.
Rien ne fonctionne… et personne ne sait pourquoi »

Albert Einstein
Mathématicien, Physicien, Scientifique (1879 – 1955)

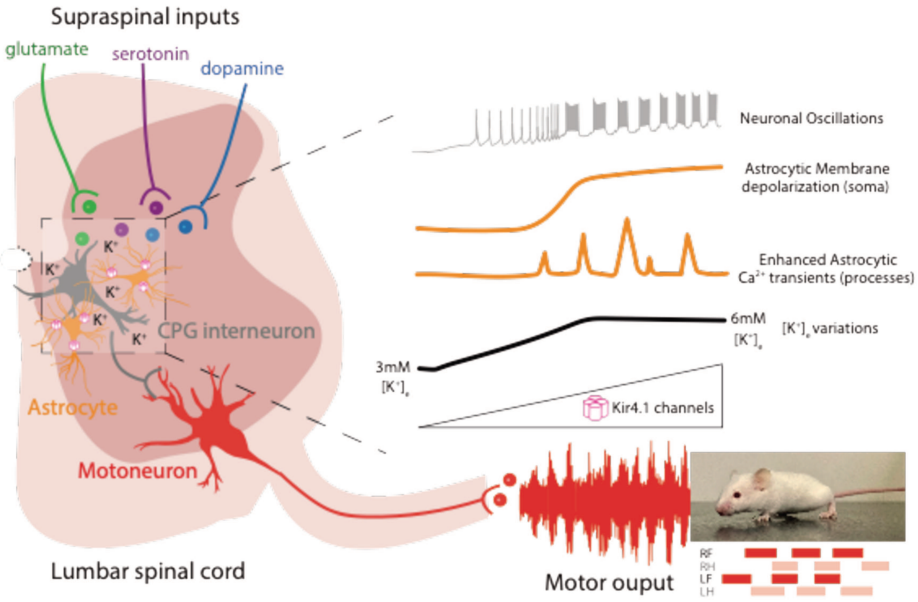


Compilation d'images obtenues dans l'équipe au cœur de ma thématique de thèse.
A gauche une moelle épinière lombaire de souris illustrant la face ventrale avec les longues racines de part et d'autre. A droite (haut), image fluorescence en microscopie 2 photons illustrant le Ca^{2+} dans les neurones (rouges) et les astrocytes (vert) mettant en lumière le dialogue neurone astrocyte. En bas, image immunofluorescente au niveau du canal central comprenant les astrocytes (vert), les canaux Kir4.1 (rouge), les neurones (rose) ainsi que le noyau (bleu) illustrant la forte interaction des astrocytes au niveau des interneurones du GPC locomoteur. A droite en haut, mon image favorite de toute ma thèse, illustrant un astrocyte réactif (Rouge GFAP et vert Aldh1L1) englobant parfaitement une cellule laissant deviner un large motoneurone. En dessous (millieu droite), reconstruction en 3D de l'astrocyte décrit juste précédemment. En bas à droite, pour finir, photographie à l'aide d'un téléphone portable au travers d'un loupe binoculaire illustrant une moelle épinière lombaire mis en place pour une expérience de locomotion fictive.

I. Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network

RÉSUMÉ :

La rythmogènese neuronale dans la moelle épinière est corrélée aux variations ioniques de $[K^+]_e$. Les astrocytes jouent un rôle important dans l'homéostasie de $[K^+]_e$ et influent l'activité neuronales. Cependant, il n'est pas clair comment les oscillations neuronales sont régulées par l'homéostasie astrocytaire du K^+. Ici, nous identifions le canal astrocytaire Kir4.1 comme un acteur moléculaire clé pour la rythmicité neuronale dans GPC spinal. En combinant l'imagerie calcique biphotonique, l'électrophysiologie, l'immunohistochimie et des outils génétiques, nous avons mise en évidence que (1) les astrocytes répondent aux changements des ions extracellulaires sous-jacents aux oscillations neuronales, (2) de manière concomitante avec une hausse de l'activité Ca^{2+} autour des neurones voisins du GPC. Après avoir confirmé (3) l'expression des canaux Kir4.1 dans les astrocytes du CPG, nous avons montré qu'une (4) inhibition des signaux Ca^{2+} astrocytaires avec le BAPTA diminue le courant Kir4.1 sensible au Ba^{2+} responsable de la recapture du K+. Enfin, (5) nous montrons que la réduction de l'expression de Kir4.1 dans les astrocytes empêche progressivement les oscillations neuronales et (6) altère le schéma locomoteur, entraînant des performances motrices réduites lors de tâches exigeantes. Ces données identifient les canaux Kir4.1 des astrocytes comme régulateurs clés de la rythmogenèse neuronale dans le GPC conduisant la locomotion.



Check for updates

Received: 18 August 2022 | Revised: 22 December 2022 | Accepted: 2 January 2023
DOI: 10.1002/glia.24337

GLIA
WILEY

RESEARCH ARTICLE

Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network

Tony Barbay[1] | Emilie Pecchi[1] | Myriam Ducrocq[1] | Nathalie Rouach[2] | Frédéric Brocard[1] | Rémi Bos[1]

[1]Aix Marseille Univ, CNRS, Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, Marseille, France

[2]Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France

Correspondence
Rémi Bos, Aix Marseille Univ, CNRS, Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, Marseille, France.
Email: remi.bos@univ-amu.fr

Funding information
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-16-CE16-0004; Centre National de la Recherche Scientifique, Grant/Award Number: FI_INT_JCJC_2019; Ministère de l'Enseignement Superieur, de la Recherche et de l'Innovation, Grant/Award Number: MESRI_2021_BARBAY

Abstract

Neuronal rhythmogenesis in the spinal cord is correlated with variations in extracellular K^+ levels ($[K^+]_e$). Astrocytes play important role in $[K^+]_e$ homeostasis and compute neuronal information. Yet it is unclear how neuronal oscillations are regulated by astrocytic K^+ homeostasis. Here we identify the astrocytic inward-rectifying K^+ channel Kir4.1 (a.k.a. *Kcnj10*) as a key molecular player for neuronal rhythmicity in the spinal central pattern generator (CPG). By combining two-photon calcium imaging with electrophysiology, immunohistochemistry and genetic tools, we report that astrocytes display Ca^{2+} transients before and during oscillations of neighboring neurons. Inhibition of astrocytic Ca^{2+}-transients with BAPTA decreases the barium-sensitive Kir4.1 current responsible of K^+ clearance. Finally, we show in mice that Kir4.1 knockdown in astrocytes progressively prevents neuronal oscillations and alters the locomotor pattern resulting in lower motor performances in challenging tasks. These data identify astroglial Kir4.1 channels as key regulators of neuronal rhythmogenesis in the CPG driving locomotion.

KEYWORDS
astrocytes, Kir4.1, locomotion, neuronal oscillations, potassium clearance, spinal cord

1 | INTRODUCTION

Mammalian locomotion relies on repeated sequences of muscle contractions triggered by a rhythmic central pattern generator (CPG) network, which is mainly located in the ventromedial part of the lumbar spinal cord (Grillner & El Manira, 2020; Kiehn, 2016). Activation of the spinal CPG network is triggered by descending inputs releasing neuromodulators such as glutamate, serotonin and dopamine. Several populations of CPG interneurons—V0, V2a and Hb9—display conditional rhythmic oscillations in response to neuromodulators (Grillner & El Manira, 2020; Kiehn, 2016). No single population of ventromedial interneurons appears to act alone or to orchestrate the entire CPG pattern. The spinal rhythmogenesis emerges from the synchronization of individual neurons with intrinsic bursting properties (Brocard et al., 2010). Despite decades of research, the functional organization of the locomotor CPG remains still unclear.

In the spinal locomotor CPG, physiological variation in extracellular K^+ ($[K^+]_e$) coincides with the emergence of the oscillatory pattern of intrinsic bursting neurons (Brocard et al., 2013), and thus powers up the motor output (Bos et al., 2018; Bracci & Nistri, 1998). At rest, $[K^+]_e$ is kept close to 3 mM in serum levels (Kofuji & Newman, 2004; Verkhratsky et al., 2018). The maintenance of K^+ homeostasis is one of the crucial supportive functions mediated by astrocytes (Ben Haim et al., 2015; Sibille et al., 2015). In addition, to display a high resting K^+

Tony Barbay and Emilie Pecchi contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *GLIA* published by Wiley Periodicals LLC.

conductance that facilitates the uptake of neuron released K^+, astrocytes have a hyperpolarized resting membrane potential (RMP). Both parameters rely on the activity of the weakly inwardly rectifying Kir4.1 K^+ channel, which in the nervous system is expressed exclusively in glial cells, with the highest expression in astrocytes (Kelley et al., 2018). Astrocytic Kir4.1 channels have been described in many CNS regions, including the spinal cord (Olsen et al., 2006; Ransom & Sontheimer, 1995). Studies using genetic, pharmacological and modeling approaches in the brain networks identified Kir4.1 as the main astrocytic inwardly rectifying K^+ channel regulating $[K^+]_e$ and thus influencing neuronal excitability (Nwaobi et al., 2016; Sibille et al., 2015).

Astrocytes display ramified processes enwrapping synapses, placing them in an ideal position to (i) sense synaptic activity (Panatier et al., 2011) and (ii) adjust network activity by releasing gliotransmitters (Araque et al., 2014; Savtchouk & Volterra, 2018). Rhythmic oscillations are strongly affected in brain networks when gliotransmission is genetically or pharmacologically modified (Lee et al., 2014; Sheikhbahaei et al., 2018). In the spinal motor network, the locomotor oscillatory rhythm is correlated with enhanced calcium (Ca^{2+}) transients in astrocytes (Broadhead & Miles, 2020), which likely triggers ATP release (Witts et al., 2015), modulating excitatory synaptic transmission (Carlsen & Perrier, 2014). Thus, growing evidence point to the contribution of gliotransmission in modulating neuronal rhythmogenesis (Montalant et al., 2021). Astrocytes can also respond to neurotransmitters and neuromodulators (Paukert et al., 2014; Rosa et al., 2015) by modifying $[K^+]_e$, which greatly impact brain oscillations (Bellot-Saez et al., 2018; Ding et al., 2016; Sibille et al., 2015). However, the mechanisms underlying the contribution of astrocytic K^+ homeostasis to rhythmogenesis remain incompletely understood.

Here we investigated whether astrocyte K^+ uptake modulates neuronal oscillations patterns in the spinal CPG network. We demonstrate that most of the ventromedial astrocytes are active during neuronal oscillations, and that the inwardly-rectifying Kir4.1 channels are crucial for maintaining neuronal oscillations, which ultimately influence the locomotor activity. This study places astrocytes as central elements of the spinal cord locomotor CPG.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental model

2.1.1 | Mice

Mice of either sex (P3–P4 for fictive locomotion experiments, P5–P14 for Patch-clamp recording, P13–P16 for two-photon Ca^{2+} imaging, P12–P13 for swimming tests, P14–P15 for rotarod tests, P14–P18 for Catwalk tests) were housed under a 12 h light/dark cycle in a temperature-controlled area with ad libitum access to water and food. Hb9-eGFP mice (C57/Bl6 background) expressing GFP in ventromedial oscillatory interneurons were provided by the Jackson laboratory (Strain #005029) and the *Aldh1L1*-eGFP mice (CD1 background) expressing GFP in astrocytes were kindly provided by Nathalie Rouach (Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France). Animals from different litters were used for each experiment. Sample sizes (number of spinal cords and/or cells) for each experiment are indicated in figure legends. All animal care and use were conformed to the French regulations (Décret 2010-118) and approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique en Neurosciences INT-Marseille, CE71 Nb A1301404, authorization Nb 2018110819197361).

2.2 | Experimental procedures

2.2.1 | shRNA constructs

Specific shRNA sequence designed to knockdown *Kir4.1* transcript (Cui et al., 2018) was incorporated into an adeno-associated viral (AAV) vector (serotype 9), which features a H1 promoter to drive shRNA expression and a CAG promoter to drive eGFP expression for identification of transduced cells (Cui et al., 2018). We also used a non-targeting shRNA sequence (Luciferase) which has no homology to any known genes in mouse as a control. AAV were produced following standard protocols (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Fourth Edition, 2012) with minor modifications. Briefly, HEK293T cells were transfected with the three plasmids (pRC, pHelper and pAAV) using the $MgCl_2$ method. After 60–72 h, AAV particles from the cells and the medium were recovered and concentrated using Takara AAV-Purification All serotypes kit (Takara). We systematically included a digestion step with cryonase to degrade non-encapsidated viral genomes. Viral particles were quantified using quantitative PCR (Takara Titration kit). Vectors titers range was between 2×10^{11} and 3×10^{12} vectors/ml.

2.2.2 | Intrathecal vector delivery

A minimally-invasive technique was used to micro-inject adeno-associated viral (AAV) vectors into the T13-L1 intervertebral space. Briefly, in pups cryoanesthetized at birth, the intervertebral space was widened by flexing the spine slightly. The tip of the microcapillary preloaded with the AAV particles was lowered into the center of the T13-L1 intervertebral space. A total volume of 2 µl /animal was then progressively injected (1 µl/5 s).

2.2.3 | Ex vivo preparations and aCSF solutions

i. *For the slice preparation*, the lumbar spinal cord was isolated in ice-cold (+4°C) artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) solution composed of the following (in mM): sucrose (252), KCl (3), NaH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (4), $CaCl_2$ (0.2), $NaHCO_3$ (26), D-glucose (25), pH 7.4. The lumbar spinal cord was then introduced into a 4% agar solution, quickly cooled, mounted in a vibrating microtome (Leica, VT1000S) and sliced (325 µm) through the L1–2 lumbar segments. Slices were immediately transferred into the holding chamber filled with bubbled (95% O_2 and 5% CO_2) standard aCSF composed of

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

(in mM): NaCl (120), KCl (3), NaH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (1.3), $CaCl_2$ (1.2), $NaHCO_3$ (25), D-glucose (20), pH 7.4, 30–32°C. After a 30–60 min resting period, individual slices were transferred to a recording chamber continuously perfused with standard aCSF heated to 32–34°C. The oscillatory aCSF characterized by higher extracellular K^+ and lower Ca^{2+} (Brocard et al., 2013) was composed of the following (in mM): NaCl (120), KCl (6), NaH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (1.3), $CaCl_2$ (0.9), $NaHCO_3$ (25), D-glucose (20). The rhytmogenic cocktail (Ziskind-Conhaim et al., 2008) that we called neuromodulator cocktail in this study, was composed of the following (in µM): tetrodotoxin (TTX, 0.5–1), N-methyl-D-aspartate (NMDA, 20), *5-hydroxytryptamine (5-HT, 20)*, dopamine (DA, 50).

ii. *For the whole-spinal cord preparation*, the spinal cord was transected at T8-9, isolated and transferred with intact dorsal and ventral roots to the recording chamber. The tissue was continuously bubbled (95% O_2 and 5% CO_2) and perfused with heated (~27–28°C) standard aCSF solution composed of (in mM): 120 NaCl, 4 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 1.3 $MgSO_4$, 1.2 $CaCl_2$, 25 $NaHCO_3$, 20 D-glucose, pH 7.4. The oscillatory aCSF was composed as described above. The neuromodulator cocktail was composed of the following (in µM): N-methyl-DL-aspartate (NMA, 12), *5-hydroxytryptamine (5-HT, 5)*.

2.2.4 | Ex vivo recordings

i. *For the slice preparation*, whole-cell patch-clamp recordings of L1–L2 ventromedial interneurons and astrocytes were performed using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices). The apparatus was equipped with two headstages, allowing recordings of pairs of cells. Patch electrodes (4–5 MΩ for neurons) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.12 mm ID; World Precision Instruments) on a Sutter P-97 puller (Sutter Instruments Company) and filled with an intracellular solution (in mM): K^+-gluconate (140), NaCl (5), $MgCl_2$ (2), HEPES (10), EGTA (0.5), ATP (2), GTP (0.4), pH 7.3. For GFP+ astrocyte recordings, pipettes (7–9 MΩ) were filled with an intracellular solution (in mM): K^+-gluconate (105), NaCl (10), KCl (20), $MgCl_2$ (0.15), HEPES (10), EGTA (0.5), ATP (4), GTP (0.3), pH 7.3. In some recordings, 30 mM of BAPTA was added in the pipette solution to chelate intracellular free Ca^{2+} from the intracellular stores. In some experiments, GFP negative astrocytes were identified on the basis of their morphology (i.e., small somata with a diameter of <10 µm surrounded by many processes) and their electrophysiological properties (i.e., a hyperpolarized RMP (<−75 mV), a linear I/V relationship, no spike in response to increased injection currents and a low input resistance (<100 MΩ)). When GFP negative, some astrocytes were filled with Alexa Fluor® 488 or 594 (25 µM) diluted in the intracellular solution. Pipette and neuronal capacitive currents were canceled and, after breakthrough, the series resistance was compensated and monitored. Recordings were digitized on-line and filtered at 10 kHz (Digidata 1550B, Molecular Devices). All experiments were designed to gather data within a stable period (i.e., at least 1–2 min after establishing whole-cell access).

ii. *For the whole spinal cord preparation*, motor outputs were recorded from L2 lumbar ventral roots by means of glass suction electrodes connected to an AC-coupled amplifier. Signals from the electrodes placed in contact with the ventral root recordings were amplified (×2000), high-pass filtered at 70 Hz, low-pass filtered at 3 kHz, and sampled at 10 kHz. Custom-built amplifiers enabled simultaneous online rectification and integration (100 ms time constant) of raw signals. Locomotor-like activity was induced by (i) rising $[K^+]_e$ to 6 mM and decreasing $[Ca^{2+}]_e$ to 0.9 mM (oscillatory aCSF, see above) or (ii) bath application of the neuromodulator cocktail composed of N-methyl-DL aspartate (NMA, 12 µM) and 5-hydroxytryptamine (5-HT, 5 µM).

2.2.5 | Two-photon Ca^{2+} imaging

Two-photon fluorescence measurements were obtained with a dual-scanhead two-photon microscope (FemtoS-Dual, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary) and made using an Olympus XLUMPlanFL N 20×, 1.00 (Olympus America, Melville, NY). Two-photon excitation of Gcamp6f and jRGECO1a was simultaneously evoked with a femtosecond pulsed laser (Chameleon Ultra II; Coherent, Santa Clara, CA) tuned to 960 nm. In some experiments, slices were loaded with the Ca^{2+} indicator Rhod-2 AM (10 µM, Invitrogen; #R1245MP) which preferentially label astrocytes (Carlsen et al., 2021; Otsu et al., 2015) at 32–34°C for 1 h, in dark, with 0.02% Pluronic F-127 (Merck Sigma-Aldrich; #P2443) 0.2% DMSO (Merck Sigma-Aldrich; #D4540) in standard bubbled aCSF. After incubation, slices were washed for at least 15 min to allow the de-esterification of the dye. For Rhod-2 AM experiments fluorophore was excited at 840 nm and astrocytes were identify based on their small size (~10 µm) and characteristic morphology of a round soma surrounded by many processes.

The microscope system was controlled by MESc acquisition software (https://femtonics.eu/femtosmart-software/, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary). A single acquisition plane was selected and full-frame imaging was started in a resonant scanning mode at 30.5202 Hz. Scan parameters were [pixels/line × lines/frame (frame rate in Hz)]: [512 × 519 (30.5202)]. Scanning area was 468 µm × 474 µm. This microscope was equipped with two detection channels for fluorescence imaging.

2.2.6 | Immunohistochemistry

Spinal cords of 10 to 12-day-old mice were dissected out and fixed for 5–6 h in 4% paraformaldehyde (PFA), then rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and cryoprotected overnight in 20% sucrose at 4°C. Spinal cords were frozen in OCT medium (Tissue Tek) and 30 µm cryosections were collected from the L1–L2 segments. After having been washed in PBS 3 × 5 min, the slides were incubated for 1 h in a blocking solution (BSA 1%, Normal Donkey Serum 3% in PBS) with

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

0.2% triton X-100 and for 48 h at 4°C in a humidified chamber with the primary antibody anti-Kir4.1 (Alomone, #APC035, 1/1000) or for 12 h at 4°C with the primary antibody anti-NeuN (Merck Millipore, #MAB377, 1/200), or for 12 h at 4°C with the primary antibody anti-MMP9 (Merck Sigma-Aldrich, #M9570, 1/500). All antibodies were diluted in the blocking solution with 0.2% triton X-100. Slides were then washed 3 × 5 min in PBS and incubated for 2 h with an Alexa Fluor® Plus 555- conjugated secondary antibody (Invitrogen #A32794, 1/400), an Cy5-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, #715-175-151, 1/400) or Alexa Fluor® Plus 555-conjugated secondary antibody (Invitrogen #A32816, 1/400) diluted in the blocking solution. After three washes of 5 min in PBS, they were mounted with a gelatinous aqueous medium containing Hoechst 33342 (ThermoFisher, #62249, 1/10000, initial concentration: 20 mM). Images were acquired using a confocal microscope (LSM700, Zeiss) equipped with either a 20× air objective, a 40× oil objective or a 63× oil objective and processed with the Zen software (Zeiss).

2.2.7 | Kir4.1 protein analysis by capillary western blot

The lumbar parts of the spinal cords were dissected in standard aCSF at 4°C and conserved at −80°C until protein extraction. Tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer (250 mM sucrose, 3.9 mM Tris pH 7.5, 10 mM iodoacetamide) supplemented with protease inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche 11836170001). Unsolubilized material was pelleted by centrifugation at 7000×*g* for 5 min at 4°C and discarded. The supernatants were subjected to an additional centrifugation step at 19,000 x g for 70 min at 4°C. The resulting pellets corresponding to the membrane-enriched fraction were resuspended in ice-cold lysis buffer (PBS 1×, 1% IGEPAL® CA-630 1%, SDS 0.1%) supplemented with protease inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche 11836170001). Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher 23227). Kir4.1 expression was then analyzed using the 12–230 kDa separation module (SM-W004 ProteinSimple) on an automated capillary western blotting system ('Jess' ProteinSimple) according to the manufacturer's protocol with small modifications. Samples were not implemented with DTT and they were not submitted to heat denaturation in order to keep proteins in a more 'native' form. A total protein concentration of 0.1 mg/ml was used. Samples were probed with a rabbit polyclonal Kir4.1 antibody (1:60; Alomone APC-035) and revealed with the appropriate detection module (DM-001 ProteinSimple). Loaded samples were normalized to their own total protein content using the 'total protein detection module' (DM-TP01 ProteinSimple).

2.2.8 | Assessment of in vivo motor behaviors

i. *Walking*. The CatWalkXT (Noldus Information Technology, Netherlands) was used to measure walking performance. Each animal walked freely through a corridor on a glass walkway illuminated with beams of light from below. A successful walking trial was defined as having the animal walk at a steady speed (no stopping, rearing, or grooming), and three to five successful trials were collected per animal. The footprints were recorded using a camera positioned below the walkway, and footprint classification was manually corrected to ensure accurate readings. The paw print parameters were then analyzed using the CatWalk software (see Section 2.3).
ii. *Rotarod test*. Mice were placed on a rotarod (Bioseb) rotating at an accelerating from 4 to 40 rpm over a span of 5 min. Mice were given three trials with a 60 s inter-trial interval.
iii. *Swimming*. Mice were gently placed individually in the center of the tank (~19,000 cm^3) filled with heated water (30–33°C). Swimming distance and velocity were quantified during three consecutive 90 s periods. Each trial was spaced by a 10 min interval. At the end of the trial, the mouse was immediately removed from the tank, dried off with a paper towel, and returned to its home cage. Swimming parameters tracking and analysis were performed by using an automated video-tracking Ethovision system (Noldus). All behavioral experiments were carried out with the experimenter blind to genotype.

2.2.9 | Drugs

All solutions were oxygenated with 95% O_2/5% CO_2. All salt compounds, *N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA, 20 µM; #M3262), dopamine hydrochloride (DA, 50 µM; #H8502) *N*-methyl-DL-aspartic acid (NMA, 12 µM; #M2137), 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (5-HT, 5–20 µM; #S2805), Barium chloride dihydrate (Ba^{2+}, 100 µM; #217565), and 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraacetic acid (BAPTA, 30 mM; #A9801) were obtained from Merck Sigma-Aldrich. Tetrodotoxin (TTX, 0.5-1 µM; #1078) from Tocris Bioscience. All drugs were dissolved in water and added to the standard aCSF.

2.3 | Data analysis

Electrophysiological data analyses were analyzed off-line with Clampfit 10.7 software (Molecular Devices).

i. For *intracellular recordings*, several basic criteria were set to ensure optimum quality of intracellular recordings. Only cells exhibiting a stable RMP, access resistance (<20% variation) and an action potential amplitude larger than 40 mV were considered. Passive membrane properties of cells (neurons and astrocytes) were measured by determining from the holding potential the largest voltage deflections induced by small current pulses that avoided activation of voltage-sensitive currents. We determined input resistance by the slope of linear fits to voltage responses evoked by small positive and negative current injections. All reported membrane potentials were corrected for liquid junction

potentials (+14 mV for neurons and +11.4 mV for astrocytes). To activate Kir-currents in spinal astrocytes, voltages were repeatedly stepped from −140 to 50 mV, in 10 mV increments. Astrocytes were initially clamped at their RMP. 100 μM Ba^{2+} was bath applied to the slice approximately 5 min after the start of the recording. The current amplitude was measured as the difference between the baseline level before the initial voltage step, and the mean amplitude over a 10 ms window starting 10 ms after onset of the hyperpolarizing voltage step. The Ba^{2+} sensitive current was obtained by subtracting the current after Ba^{2+} application from the current before application.

ii. For *extracellular recordings*, alternating activity between right/left L2 recordings was taken to be indicative of fictive locomotion. To characterize locomotor burst parameters (during 1–2 mins of steady state), raw extracellular recordings from ventral roots were rectified, integrated and resampled at 50 Hz. Peak amplitude and duration of locomotor burst were measured by using a threshold function and the cycle period was calculated by measuring the time between the first two peaks of the autocorrelogram. The coupling between right/left L2 was estimated by measuring the correlation coefficient of the cross-correlogram at zero phase lag.

2.3.1 | Analysis of firing patterns

Firing patterns of GFP+ interneurons were characterized as tonic or rhythmic bursting discharge in response to ions variations before or after pharmacological or genetic blockade of Kir.1 channels. Tonic discharge typically consisted of low-frequency single spikes (<10 Hz) separated by regular but relatively long intervals (interspike intervals: ISI of 200–600 ms). We defined bursts as depolarizing plateaus over-ridden by at least two actions potentials followed by a silent period. The period separating the beginning of two consecutive plateaus was used to calculate the inter-burst frequency in intracellular recordings. Bursting frequency was calculated only in neurons that displayed a stable rhythmic discharge for more than five cycles.

2.3.2 | Two-photon Ca^{2+} imaging analyses

Fluorescent time series depicting the Ca^{2+} changes occurring ex vivo in both the neurons and the astrocytes were analyzed with the MESc data acquisition software (Femtonics Ltd, Budapest, Hungary) and the MES curve analyzer tool. Briefly, regions of interest (ROIs) were manually selected based on the appearance of Ca^{2+} transients in the time series images. A signal was declared as a Ca^{2+} transient if it exceeded the baseline by greater than twice the baseline noise (SD). ROIs coincide with (i) active dendritic components for neurons, (ii) active microdomains or territories from the astrocytic processes in Gcamp6f experiments and (iii) active soma or main processes in Rhod-2 AM experiments. Astrocyte territory sizes were estimated by measuring the area of a ROI that surrounded the largest fluorescence projection profile of bushy astrocytes gathered from a series of z-stack images. The astrocytic ROIs were separated at least by a distance of 60 μm. The raw fluorescence Ca^{2+} traces were extracted to Excel and analyzed using custom Matlab scripts. They were transformed to show fluorescence change according to Equation (1):

$$\Delta F/F = (F_1 - F_0)/F_0, \quad (1)$$

where F is the fluorescence at any given point in time, and F_0 is the mean fluorescence value for the 5–10 s range, preceding the bath perfusion of the oscillatory aCSF or the neuromodulator cocktail. Following this, the signal-to-noise ratio (SNR) is:

$$\mathrm{SNR} = (\Delta F/F)_{\mathrm{peak}}/\sigma F,$$

where σF is the standard deviation of the baseline period. We took those events as a Ca^{2+} response that exceeded the threshold of two times the standard deviation of the baseline period. The peak amplitude, duration and frequency of the Ca^{2+} transients were analyzed by using a Matlab script. In each FOV where dorsal is up and ventral is down, all astrocytic Ca^{2+} transients above the central canal were considered as dorsal astrocytic activity and distinguished from the ventral astrocytic Ca^{2+} transients.

2.3.3 | In vivo behavioral analyses

For walking, the CatWalk XT software (Noldus Information Technology, Netherlands) was used to measure a broad number of spatial and temporal gait parameters in several categories. These include (i) dynamic parameters related to individual paw prints, such as duration of the step cycle with the respective duration of the swing and stance phases; (ii) parameters related to the position of paw prints with respect to each other, for example the stride length (distance between two consecutive placement of the same paw) and the base of support (the width between the paw pairs); (iii) parameters related to time-based relationships between paw pairs, as well as step patterns. These parameters were calculated for each run and for each paw. In the rotarod test the average latency of the subject to fall was recorded (in seconds). A video tracking system (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) was used to measure swimming performance. We ensured there was a smooth tracking curve and that the center point of the animal remained stable before analysis took place. Distance and velocity during the test periods were scored. All behavioral tests were carried out with the experimenter blind to genotype.

2.4 | Experimental design and statistical analysis

No statistical method was used to predetermine sample size. Group measurements were expressed as mean ± SEM. When two groups

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

were compared, we used the Mann–Whitney test. Fisher test was used to compare the percentages of oscillatory neurons. When two conditions (control vs drugs) were compared, we used the Wilcoxon matched pairs test. We also used a one-way or two-way ANOVA tests for multiple comparisons. For all statistical analyses, the data met the assumptions of the test and the variance between the statistically compared groups was similar. The level of significance was set at $p < .05$. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 9 software. They are all indicated in Figure legends and in Source data file.

3 | RESULTS

3.1 | Astrocytes respond to changes in extracellular ions underlying neuronal oscillations in the spinal CPG

Astrocytes from the ventromedial part of upper lumbar segments (L1–L2), the main locus of the locomotor CPG (El Manira, 2014; Kiehn, 2016), were recorded from transgenic mice expressing GFP under the control of the astrocytic *Aldh1L1* promoter (Tsai et al., 2012) (Figure 1a). This spinal region contains interneurons endowed with two types of inherent membrane oscillations at a frequency range similar to stepping rhythms: (i) one is mainly dependent on the persistent sodium current (INaP) (Tazerart et al., 2008) sensitive to tetrodotoxin (TTX), the voltage-dependent sodium channels blocker, and triggered by a rise in $[K^+]_e$ with a concomitant decrease in extracellular Ca^{2+} levels ($[Ca^{2+}]_e$) (Brocard et al., 2013), (ii) the other is TTX-insensitive dependent on the Ca^{2+} currents and triggered by a neuromodulator cocktail composed of 5-HT, dopamine and NMDA, in presence of TTX (Masino et al., 2012; Wilson et al., 2005; Ziskind-Conhaim et al., 2008). This neuromodulator cocktail mimics the effect of descending inputs from the hindbrain for inducing a locomotor rhythmicity (Grillner & El Manira, 2020). In recording conditions required to generate bursting cells, all astrocytes displayed a reversible depolarisation of their membrane potentials: (i) when $[K^+]_e$ was increased to 6 mM and $[Ca^{2+}]_e$ decreased to 0.9 mM (Figure 1b,c) or (ii) when the neuromodulator cocktail was applied in presence of TTX (Figure 1d,e). We observed that in absence of neuronal activity, neuromodulators increased $[K^+]_e$ to ~6 mM (Figure S1). To explore the temporal dynamics of the astrocytic response compared to neuronal oscillations, we performed dual recordings of a ventromedial Hb9 GFP+ interneuron which is known to display the two types of bursting properties (Tazerart et al., 2008; Ziskind-Conhaim et al., 2008) and an adjacent astrocyte from the upper lumbar segments (L1–L2) (Figure 1f). In 13 pairs, astrocytic depolarization in response to the TTX-sensitive $[K^+]_e$/$[Ca^{2+}]_e$ variations (Figure 1g) or the TTX-insensitive neuromodulator cocktail (Figure 1h) either preceded (69%) or followed (31%) the onset of the neuronal rhythmic bursting of the adjacent GFP+ pacemaker interneurons (Figure 1i), suggesting that astrocytes play an active role in spinal rhythmogenesis.

3.2 | Enhanced astrocytic Ca^{2+} transients occur during neuronal oscillations in the ventral spinal cord

To better locate and characterize the dialogue between neurons and astrocytes during spinal oscillations, we performed two-photon Ca^{2+} imaging of neuronal and astrocyte signals in the locomotor CPG area. Mice were injected at birth with adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) (Figure 2a) designed to express GCaMp6f in astrocytic processes under the gfaABC1D promoter and jRGECO1a in neurons under the Syn.NES promoter (Figure 2b). We simultaneously imaged the chromophores in lumbar slices (L1-L2) of post-natal mice (day 13–16) and first confirmed that neuronal signals were prevented by TTX, in contrast to the signals recorded in astrocyte processes that remain intact (Figure 2c,d).

We next explored the spatio-temporal dynamics of the astrocytic transients and compared it to the neuronal transients. In response to changes in extracellular K^+ and Ca^{2+} levels or bath application of the neuromodulator cocktail in presence of TTX, neurons displayed Ca^{2+} oscillatory transients (0.16 ± 0.03 and 0.15 ± 0.01 Hz, respectively) (Figure 3a,b), which correlated with enhanced astrocytic Ca^{2+} transients in processes (Figure 3a,c). Interestingly, we distinguished distinct subsets of astrocytic Ca^{2+} signals. Some astrocytes showed increased Ca^{2+}transients before the onset of the neuronal Ca^{2+} oscillations, in contrast to others, which displayed Ca^{2+} transients during neuronal oscillations (Figure 3a). Quantification showed that the occurrence of Ca^{2+} transients preceded the neuronal oscillations in ~64% of astrocytes, whereas in ~36% of them the Ca^{2+} transients occurred during neuronal oscillations (Figure 3d). These data confirmed our electrophysiological dual recordings (Figure 1i). We also observed that most of the astrocytes (~70%) showing Ca^{2+} signal increases in response to ionic variations or perfusion of the neuromodulator cocktail were located in the ventromedial part of the spinal cord (Figure 3e). Altogether, these data suggest that ventromedial astrocytes are functionally coupled with neuronal rhythmicity in the spinal CPG area.

3.3 | The astrocytic Ca^{2+} transients regulate the Kir4.1-mediated inwardly rectifying K^+ current

Because astrocytic Ca^{2+} signals modulate $[K^+]_e$ in hippocampus (Wang, Smith, et al., 2012) and cerebellum (Wang, Xu, et al., 2012), we then investigated whether the increase in astrocytic Ca^{2+} transients related to neuronal oscillations in the spinal CPG area stimulates K^+ uptake. We first recorded the passive membrane properties of the ventromedial GFP+ astrocytes from upper lumbar slices (Figure 4a,b) and then isolated the Ba^{2+}-sensitive Kir4.1 current underlying K^+ uptake in standard aCSF (Figure 4c,d). We then switched to oscillatory aCSF by increasing $[K^+]_e$ to 6 mM and reducing $[Ca^{2+}]_e$ to 0.9 mM, which leads to neuronal bursting (Figure 1g; Figure 3a,b) and intracellular astrocytic Ca^{2+} transients (Figure 3a,c). In this condition, we first observed a higher barium (Ba^{2+})-sensitive current driven by Kir4.1 channels compared to standard aCSF

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

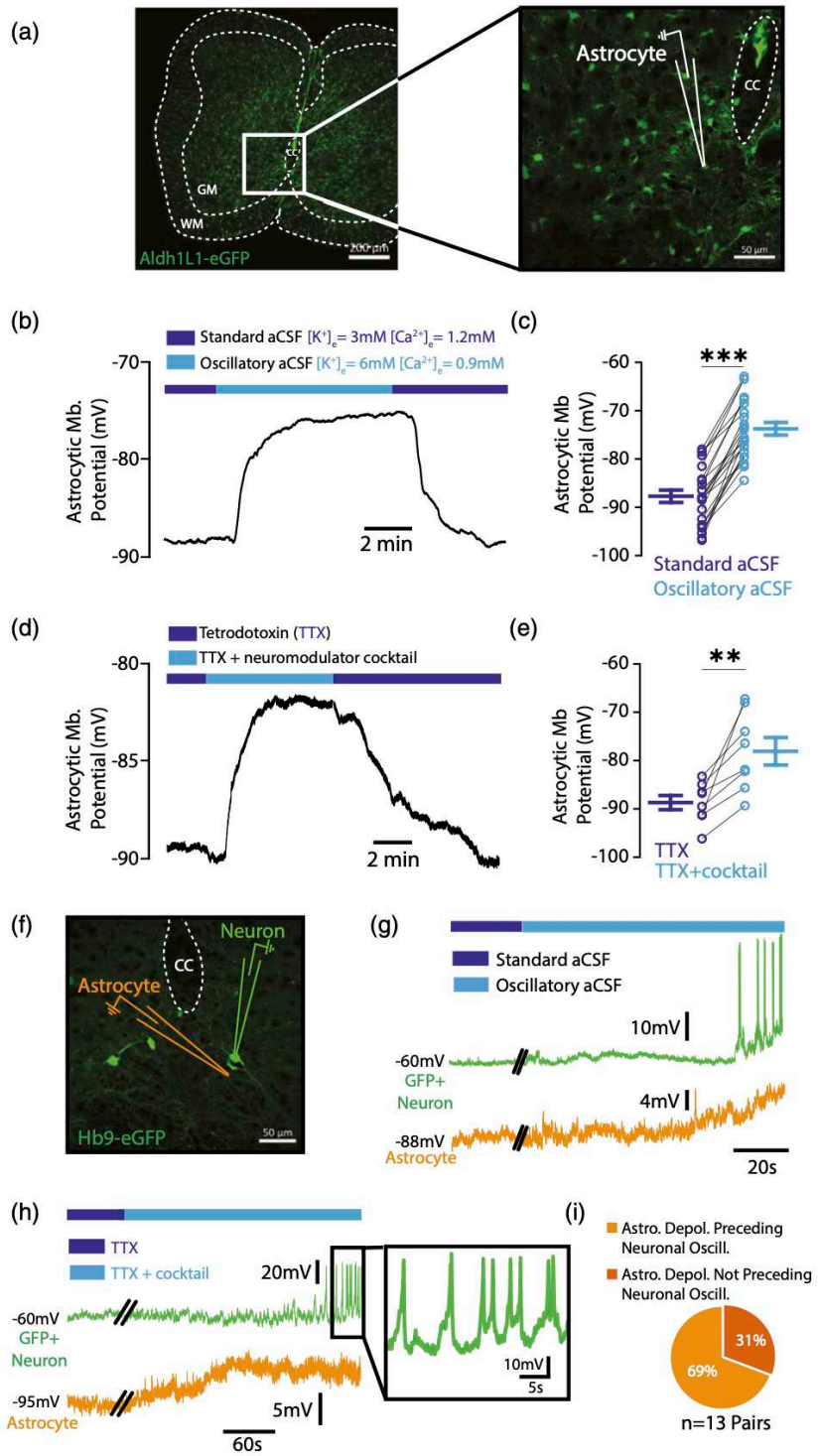


FIGURE 1 Astrocytes respond to variations in $[K^+]_e$ and $[Ca^{2+}]_e$ related to neuronal oscillations in the spinal CPG. (a) Confocal image of endogenous GFP from a lumbar slice of a P8 *Aldh1L1-eGFP* mouse. White inset represents the patch-clamp recording area of the ventromedial GFP+ astrocytes. The recording glass microelectrode is in white. CC stands for central canal, GM for gray matter and WM for white matter. (b) Representative voltage trace of a GFP+ astrocyte in response to $[K^+]_e$ rise to 6 mM and $[Ca^{2+}]_e$ decrease to 0.9 mM. (c) Quantification of the effect of the $[K^+]_e$ and $[Ca^{2+}]_e$ variations on the astrocytic membrane potential ($n = 22$ astrocytes from 16 mice). (d) Representative voltage trace of a GFP + astrocyte in response to bath application of a neuromodulator cocktail (dopamine, serotonin, and NMDA) in presence of TTX. (e) Quantification of the effect of the neuromodulator cocktail on the astrocytic membrane potential ($n = 8$ astrocytes from 4 mice). (f) Confocal image of the endogenous GFP from the ventromedial part of a lumbar slice of a P12 Hb9-eGFP mouse. The green and orange glass microelectrodes represent the dual recording of a GFP+ interneuron and an adjacent astrocyte, respectively. CC for central canal. (g,h) The $[K^+]_e$ and $[Ca^{2+}]_e$ variations (g, light blue) or the bath application of the neuromodulator cocktail in presence of TTX (h, light blue) induces bursting in Hb9 GFP+ interneurons (green traces) preceded by a depolarization of the neighboring astrocyte (orange traces). The black inset in (h) represents the TTX-insensitive neuronal oscillations. (i) Proportion of the astrocytic membrane potential depolarization preceding (light orange) or not preceding (dark orange) the onset of neuronal bursting ($n = 13$ pairs from 8 mice). $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ (two-tailed Wilcoxon paired test for (c) and (e). Mean ± SEM. For detailed p values, see Source data file

(Figure 4c-g). Then, in contrast to what we found in the standard aCSF condition (Figure 4c,d,g), preventing the astrocytic Ca^{2+} transients with intracellular BAPTA (30 mM) delivered via the patch pipette in the oscillatory aCSF condition significantly reduced the barium (Ba^{2+})-sensitive current driven by Kir4.1 channels (Figure 4e-g). These data strongly suggest that the increased intracellular Ca^{2+} from ventromedial astrocytes during neuronal oscillations modulates K^+ uptake via Kir4.1 channels.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

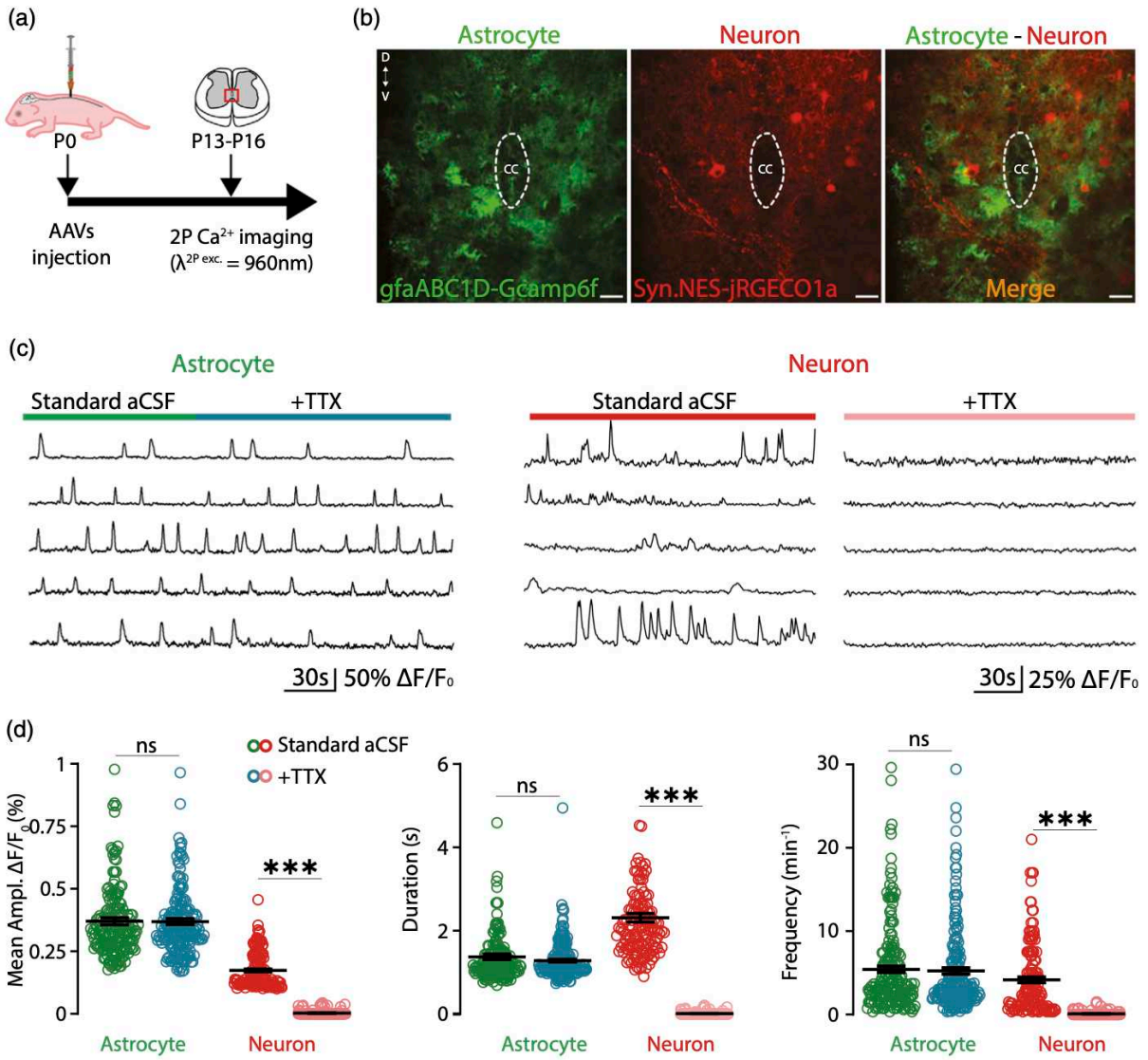


FIGURE 2 Simultaneous recording of neuronal and astrocytic signals by using two-photon Ca^{2+} imaging in lumbar slices. (a) Schematic representation of the experimental design. Intrathecal injections of AAV9-gfaABC1D-Gcamp6f and AAV9-Syn.NES-jRGECO1a were made at birth in wild-type mice. Two-photon Ca^{2+} imaging sessions on lumbar slices (L1–L2) were processed from P13–P16 mice. Red inset represents the imaging area. (b) Two-photon fluorescent images of Gcamp6f (astrocyte, left), jRGECO1a (neurons, middle) and merge signal (right) in the ventromedial part of a lumbar slice from a P16 mouse. CC means central canal. Scale bar is 40 µm. (c) Examples of astrocytic Gcamp6f Ca^{2+} transients ($\Delta F/F_0$) (left) and neuronal jRGECO1a Ca^{2+} transients (right) in presence or not of TTX. (d) Quantification of the mean amplitude (left), duration (middle) and frequency (right) of the astrocytic and neuronal Ca^{2+} transients in absence (green circles for astrocytes red circles for neurons) or in presence (blue circles for astrocytes, pink circles for neurons) of TTX ($n = 182$ astrocytic ROIs from 3 mice and $n = 141$ neuronal ROIs from 5 mice). Ns, no significance, ***$p < 0.001$ (two-tailed Wilcoxon test for (d)). Mean ± SEM. For detailed p values, see Source data file

3.4 | Kir4.1 channels are expressed in astrocytes from the spinal locomotor CPG region

We next investigated whether Kir4.1 channels are expressed in the spinal locomotor CPG. Using Hb9-eGFP mice which express GFP+ interneurons with intrinsic bursting properties (Tazerart et al., 2008; Ziskind-Conhaim et al., 2008), we found that ventromedial GFP+ interneurons were enwrapped by Kir4.1 labeling, which is diffusely expressed in the gray matter of the upper lumbar segments (Figure 5a). To confirm that Kir4.1 channels in the locomotor CPG area are exclusively expressed in glial cells with a highest expression in astrocytes, we used the *Aldh1L1-eGFP* astrocyte-specific reporter mice (Cahoy et al., 2008). We examined co-expression of *Aldh1L1-eGFP* with immunolabeling of Kir4.1 channels and neuronal marker NeuN in lumbar slices. We observed that 100% of the GFP+ astrocytes expressed Kir4.1 channels contrary to NeuN+ cells, which lacked Kir4.1 staining (Figure 5b,c).

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

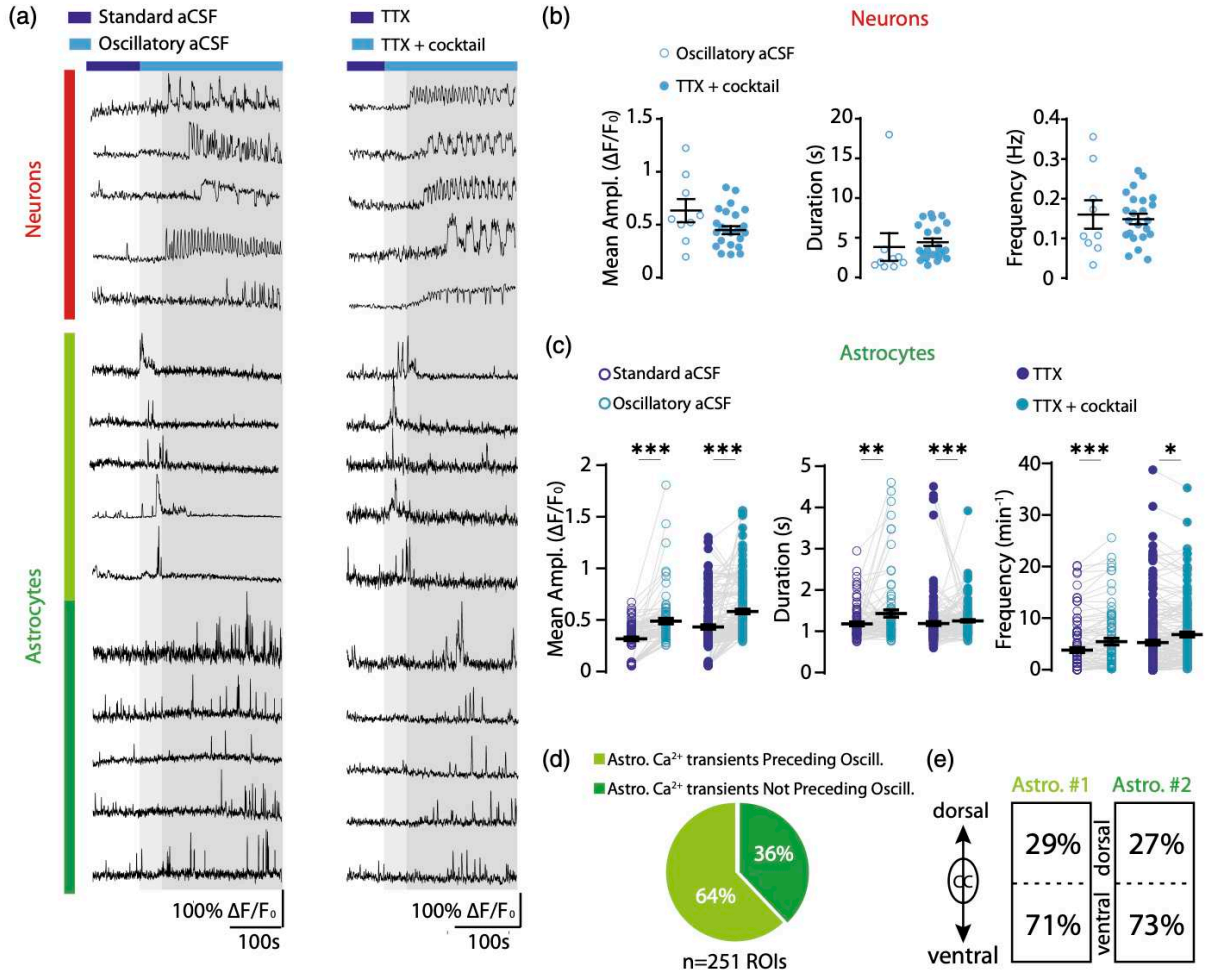


FIGURE 3 Increase in astrocytic Ca^{2+} transients is correlated to neuronal oscillations (a) Top: Examples of neuronal jRGECO1a Ca^{2+} transients ($\Delta F/F_0$) oscillating in response to oscillatory aCSF (K^+ rise and Ca^{2+} decrease) (left) or in response to the neuromodulator cocktail in presence of TTX (right). Middle and bottom: Examples of the increase of the astrocytic Gcamp6f Ca^{2+} signals ($\Delta F/F_0$) before (middle) or during (bottom) the neuronal oscillations (top) from the same field of view. (b) Quantification of the mean amplitude (left), duration and frequency (right) of the neuronal jRGECO1a Ca^{2+} transients in response to K^+ rise and Ca^{2+} decrease (empty blue circles) or in response to monoaminergic cocktail in presence of TTX (filled blue circles) ($n = 9$ and 24 dendritic ROIs from 2 and 3 mice in the ionic variation condition and in the TTX + cocktail condition, respectively). (c) Quantification of the mean amplitude (left), duration (middle) and frequency (right) of the astrocytic Gcamp6f Ca^{2+} signals in response to K^+ rise and Ca^{2+} decrease (empty light blue circles) or in response to monoaminergic cocktail in presence of TTX (filled light blue circles) ($n = 86$ and 165 astrocytic ROIs from 2 and 3 mice in the ionic variation condition and in the TTX + cocktail condition, respectively). (d) Proportion of astrocytic ROIs which display Ca^{2+} signals increase in amplitude and/or frequency before the onset of neuronal oscillations. (e) Proportion of astrocytic ROIs which display Ca^{2+} signals increase above (dorsal) or below (ventral) the central canal (CC) in response to oscillatory conditions (ionic variations and neuromodulator cocktail). Astro#1 and Astro#2 correspond to the astrocyte subtypes when Ca^{2+} transients precede or not the neuronal oscillations, respectively. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$ (two-tailed Wilcoxon paired test for (c)). Mean ± SEM. For detailed p values, see Source data file.

3.5 | The Ba^{2+}-sensitive inwardly rectifying K^+ (Kir4.1) current is crucial for maintaining neuronal oscillations and locomotor-like activity in the CPG

We next studied the role of Kir4.1 channels in the lumbar rhythmogenesis. We first induced rhythmic oscillations in the GFP+ ventromedial interneurons from Hb9-eGFP mice in response to $[K^+]_e/[Ca^{2+}]_e$ variations (Figures S2a, S3a) or bath perfusion of the neuromodulator cocktail in presence of TTX (Figures S2b, S3b). In both conditions, we noticed that before totally preventing the neuronal oscillations, the pharmacological blockade of Kir4.1 channels with Ba^{2+} (100 μM) progressively decreased the rhythmic bursting frequency accompanied with an increase in burst amplitude and duration in both conditions (Figure S2c). Then, Ba^{2+} progressively caused a

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

shift in the spiking pattern from bursting to tonic firing in ~70% of the TTX-sensitive neuronal oscillations (Figure S3c) or resulted in a cessation of bursting activity (~85%) of the TTX-insensitive neuronal oscillations (Figure S3d). We next confirmed the Ba^{2+} effect on preventing neuronal oscillations at a larger scale by two-photon Ca^{2+} imaging of cell populations. We observed a progressive loss of Ca^{2+} oscillations in the vast majority of neurons in response to Ba^{2+} in presence of the oscillatory aCSF (n = 25/28) or the neuromodulator cocktail (*n* = 7/9) (Figure S3e,f). Bath application of Ba^{2+} also induced a significant rise in amplitude of the astrocytic Ca^{2+} signal in both conditions (Figure S3g).

To confirm the functional role of the inwardly rectifying K^+ (Kir4.1) current in the integrated rhythmogenesis, we investigated the contribution of Kir4.1 in the locomotor rhythm-generating network by

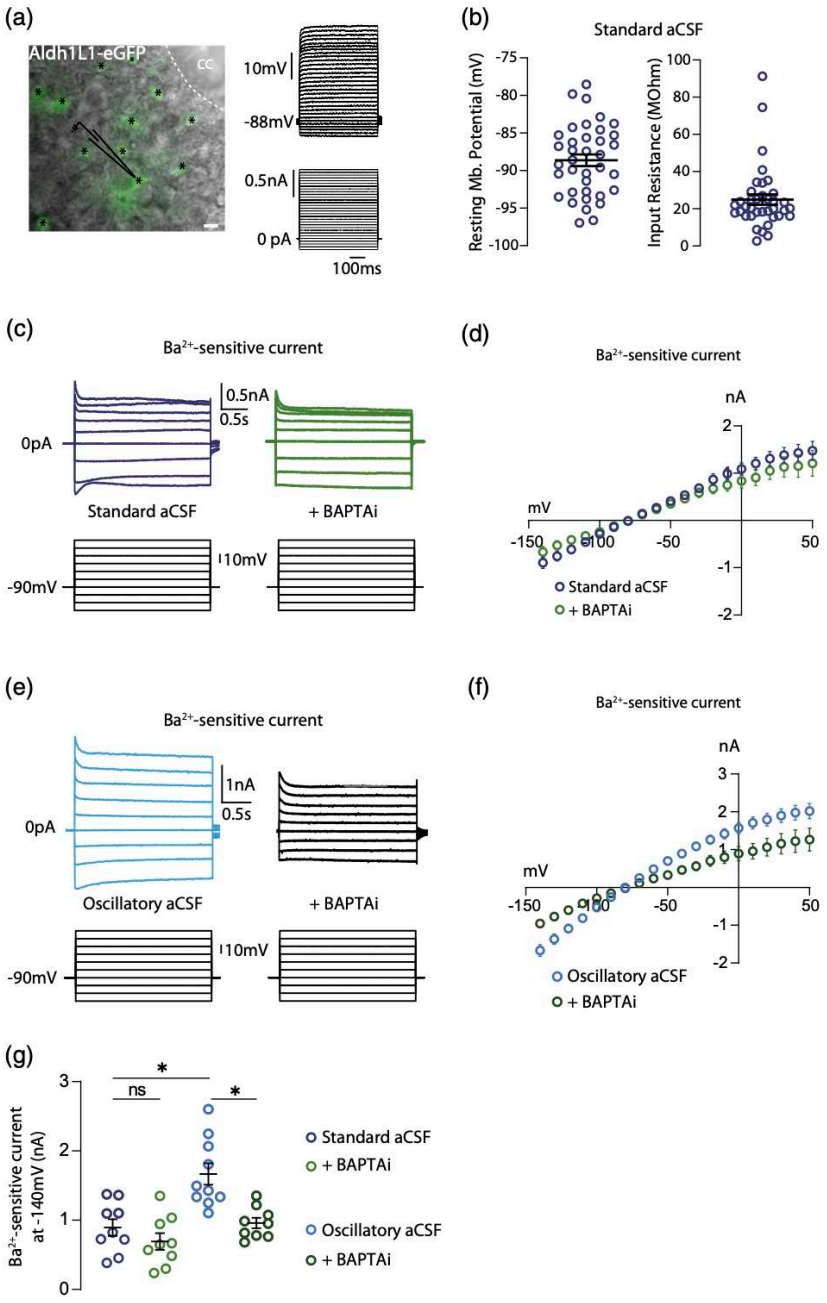


FIGURE 4 Legend on next page.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

using ex vivo whole-mount spinal cords. Since rostral lumbar segments (L1–L2) have a more powerful rhythmogenic capacity than the caudal ones, we recorded locomotor-like activities from the contralateral L2 ventral roots (Figure S4a) in response to ionic variations (Figure S4b) or bath application of a neuromodulator cocktail composed of *N*-methyl-DL aspartate (NMA) and 5 hydroxytryptamine (5-HT) (Figure S4c). In both conditions, Ba^{2+} (100 μM) slowed down the locomotor rhythm by increasing the locomotor burst duration and decreasing the burst frequency without apparent effect on burst amplitude (Figure S4b–d). We also observed a decrease in the cross-correlogram coefficient in presence of Ba^{2+} related to a decreased rhythmic alternation (Figure S4e,f) confirming the role of Kir4.1 channels in modulating rhythmogenesis at the network level.

3.6 | Loss-of-function of Kir4.1 decreases the probability for ventromedial CPG interneurons to oscillate

Because the Ba^{2+} effect on neuronal oscillations cannot be exclusively attributed to Kir4.1 channels blockade, due its broad action on neuronal Kir channels (i.e., Kir2 family) (Li et al., 2013), we performed a targeted loss-of function of Kir4.1 channels by using a short hairpin RNAs (shRNAs) to evaluate more specifically the Kir4.1 contribution to spinal rhythmicity. We injected intrathecally at birth at T13–L1 level an AAV9 virus encoding the Kir4.1-shRNA with a eGFP reporter (Figure 6a,b). The viral transfection led to a decrease of ∼40% in Kir4.1 membrane protein expression in the lumbar spinal cord (Figure 6c). Concomitantly, a strong expression of eGFP in the ventromedial part of the spinal cord was observed from T1 to L5-S1 (Figure 6d, Figure S5). We first examined the effect of Kir4.1-shRNA on glial and neuronal electrophysiological properties. In the virally transfected GFP+ astrocytes (Figure S6a,b), we observed in whole-cell configuration a more depolarized RMP (Figure S6c), a higher input resistance (Figure S6c), a marked change in the current–voltage (*I–V*) relationship and a reduced Ba^{2+}-sensitive current in mice transduced with Kir4.1-ShRNA compared to Ctrl-ShRNA mice (Figure S6d–i). We also observed that the RMPs of ventromedial interneurons surrounded by the virally transfected GFP+ astrocytes (Figure 6e) from mice transduced with Kir4.1-ShRNA were overall more depolarized than the RMPs of interneurons from mice infected with Ctrl-ShRNA (Figure 6e,f), suggesting that knockdown of Kir4.1 in astrocytes had a widespread impact on the excitability of neighboring neurons.

We then tested the ability of the ventromedial interneurons to oscillate after the viral transfection of the spinal cord. We found a significant lower proportion of rhythmic bursting in ventromedial interneurons surrounded by GFP+ astrocytes in mice transduced with Kir4.1-ShRNA compared to Ctrl-ShRNA in response to both ionic variations (∼24% vs. 80%) (Figure 6g,i) or bath perfusion of the neuromodulator cocktail in presence of TTX (∼ 23% vs. 75%) (Figure 6h,j). Interestingly, we also performed two-photon Ca^{2+} imaging in lumbar slices with Rhod-2AM loading (Figure S7a) (Carlsen et al., 2021; Otsu et al., 2015) from Kir4.1 ShRNA transgenic mice, which strengthened our results obtained with the pharmacological (Ba^{2+}) approach (Figure S3g). We show that astrocytic Ca^{2+} transients recorded in oscillatory conditions (Figure S7b,c) were significantly increased in Kir4.1-ShRNA mice compared to Ctrl-ShRNA mice (Figure S7d,e). We also demonstrate that Ba^{2+} had no additional effect on astrocytic Ca^{2+} transients in Kir4.1-ShRNA mice, in contrast to its effect found in Ctrl-ShRNA mice (Figure S7d,e). This suggests that the Ba^{2+} effect on astrocytic Ca^{2+} transients in control mice results from the inhibition of astrocytic Kir4.1 channels. Altogether, these data demonstrate the pivotal role of astrocytic Kir4.1 channels in the oscillatory pattern of ventromedial interneurons from the CPG.

3.7 | Loss-of-function of Kir4.1 slows down the in vivo locomotor pattern and decreases the locomotor performances

We then tested whether the knockdown of Kir4.1 in the spinal cord has a functional impact on the locomotor behaviors. We thus injected intrathecally at birth an AAV9 encoding either the Kir4.1-shRNA or the Ctrl-shRNA. From 12 to 18 days after the viral injection, we

FIGURE 4 Spinal astrocytes display a Ba^{2+}-sensitive Kir4.1 current modulated by intracellular Ca^{2+}. (a) Left: DIC image of a lumbar slice from a P8 *Aldh1L1-eGFP* mouse superimposed with the fluorescent GFP signal. The black stars indicate the GFP+ astrocytes. The recording glass pipette is represented in black. Right: Representative membrane potentials (top) of the targeted GFP+ astrocyte (left image) in response to incremental current pulses (500 ms, Δ = 50 pA). (b) Resting membrane potential (RMP) (left) and input resistance (right) of lumbar GFP+ astrocytes recorded in standard aCSF ($[K^+]_e$ 3 mM and $[Ca^{2+}]_e$ 1.2 mM) ($n = 37$ astrocytes from $n = 20$ mice). (c) Superimposed Ba^{2+}-sensitive currents (top) of two GFP+ astrocytes clamped at the RMP in response to incremental voltages pulses (bottom, 2.5 s, −140 to −30 mV, Δ = 10 mV) without (blue traces) or with (green traces) intracellular perfusion of BAPTA (30 mM) in standard aCSF. (d) The averaged I/V relationship of the Ba^{2+}-sensitive currents of GFP+ astrocytes without (blue circles) ($n = 9$ astrocytes from 5 mice) or with (green circles) ($n = 9$ astrocytes from 5 mice) intracellular BAPTA perfusion in standard aCSF. (e) Superimposed Ba^{2+}-sensitive currents (top) of two GFP+ astrocytes clamped at the RMP in response to incremental voltages pulses (2.5 s, −140 to −30 mV, Δ = 10 mV) without (light blue traces) or with (dark green traces) intracellular perfusion of BAPTA (30 mM) in oscillatory aCSF ($[K^+]_e$ 6 mM and $[Ca^{2+}]_e$ 0.9 mM). (f) The averaged *I/V* curves of the Ba^{2+}-sensitive currents of GFP+ astrocytes without (light blue circles) ($n = 10$ astrocytes from 5 mice) or with (dark green circles) ($n = 9$ astrocytes from 5 mice) intracellular BAPTA perfusion in oscillatory aCSF. (g) Average effect of oscillatory aCSF and intracellular perfusion of BAPTA on the peak amplitude of the astrocytic Kir4.1 current at −140 mV compared to standard aCSF ($n = 8$ and 7 astrocytes from 3 and 4 mice for control and BAPTAi, respectively). Ns, no significance, *$p < 0.05$ (Kruskal–Wallis one-way ANOVA test with Dunn's post hoc test for (g)). Mean ± SEM. For detailed *p* values, see Source data file.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

performed a set of behavioral locomotor tests on freely moving mice (Figure 7a). We first used footprint analysis to evaluate the locomotor pattern (Figure 7b). Mice transduced with Kir4.1-shRNA displayed an increase in both swing and stand phases compared to Ctrl-ShRNA mice (Figure 7c,d) related to a slower speed of locomotion and a decrease in regularity index without any modification of the base of

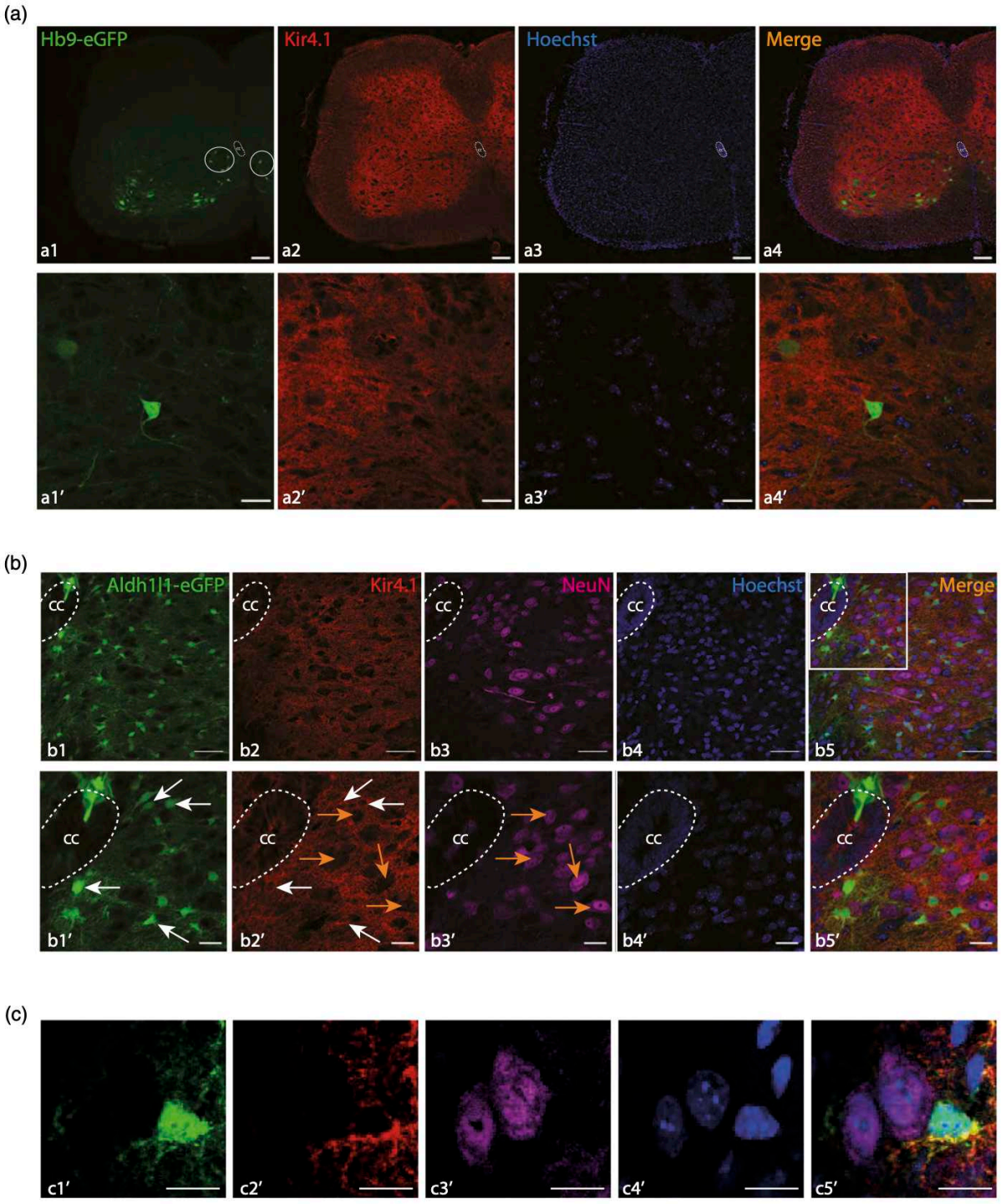


FIGURE 5 Legend on next page.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

support (Figure 7d). We next tested whether Kir4.1 channels also modulate locomotor behaviors in more challenging tasks. We thus assayed motor coordination using the rotarod and swimming forced test without practice sessions to avoid any compensatory learning mechanisms. Consistently, mice transduced with Kir4.1-shRNA failed to adapt to accelerated speed (Figure 7e) and displayed a lower swimming performance (Figure 7f). Kir4.1 channels contribute to the maintenance of the soma size of large α-motoneurons and peak strength in adult mice (Kelley et al., 2018). We demonstrated that the lowered locomotor performances from Kir4.1-ShRNA mice do not result from changes in motoneuronal morphological features. Indeed, we did not observe any modification of the motoneuronal soma size in mice transduced with Kir4.1-ShRNA compared to Ctrl-ShRNA mice (Figure S8). In sum, the Kir4.1-mediated inwardly rectifying K^+ current appears to play a key role for locomotor coordination and the maintenance of the locomotor pattern in freely moving mice.

4 | DISCUSSION

This study demonstrates that astrocytic regulation of extracellular K^+ plays a critical role in maintenance of neuronal rhythmogenesis in the spinal cord motor circuitry. We report that spinal astrocytes from neonatal mice display Ca^{2+} signals before and during rhythmic neuronal oscillations. Inhibiting astrocytic Ca^{2+} transients with BAPTA decreases the Ba^{2+}-sensitive inwardly rectifying K^+ current underlying K^+ uptake. The Kir4.1 channels mediating the K^+ current are expressed in astrocytes enwrapping the ventromedial interneurons from the locomotor CPG. We also demonstrated that knockdown of Kir4.1 decreases the ability of the ventromedial interneurons to oscillate. This perturbation results in an alteration of the locomotor pattern and in lower locomotor performances in challenging tasks.

4.1 | Functional coupling of astrocytic Ca^{2+} signals and neuronal oscillations

Recent studies have highlighted unexpected contribution of astrocytic Ca^{2+} signals in regulating rhythmic behaviors including respiration (Sheikhbahaei et al., 2018), mastication (Morquette et al., 2015) and locomotion (Broadhead & Miles, 2020). However, it is still incompletely understood whether the increased astrocytic Ca^{2+} transient is a prerequisite or a consequence of neuronal oscillations. Here, we reveal that ventromedial astrocytes depolarize and display an increase in Ca^{2+} signals both before and in response to ions and neuromodulator changes related to neuronal oscillations. Our two-photon Ca^{2+} imaging data reveal a functional coupling between spinal cord astrocytes and CPG interneurons. The simultaneous imaging of neuronal and astrocytic activity led to the characterization of distinct subsets of active astrocytes in the spinal CPG area. In one subset, the response precedes neuronal oscillation. This active role of astrocytes in rhythmicity has been suggested in the trigeminal sensorimotor circuit (Morquette et al., 2015) or in cortical areas where the increase in astrocytic Ca^{2+} events precedes the switch to the slow-oscillation state (Poskanzer & Yuste, 2016). In another group, the responses are concomitant to neuronal bursting. In line with this, in Drosophila astrocyte Ca^{2+} transients are driven by rhythmic firing of the octopaminergic neurons (Ma et al., 2016). A recent study also demonstrated such a dynamics in fish radial astroglia (analogs of the mammalian astrocyte), where the noradrenergic neuronal activity precedes the Ca^{2+} wave observed in radial astroglia (Mu et al., 2019). However, we cannot totally rule out that one astrocyte may belong to both groups. Altogether, our data highlight a bi-directional coupling between astrocytic Ca^{2+} signal and neuronal oscillations.

4.2 | The Ca^{2+}-dependent K^+ uptake in spinal astrocytes

Astrocytic Ca^{2+} transients are often associated to gliotransmission (Araque et al., 2014). Here we propose that an alternative mechanism to the classical gliotransmission operates for spinal rhythmogenesis. Previous works demonstrated that GPCR-mediated Ca^{2+} signaling in astrocytes is linked to an increase of K^+ uptake in hippocampus (Wang, Smith, et al., 2012) and cerebellum (Wang, Xu, et al., 2012). This astrocytic Ca^{2+} transients stimulate the Na^+, K^+ ATPase pump resulting in a transient decrease in $[K^+]_e$. In our study, we provide for

FIGURE 5 Spinal astrocytes express Kir4.1 channels enwrapping the pacemaker interneurons. (a) Top: Representative confocal images of the endogenous neuronal GFP signal (a1) and the immunofluorescent labelling of the Kir4.1 channels (a2) from a lumbar slice of a P12 Hb9-eGFP mouse. Note the nuclei are labeled in blue with Hoechst (a3) and the merge signal is shown in a4. White circles indicate the targeted bursting GFP+ interneurons. CC stands for central canal. Scale bar, 100 μm. Bottom: High magnification images of the upper ventromedial part of the lumbar slice from one Hb9-eGFP mouse showing the Kir4.1 channels (a2') enwrapping the GFP signal of a pacemaker interneuron (a1') co-stained with Hoechst (a3'). Merge signal is shown in a4'. Scale bar, 20 μm. (b) Top: Representative confocal images of the endogenous astrocytic GFP signal (b1), the immunofluorescent labelling of the Kir4.1 channels (b2) and the neurons immuno-stained with NeuN (b3) from a lumbar slice of a P8 *Aldh1L1-eGFP* mouse. The nuclei are labeled in blue with Hoechst (b4) and the merge signal is shown in (b5). Scale bar, 50 μm. CC for central canal. Bottom: High magnification images of the upper white inset (b5) showing the GFP+ astrocytes (b1') expressing the Kir4.1 channels (white arrows) (b2'). The Kir4.1 signal does not merge with NeuN signal (orange arrows) (b3'). All nuclei cells are stained with Hoechst signal (b4'). Merge signal is shown in b5'. Scale bars, 20 μm. (c) High magnification (63×) images showing one ventromedial GFP+ astrocyte (c1') expressing Kir4.1 (c2') surrounding two ventromedial interneurons (NeuN+) which are not labeled for Kir4.1 (c3'). All nuclei cells are stained with Hoechst signal (c4'). Merge signal is shown in c5'. Scale bars, 10 μm

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

the first time evidence that a blockade of the Ca^{2+} transients from ventromedial lumbar astrocytes significantly reduces the Ba^{2+}-sensitive current mediated by Kir4.1. This result is in line with observations showing that menthol-induced Ca^{2+} transients in astrocytes increases the Ba^{2+}-sensitive Kir4.1 current from a U251 cell line (Ratto et al., 2020). One likely mechanism underlying the Ca^{2+}-dependent modulation of K^+

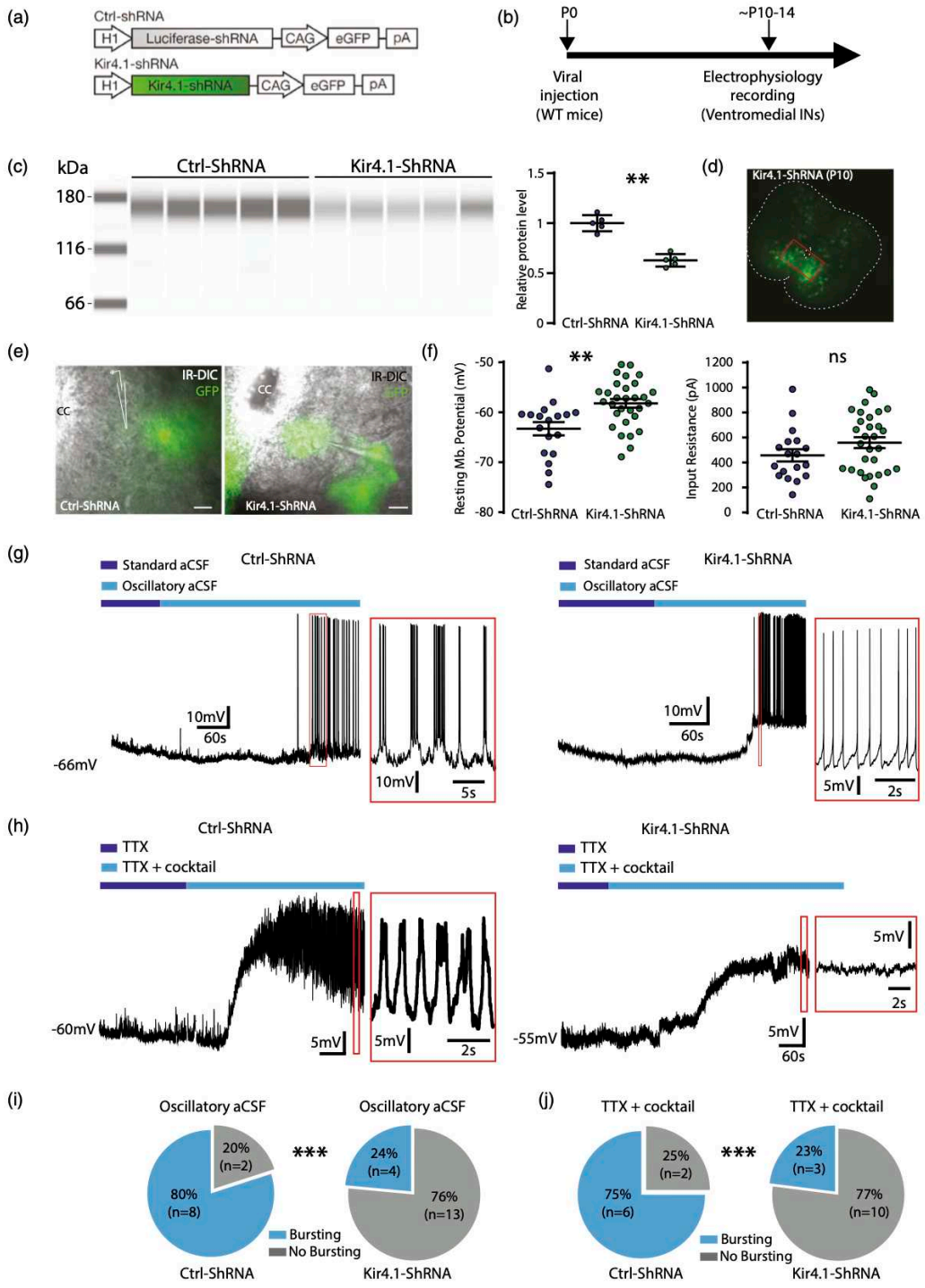


FIGURE 6 Legend on next page.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

uptake may rely on activity-dependent pH shift, since pH alkalinization may be induced in astrocytes by increased Ca^{2+} transients following neuronal oscillations (Grichtchenko & Chesler, 1996), and such Ca^{2+}-dependent alkaline pH-shift in astrocytes is known to increase Ba^{2+}-sensitive Kir4.1 currents (Xu et al., 2000). Because (i) the locomotor-like activity is associated with $[K^+]_e$ homeostasis (Brocard et al., 2013), and (ii) the astrocytic K^+ uptake is activated by intracellular Ca^{2+} transients (Wang, Smith, et al., 2012), we assume that the Ca^{2+} dependent astrocytic K^+ homeostasis plays a key role in the spinal rhythmicity.

4.3 | Astrocytic-dependent K^+ regulation of the spinal rhythmogenesis

The maintenance of K^+ homeostasis by astrocytes is crucial in modulating neuronal excitability (Dallérac et al., 2013; Neprasova et al., 2007). However, whether spinal astrocytes may exert a "ionostatic control" of neuronal bursting, as suggested by Ding et al., 2016, is still unclear. Here, we evaluated the consequence of blocking the astrocytic inwardly rectifying K^+ (Kir4.1) channels on neuronal oscillations in the locomotor CPG. Blocking the Kir4.1-mediated astrocytic K^+ uptake with Ba^{2+} (100 μM) (Cui et al., 2018; Djukic et al., 2007; Ransom & Sontheimer, 1995) decreases the frequency of neuronal oscillations until progressively preventing them. In line with this effect, injection of Kir4.1-ShRNA resulting in the decrease in Kir4.1 astrocytic membrane expression also significantly reduces the probability of driving neuronal oscillations. These results highlight the key role of astrocytic K^+ uptake in maintaining the neuronal oscillatory pattern. Although the astrocytic Kir4.1 channels are not homogeneously expressed among and within brain structures (Higashi et al., 2001), we showed a strong Kir4.1 expression in astrocytes enwrapping the ventromedial bursting interneurons and lamina IX motoneurons. This strategic distribution of Kir4.1 channels surrounding the bursting spinal neurons may be viewed as a powerful mechanism to rapidly modulate network rhythmicity. Moreover, since glutamate tunes the CPG network by exerting a speed control of locomotor-like activity (Talpalar et al., 2013) and that $[K^+]_e$ provides the driving force for glutamate uptake (Nwaobi et al., 2016; Verkhratsky & Nedergaard, 2018) the effective K^+ uptake from the extracellular space through Kir4.1 is thus crucial for tuning the neuron oscillations. In line with this, previous works highlighted the importance of $[K^+]_e$ for rhythmogenesis in hippocampal (Jensen et al., 1994), the increase in $[K^+]_e$ induced by neuromodulators may promote the shift between neuronal oscillatory states in cortical slices electrically silenced by TTX (Ding et al., 2016). A computational work also demonstrated that extracellular K^+ dynamics can cause transition between fast tonic spiking and slow bursting in neocortical networks (Frohlich et al., 2006) in the same range than the spinal locomotor network. Also, we cannot rule out the contribution of the gap junction-coupled astrocytic networks diffusing K^+ to non-active areas (Mazaud et al., 2021). Several studies indeed showed in the trigeminal sensory network (Condamine et al., 2018) or hippocampal circuit (Chever et al., 2016) that astrocytic gap junctions promote neuronal bursting in an activity-dependent manner by favoring the recruitment of neuronal assemblies. Further experiments will be necessary to identify the connexins working in conjunction with Kir4.1 for modulating the spinal locomotor rhythm.

4.4 | The ventromedial astrocytes regulate the locomotor pattern in vivo

A dense literature pointed out that during locomotion, mice display enhanced Ca^{2+} signals in astrocytes of the cerebellum (Nimmerjahn et al., 2009; Paukert et al., 2014), visual cortex (Paukert et al., 2014), or somatosensory cortex (Bojarskaite et al., 2020; Dombeck et al., 2007). On the other hand, silencing astrocyte Ca^{2+} activity in brainstem with optogenetics or chemogenetics can modulate the rhythmic respiratory behavior (Gourine et al., 2010; Sheikhbahaei et al., 2018). In this study, we used genetic tools with ShRNA to knockdowns Kir4.1 in the locomotor CPG and demonstrate that the astrocytic regulation of K^+ homeostasis plays a key role in controlling the locomotor speed and challenging locomotor tasks in vivo. Mice transduced with Kir4.1-ShRNA showed striking locomotor deficits compared to Ctrl-ShRNA mice. Kir4.1 had been reported to contribute to the maintenance of the soma size of large α-motoneurons

FIGURE 6 Targeted decrease in Kir4.1 channels reduces the occurrence of neuronal oscillations. (a) Schematics of the AAV vector engineered to overexpress shRNA or dominant-negative Kir4.1. H1, human H1 promoter; CAG, CMV early enhancer/chicken *Actb* promoter. (b) Schematic representation of the experimental design. WT for wild-type, INs for interneurons and P for postnatal day. (c) Left: Kir4.1 pseudo-gel images from Capillary Western Blot of lumbar segments from P14 intrathecally injected at birth with an adeno-associated virus (AAV9) encoding either a control shRNA ($n = 5$ mice) or a Kir4.1-targeting shRNA ($n = 5$ mice). One mouse per column. Right: group mean quantification of the ~168 kDa band normalized to luciferase-injected controls. (d) Representative image of GFP in lumbar slices from P10 mice after intrathecal injection at birth of an adeno-associated virus (AAV9) encoding a Kir4.1-targeting shRNA (Kir4.1-ShRNA). (e) DIC image of the ventromedial part of a lumbar slice and the corresponding one-photon GFP signal (right) of a P10 mouse injected with AAV9-Ctrl-ShRNA (left) or AAV9-Kir4.1-ShRNA (right). CC means central canal. Scale bars, 20 μm. (f) Quantification of the mean RMP (left) and input resistance (right) of ventromedial interneurons from wild-type mice injected with AAV9 encoding for Ctrl-ShRNA (left, $n = 18$ neurons from 4 mice) or Kir4.1-ShRNA (right, $n = 30$ neurons from 5 mice). (g-h) Representative voltage traces of one interneuron of a mouse injected with AAV9-Ctrl-ShRNA (left) or AAV9-Kir4.1-ShRNA (right) in response to ionic changes (g) or in response to the neuromodulator cocktail in presence of TTX (h). (i,j) Proportion of oscillatory interneurons (blue) or not (gray) from mice injected at birth with an AAV9 encoding either a Luciferase shRNA (Ctrl-ShRNA, $n = 4$ mice) (left) or a Kir4.1-targeting shRNA (Kir4.1-ShRNA, $n = 7$ mice) (right) in presence of high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ (i) or in presence of the neuromodulator cocktail + TTX (j). ns, no significance, $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ (two-tailed Mann–Whitney test for (c) and (f), two-tailed Fisher test for (i) and (j)). Mean ± SEM. For detailed *p* values, see Source data file

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

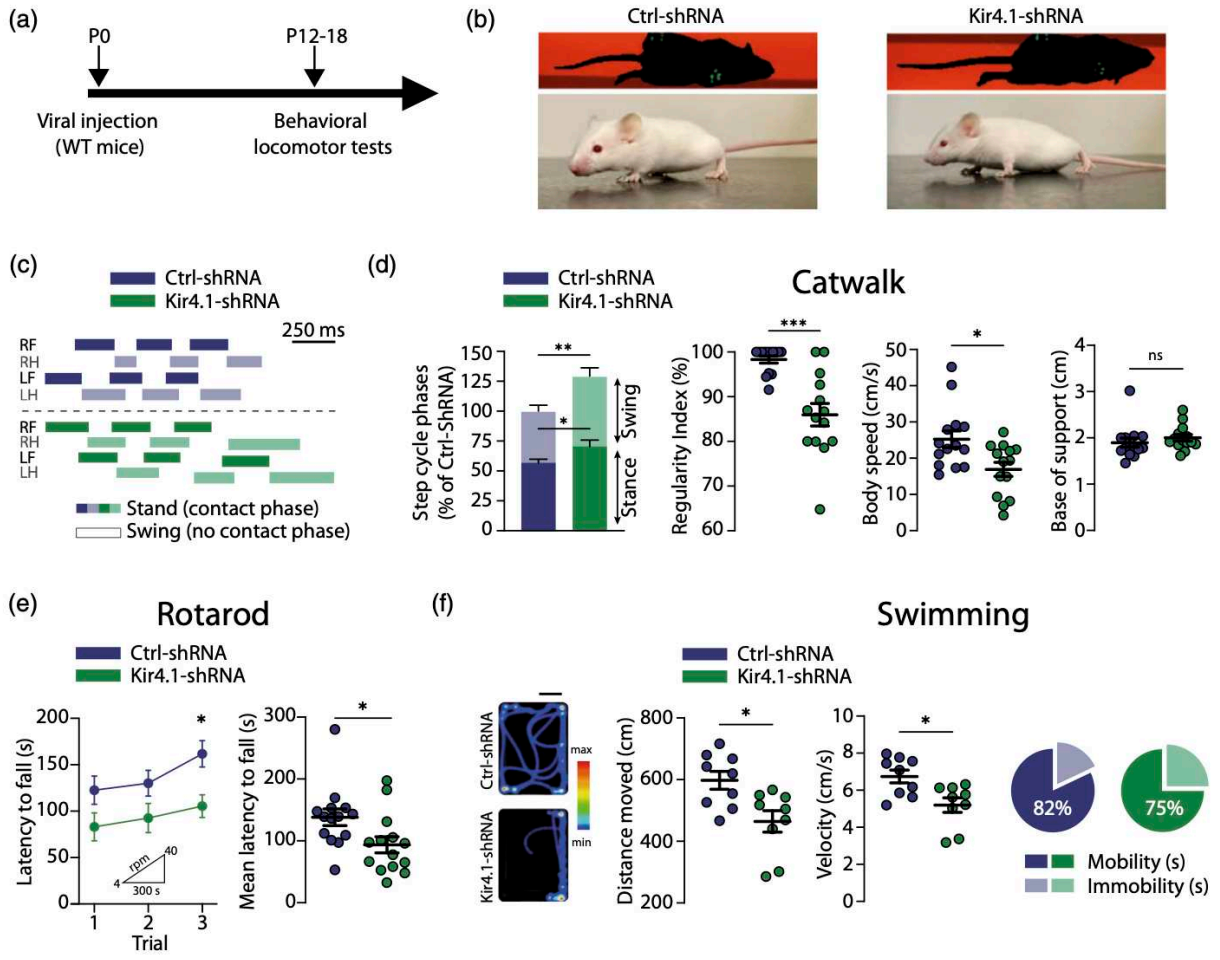


FIGURE 7 Astrocytic Kir4.1 channels influence the locomotor behavior. (a) Schematic representation of the experimental design. WT for wild-type and P for postnatal day. (b) Top: Bottom view of P18 mice injected at birth with AAV9 encoding either for the Ctrl-ShRNA (left) or the Kir4.1-ShRNA (right) freely walking on a glass platform (Catwalk). Bottom: Side view of the same P18 mice. (c) Representative footfall diagrams during CatWalk locomotion of a Ctrl-ShRNA P18 mouse (blue, top) or Kir4.1-ShRNA P18 mice (green, bottom). The stance phase is indicated by horizontal bars and the swing phase by open spaces. RF for Right Forelimb, RH for Right Hindlimb, LF for Left Forelimb, LH for Left Hindlimb. (d) Comparative quantification of the normalized step cycle phases (stance, swing) (left), regularity index (middle left), body speed (middle right) and hind limb base of support (right) between Ctrl-ShRNA mice (blue, $n = 14$ mice) and Kir4.1-ShRNA mice (green, $n = 14$ mice). Each circle represents an individual mouse. (e) Latency to fall from a rod rotating at accelerated speed (4–40 rpm) during 300 s of wild-type mice transduced either with the Ctrl-ShRNA (blue, $n = 14$ mice) or with Kir4.1-ShRNA (green, $n = 14$ mice). (f) Left: Heatmaps illustrate the swimming activity of two wild-type mice transduced either with the Ctrl-ShRNA (top) or with the Kir4.1-shRNA (bottom). Scale bar, 10 cm. Middle: Comparison of the mean swimming distance (middle left) and the mean velocity (middle right) between Ctrl-shRNA (blue, $n = 9$ mice) and Kir4.1-shRNA (green, $n = 9$ mice) mice. Each circle represents one individual mouse. Right: Percentage of mobility and immobility for Ctrl-shRNA mice (blue, $n = 9$ mice) and Kir4.1-shRNA mice (green, $n = 9$ mice) during the swimming forced test. ns, no significance, $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ (Mann–Whitney test for (d), (e) right and (f), Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test for (e) left). Mean ± SEM. For detailed p values, see Source data file

and peak strength in adult mice (Kelley et al., 2018). We demonstrated that the lowered locomotor performances from Kir4.1-ShRNA mice do not result from changes in motoneuronal morphological features. Indeed, we did not observe any modification of the motoneuronal soma size in mice transduced with Kir4.1-ShRNA compared to Ctrl-ShRNA mice. Tong et al., 2014 observed that the Kir4.1 expression decrease in the striatal network of a mouse model of Huntington disease, results in altered locomotor pattern (Tong et al., 2014). We did not observe any Kir4.1-ShRNA expression in brain or brainstem structures involved in the locomotor control. This result is in line with the restricted diffusion to the thoraco-lumbar segments of the AAV9-ShRNA injected intrathecally at birth in the lumbar segments (Bos et al., 2021). Thus we assume that the behavioral consequence of Kir4.1 knockdown on locomotor performances is due to Kir4.1 decrease in the spinal locomotor networks.

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Overall this study defines the contours of a new concept for the spinal locomotor CPG. We propose that the astrocytic Ca^{2+} transients which occurs during the neuronal oscillations likely maintains extracellular K^+ homeostasis, which in turn adjusts the locomotor pattern. Further studies will be needed to decipher the importance for spinal rhythmicity of the astrocytic network mediating K^+ buffering in the locomotor CPG.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tony Barbay, Emilie Pecchi, and Rémi Bos: Research design; Tony Barbay, Emilie Pecchi, Nathalie Rouach, and Rémi Bos: Methodology; Tony Barbay, Emilie Pecchi, Myriam Ducrocq, and Rémi Bos: Investigation and data analysis; Tony Barbay and Rémi Bos: Figures design; Rémi Bos: Writing; Rémi Bos and Frédéric Brocard: Funding Acquisition; Rémi Bos: Supervision.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Vanzetta, P. Weber and S. Roux for their technical advices in imaging sessions, A. Duhoux for animal care, C. Brocard for genotyping and J. Verneuil for providing the Matlab script. We also gratefully acknowledge E. Gascon, F. Jaouen, C. Lepolard and A. Borges-Correia from Neuro-Vir platform of the Neuro-Bio-Tools facility (Institut de Neurosciences de la Timone, UMR 7289, Marseille, France) for their advices, support and assistance in the design and production of vectors used in this work. We also thank G. Rougon for her critical insights on the manuscript.

FUNDING INFORMATION

This work was mainly funded by the CNRS and "Fonds d'Investissement de l'INT jeunes chercheuses, jeunes chercheurs" (FI_INT_JCJC_2019) (to Rémi Bos), by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (PhD fellowship to Tony Barbay) and for a minor part by the Agence National de la Recherche Scientifique (CalpaSCI, ANR-16-CE16-0004) (to Frédéric Brocard).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in (remibos/Source-data-file) at https://github.com/remibos/Source-data-file.git. Code/software available at https://github.com/remibos/Analysis_2P.git.

ORCID

Nathalie Rouach https://orcid.org/0000-0002-5574-888X
Rémi Bos https://orcid.org/0000-0003-2639-3271

REFERENCES

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, *81*(4), 728–739. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007

Bellot-Saez, A., Cohen, G., van Schaik, A., Ooi, L., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2018). Astrocytic modulation of cortical oscillations. *Scientific Reports*, *8*(1), 11565. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30003-w

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzeriat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 278. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278

Bojarskaite, L., Bjornstad, D. M., Pettersen, K. H., Cunen, C., Hermansen, G. H., Abjorsbraten, K. S., Chambers, A. R., Sprengel, R., Vervaeke, K., Tang, W., Enger, R., & Nagelhus, E. A. (2020). Astrocytic Ca(2+) signaling is reduced during sleep and is involved in the regulation of slow wave sleep. *Nature Communications*, *11*(1), 3240. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17062-2

Bos, R., Drouillas, B., Bouhadfane, M., Pecchi, E., Trouplin, V., Korogod, S. M., & Brocard, F. (2021). Trpm5 channels encode bistability of spinal motoneurons and ensure motor control of hindlimbs in mice. *Nature Communications*, *12*(1), 6815. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27113-x

Bos, R., Harris-Warrick, R. M., Brocard, C., Demianenko, L. E., Manuel, M., Zytnicki, D., Korogod, S. M., & Brocard, F. (2018). Kv1.2 channels promote nonlinear spiking Motoneurons for powering up locomotion. *Cell Reports*, *22*(12), 3315–3327. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.093

Bracci, E. B. M., & Nistri, A. (1998). Extracellular K+ induces locomotor-like patterns in the rat spinal cord In vitro: Comparison with NMDA or 5-HT induced activity. *Journal of Neurophysiology*, *79*(5), 2643–2652. https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.5.2643

Broadhead, M. J., & Miles, G. B. (2020). Bi-directional communication between neurons and astrocytes modulates spinal motor circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 30. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00030

Brocard, F., Shevtsova, N. A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I. A., & Vinay, L. (2013). Activity-dependent changes in extracellular Ca2+ and K+ reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron*, *77*(6), 1047–1054. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.026

Brocard, F., Tazerart, S., & Vinay, L. (2010). Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *The Neuroscientist*, *16*(2), 139–155. https://doi.org/10.1177/1073858409346339

Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubisher, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, *28*(1), 264–278. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008

Carlsen, E. M. M., Falk, S., Skupio, U., Robin, L., Pagano Zottola, A. C., Marsicano, G., & Perrier, J. F. (2021). Spinal astroglial cannabinoid receptors control pathological tremor. *Nature Neuroscience*, *24*(5), 658–666. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00818-4

Carlsen, E. M. M., & Perrier, J.-F. (2014). Purines released from astrocytes inhibit excitatory synaptic transmission in the ventral horn of the spinal cord. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*, 60. https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00060

Chever, O., Dossi, E., Pannasch, U., Derangeon, M., & Rouach, N. (2016). Astroglial networks promote neuronal coordination. *Science Signaling*, *9*(410), ra6. https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066

Condamine, S., Lavoie, R., Verdier, D., & Kolta, A. (2018). Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus. *Glia*, *66*(2), 311–326. https://doi.org/10.1002/glia.23244

Cui, Y., Yang, Y., Ni, Z., Dong, Y., Cai, G., Foncelle, A., Shuangshuang, M., Sang, K., Tang, S., Li, Y., Shen, Y., Berry, H., Wu, S., & Hu, H. (2018). Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. *Nature*, *554*(7692), 323–327. https://doi.org/10.1038/nature25752

Dallérac, G., Chever, O., & Rouach, N. (2013). How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 159. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00159

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Ding, F., O'Donnell, J., Xu, Q., Kang, N., Goldman, N., & Nedergaard, M. (2016). Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle. *Science*, *352*(6285), 550–555. https://doi.org/10.1126/science.aad4821

Djukic, B., Casper, K. B., Philpot, B. D., Chin, L.-S., & McCarthy, K. D. (2007). Conditional Knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *Journal of Neuroscience*, *27*(42), 11354–11365. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0723-07.2007

Dombeck, D. A., Khabbaz, A. N., Collman, F., Adelman, T. L., & Tank, D. W. (2007). Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron*, *56*(1), 43–57. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.003

El Manira, A. (2014). Dynamics and plasticity of spinal locomotor circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, *29*, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.06.016

Frohlich, F., Bazhenov, M., Timofeev, I., Steriade, M., & Sejnowski, T. J. (2006). Slow state transitions of sustained neural oscillations by activity-dependent modulation of intrinsic excitability. *The Journal of Neuroscience*, *26*(23), 6153–6162. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5509-05.2006

Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Teschemacher, A. G., Spyer, K. M., Deisseroth, K., & Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, *329*(5991), 571–575. https://doi.org/10.1126/science.1190721

Grichtchenko, I., & Chesler, M. (1996). Calcium- and barium-dependent extracellular alkaline shifts evoked by electrical activity in rat hippocampal slices. *Neuroscience*, *75*(4), 1117–1126. https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00293-x

Grillner, S., & El Manira, A. (2020). Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. *Physiological Reviews*, *100*(1), 271–320. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2019

Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., & Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K+ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *281*(3), C922–C931. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.C922

Jensen, M. S., Azouz, R., & Yaari, Y. (1994). Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *Journal of Neurophysiology*, *71*(3), 831–839. https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.3.831

Kelley, K. W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G. E., Tolman, M., Miller, J. G., Tsai, H. H., Chang, S. M., Molofsky, A. V., Yang, Y., Patani, R., Lakatos, A., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2018). Kir4.1-dependent astrocyte-fast motor neuron interactions are required for peak strength. *Neuron*, *98*(2), 306–319. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.010

Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(4), 224–238. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.9

Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, *129*(4), 1043–1054. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.008

Lee, H. S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., Huitron-Resendiz, S., Pina-Crespo, J. C., Roberts, A. J., Verma, I. M., Sejnowski, T. J., & Heinemann, S. F. (2014). Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(32), E3343–E3352. https://doi.org/10.1073/pnas.1410893111

Li, J., Blankenship, M. L., & Baccei, M. L. (2013). Inward-rectifying potassium (Kir) channels regulate pacemaker activity in spinal nociceptive circuits during early life. *The Journal of Neuroscience*, *33*(8), 3352–3362. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4365-12.2013

Ma, Z., Stork, T., Bergles, D. E., & Freeman, M. R. (2016). Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature*, *539*(7629), 428–432. https://doi.org/10.1038/nature20145

Masino, M. A., Abbinanti, M. D., Eian, J., & Harris-Warrick, R. M. (2012). TTX-resistant NMDA receptor-mediated membrane potential oscillations in neonatal mouse Hb9 interneurons. *PLoS One*, *7*(10), e47940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047940

Mazaud, D., Capano, A., & Rouach, N. (2021). The many ways astroglial connexins regulate neurotransmission and behavior. *Glia*, *69*(11), 2527–2545. https://doi.org/10.1002/glia.24040

Montalant, A., Carlsen, E. M. M., & Perrier, J. F. (2021). Role of astrocytes in rhythmic motor activity. *Physiological Reports*, *9*(18), e15029. https://doi.org/10.14814/phy2.15029

Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Féthière, J., Philippe, A. G., Robitaille, R., & Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience*, *18*(6), 844–854. https://doi.org/10.1038/nn.4013

Mu, Y., Bennett, D. V., Rubinov, M., Narayan, S., Yang, C. T., Tanimoto, M., Mensh, B. D., Looger, L. L., & Ahrens, M. B. (2019). Glia accumulate evidence that actions are futile and suppress unsuccessful behavior. *Cell*, *178*(1), 27–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.050

Neprasova, H., Anderova, M., Petrik, D., Vargova, L., Kubinova, S., Chvatal, A., & Sykova, E. (2007). High extracellular K(+) evokes changes in voltage-dependent K(+) and Na (+) currents and volume regulation in astrocytes. *Pflügers Archiv*, *453*(6), 839–849. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0151-9

Nimmerjahn, A., Mukamel, E. A., & Schnitzer, M. J. (2009). Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron*, *62*(3), 400–412. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.019

Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*, *132*(1), 1–21. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1

Olsen, M. L., Higashimori, H., Campbell, S. L., Hablitz, J. J., & Sontheimer, H. (2006). Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia*, *53*(5), 516–528. https://doi.org/10.1002/glia.20312

Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.-M., Pfrieger, F. W., Bergles, D. E., & Charpak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature Neuroscience*, *18*(2), 210–218. https://doi.org/10.1038/nn.3906

Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J.-C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, *146*(5), 785–798. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022

Paukert, M., Agarwal, A., Cha, J., Doze, Van, A., Kang, J. U., & Bergles, D. E. (2014). Norepinephrine controls Astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron*, *82*(6), 1263–1270. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.038

Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2016). Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(19), E2675–E2684. https://doi.org/10.1073/pnas.1520759113

Ransom, C. B., & Sontheimer, H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K+ currents in rat spinal cord astrocytes. *Journal of Neurophysiology*, *73*(1), 333–346. https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.1.333

Ratto, D., Ferrari, B., Roda, E., Brandalise, F., Siciliani, S., De Luca, F., Priori, E. C., De Iorio, C., Cobelli, F., Veneroni, P., Bottone, M. G., & Rossi, P. (2020). Squaring the circle: A new study of inward and outward-rectifying potassium currents in U251 GBM cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *40*(5), 813–828. https://doi.org/10.1007/s10571-019-00776-3

Rosa, J. M., Bos, R., Sack, G. S., Fortuny, C., Agarwal, A., Bergles, D. E., Flannery, J. G., & Feller, M. B. (2015). Neuron-glia signaling in

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

developing retina mediated by neurotransmitter spillover. *eLife*, *4*, e09590. https://doi.org/10.7554/eLife.09590

Savtchouk, I., & Volterra, A. (2018). Gliotransmission: Beyond black-and-white. *The Journal of Neuroscience*, *38*(1), 14–25. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017

Sheikhbahaei, S., Turovsky, E. A., Hosford, P. S., Hadjihambi, A., Theparambil, S. M., Liu, B., Marina, N., Teschemacher, A. G., Kasparov, S., Smith, J. C., & Gourine, A. V. (2018). Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity. *Nature Communications*, *9*(1), 370. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02723-6

Sibille, J., Dao Duc, K., Holcman, D., & Rouach, N. (2015). The neuroglial potassium cycle during neurotransmission: Role of Kir4.1 channels. *PLoS Computational Biology*, *11*(3), e1004137. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004137

Talpalar, A. E., Bouvier, J., Borgius, L., Fortin, G., Pierani, A., & Kiehn, O. (2013). Dual-mode operation of neuronal networks involved in left–right alternation. *Nature*, *500*(7460), 85–88. https://doi.org/10.1038/nature12286

Tazerart, S., Vinay, L., & Brocard, F. (2008). The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *Journal of Neuroscience*, *28*(34), 8577–8589. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1437-08.2008

Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Haustein, M. D., Anderson, M. A., Mody, I., Olsen, M. L., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 694–703. https://doi.org/10.1038/nn.3691

Tsai, H.-H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A. T., Fancy, S. P. J., Merkle, F., Kessaris, N., Alvarez-Buylla, A., Richardson, W. D., & Rowitch, D. H. (2012). Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science*, *337*(6092), 358–362. https://doi.org/10.1126/science.1222381

Verkhratsky, A., Bush, N., Nedergaard, M., & Butt, A. (2018). The special case of human astrocytes. *Neuroglia*, *1*(1), 21–29. https://doi.org/10.3390/neuroglia1010004

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239–389. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016

Wang, F., Smith, N. A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., & Nedergaard, M. (2012). Astrocytes modulate neural network activity by Ca2+-dependent uptake of extracellular K+. *Science Signaling*, *5*(218), ra26-ra26. https://doi.org/10.1126/scisignal.2002334

Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T., & Nedergaard, M. (2012). Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca2+−−dependent K+ uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(20), 7911–7916. https://doi.org/10.1073/pnas.1120380109

Wilson, J. M., Hartley, R., Maxwell, D. J., Todd, A. J., Kaltschmidt, J. A., Yoshida, Y., Jessell, T. M., & Brownstone, R. M. (2005). Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein. *Journal of Neuroscience*, *25*(24), 5710–5719. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0274-05.2005

Witts, E. C., Nascimento, F., & Miles, G. B. (2015). Adenosine-mediated modulation of ventral horn interneurons and spinal motoneurons in neonatal mice. *Journal of Neurophysiology*, *114*(4), 2305–2315. https://doi.org/10.1152/jn.00574.2014

Xu, H., Cui, N., Yang, Z., Qu, Z., & Jiang, C. (2000). Modulation of Kir4.1 and Kir5.1 by hypercapnia and intracelllular acidosis. *The Journal of Physiology*, *524*(Pt 3), 725–735. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00725.x

Ziskind-Conhaim, L., Wu, L., & Wiesner, E. P. (2008). Persistent sodium current contributes to induced voltage oscillations in locomotor-related hb9 interneurons in the mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *100*(4), 2254–2264. https://doi.org/10.1152/jn.90437.2008

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Barbay, T., Pecchi, E., Ducrocq, M., Rouach, N., Brocard, F., & Bos, R. (2023). Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network. *Glia*, *71*(5), 1259–1277. https://doi.org/10.1002/glia.24337

10981136, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.24337 by Cochrane France, Wiley Online Library on [28/03/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Supplementary figures

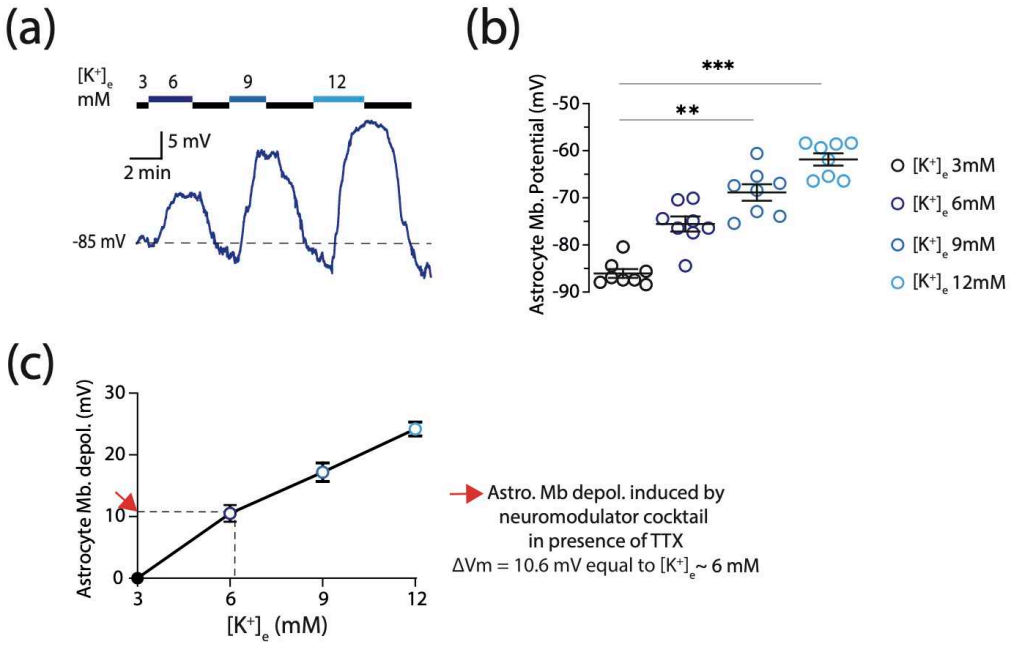


Figure S1. Indirect measure of K^+ rise induced by TTX cocktail. (a) Representative voltage trace of one GFP+ astrocyte from a P11 Aldh1L1-eGFP mouse in response to successive exposures of incremental extracellular K+ concentration $[K^+]_e$ (3mM, 6mM, 9mM and 12 mM). **(b)** Mean of the astrocytic membrane potentials when recorded in standard aCSF with $[K^+]_e$ = 3mM (black circles), 6mM (dark blue circles), 9mM (light blue circles), 12mM (cyan circles) (n = 8 astrocytes in each condition from n = 3 mice). **(c)** Quantification of the astrocytic membrane potential variations as a function of the $[K^+]_e$ rise compared to $[K^+]_e$ = 3mM. Dotted line represents the astrocytic membrane potential variation recorded in the TTX + neuromodulator cocktail condition (n = 8 astrocytes from 4 mice, ΔVm = 10.61 mV compared to 3mM). This data suggests that the neuromodulator cocktail in presence of TTX results in a $[K^+]_e$ rise of ~ 3 mM. ** P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA with a Dunn's multiple comparisons test for (b)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

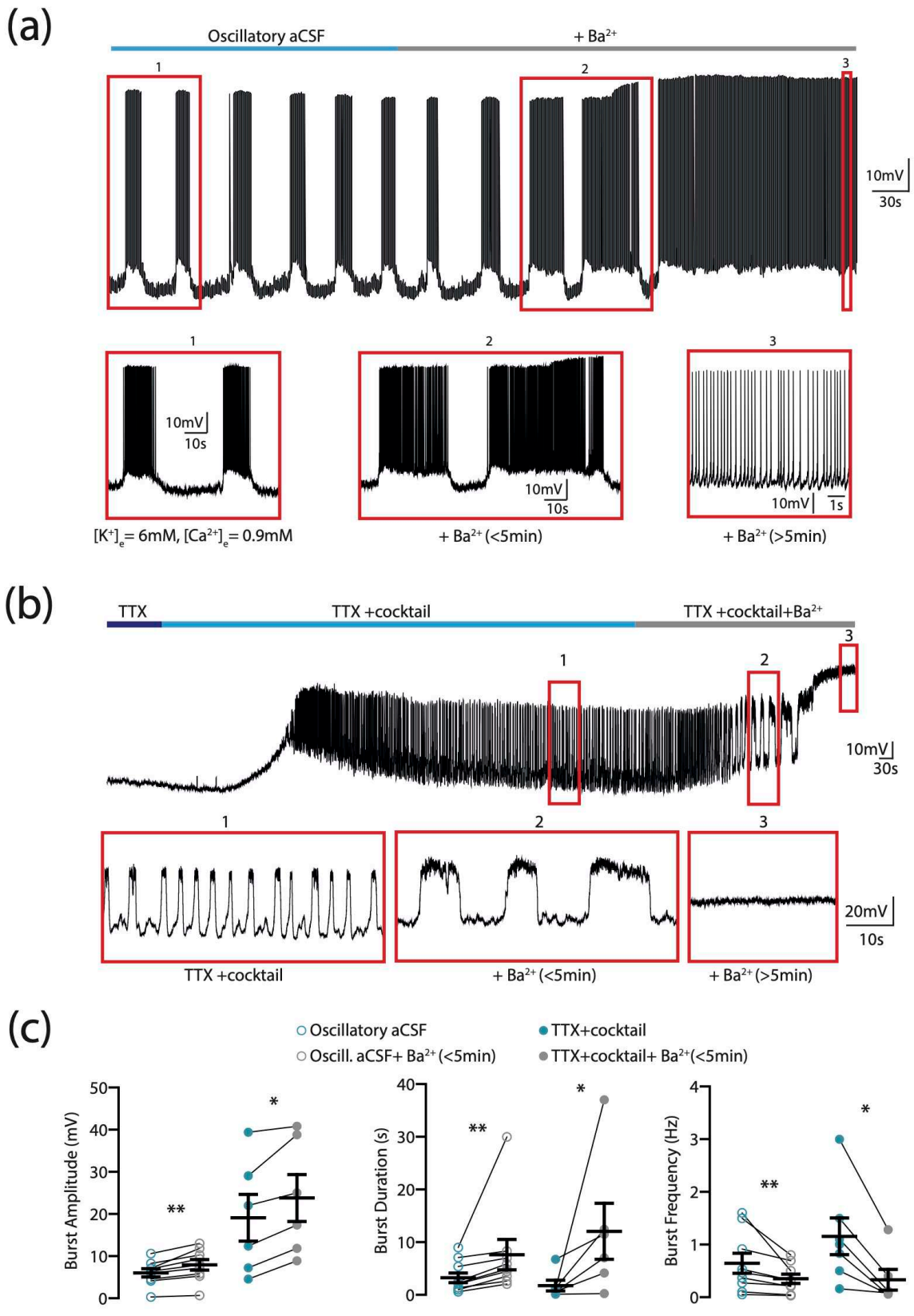


Figure S2. Ba^{2+} alters the neuronal oscillations pattern before inhibiting it. (a) Representative voltage trace of one GFP+ interneuron from a P7 Hb9-eGFP mouse before (blue bar) and during (grey bar) bath application of Ba^{2+} (100µM). Numerated red insets represent the high

magnifications of the above voltage trace overtime. The neuron oscillates in presence of ionic variations (higher K^+ and lower Ca^{2+}, inset#1) and its bursting frequency slows down after few minutes of Ba^{2+} (inset#2) before being prevented. After more than 5 minutes of Ba^{2+}, the neuron displays a tonic firing (inset #3). **(b)** Representative voltage trace of one GFP+ interneuron from a P10 Hb9-eGFP mouse before (blue bars) and during (grey bar) bath application of Ba^{2+} (100µM). Numerated red insets represent the high magnifications of the above voltage trace overtime. The neuron oscillates in presence of TTX and the neuromodulator cocktail (dopamine, NMDA, 5-HT, inset#1) and its bursting frequency slows down after few minutes of Ba^{2+} (inset#2) before being prevented. After more than 5 minutes of Ba^{2+}, the neuron does not display any oscillatory activity (inset #3). **(c)** Quantification of the Ba^{2+} effect (grey circles) on the amplitude (left), duration (middle), and frequency (right) of the GFP+ interneurons bursts in ionic variation condition (light blue empty circles) or in presence of the neuromodulator cocktail (light blue filled circles) (n = 9 neurons from 7 mice in higher $[K^+]_e$ and lower $[Ca^{2+}]_e$ condition and n = 6 neurons from 3 mice in neuromodulator cocktail condition) (two-tailed Wilcoxon paired test for (c)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

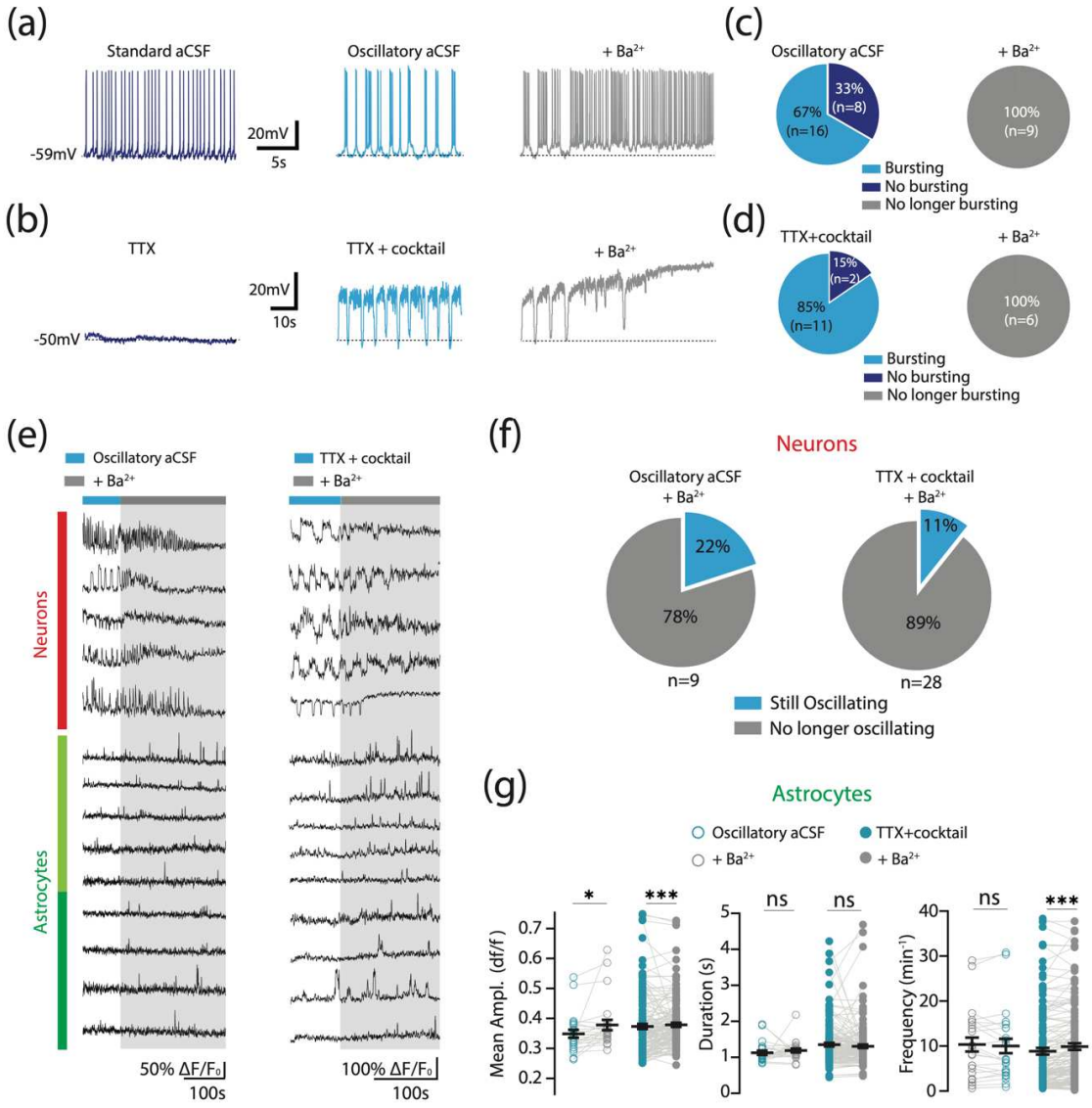


Figure S3. K^+ homeostasis maintenance through Kir4.1 channels is crucial for neuronal oscillations. (a-b) Representative voltage traces of a lumbar GFP+ ventromedial interneuron from a P6 Hb9-eGFP mouse before (left) and during (middle) ionic variations ($[K^+]_e$ = 6mM, $[Ca^{2+}]_e$ = 0.9mM) on which Ba^{2+} (100 µM) is added (right) (a) or in presence of TTX (left) and following application of the neuromodulator cocktail (middle) on which Ba^{2+} is added (right) (b). **(c-d)** Quantification of the proportion of GFP+ interneurons oscillating in response to ionic variations (c, left) or to the neuromodulator cocktail (d, left) and following bath application of Ba^{2+} for more than 5 minutes (c-d, right). **(e)** *Top.* Examples of neuronal jRGECO1a Ca^{2+} signals (ΔF/Fo) before (blue) and during bath application of Ba^{2+} (grey) in presence of high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ (left) or in presence of the neuromodulator cocktail + TTX (right). *Bottom.*

Examples of astrocytic Gcamp6f Ca^{2+} signals (ΔF/F0) before (blue) or during (grey) application of Ba^{2+} in presence of high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ (left) or in presence of TTX and the neuromodulator cocktail (right). **(f)** Proportion of neuronal ROIs still oscillating or not in response to Ba^{2+} application (>5min) in presence of high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ (left) or in presence of TTX and the neuromodulator cocktail (right). **(g)** Effect of Ba^{2+} application (empty and filled grey circles) on the mean amplitude (left), duration (middle) and frequency (right) of the astrocytic Gcamp6f Ca^{2+} signals in presence of K^+ rise and Ca^{2+} decrease (empty light blue circles) or in presence of the neuromodulator cocktail + TTX (filled light blue circles). Each circle represents one astrocytic ROI (n= 24 ROIs from 2 mice in the ionic variation condition and n= 157 ROIs from 3 mice in the TTX+cocktail condition) ns, no significance, *P < 0.05, ***P < 0.001 (two-tailed Wilcoxon test for (g)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

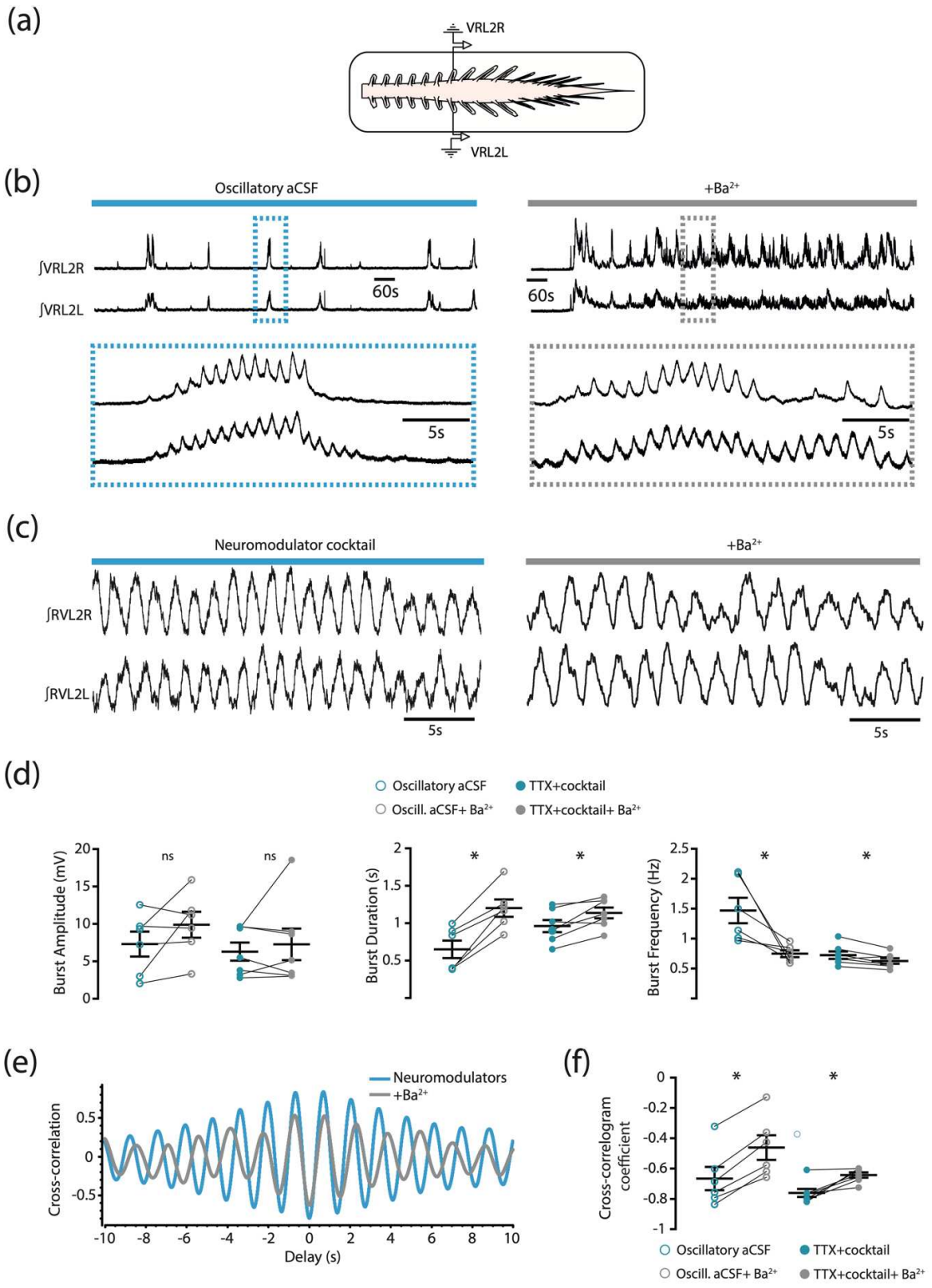


Figure S4. Modulation of astrocytic Kir4.1 channels alters the locomotor-like activity pattern. (a) Schematic representation of the whole-mount spinal cord (ventral side up) with two contralateral recording glass electrodes. VRL2L stands for ventral root lumbar segment 2 left. VRL2R stands for ventral root lumbar segment 2 right. **(b-**

c) Extracellular recordings of alternating rhythmic activities of L2 segment ventral roots (integrated signals) in response to oscillatory acSF ($[K^+]_e$ rise and $[Ca^{2+}]_e$ decrease) (B, left) or in response to the neuromodulator cocktail (C, left) and in the presence (B-C, right) of Ba^{2+}. **(d)** Quantification of the effect of Ba^{2+} (grey circles) on the amplitude (left), duration (middle), and frequency (right) of the rhythmic bursts recorded at the ventral roots (L2 segments) in ionic variation condition (light blue empty circles) or in presence of the neuromodulator cocktail (light blue filled circles). Each circle represents one individual animal (n = 6 mice in high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ condition and n= 7 mice in neuromodulator cocktail condition). **(e)** Graphical representation of the cross-correlation coefficient between cocktail-induced rhythmic activities of contralateral ventral roots of the L2 segment before (blue trace) or after (red trace) Ba^{2+} application. **(f)** Quantification of the mean cross-correlation coefficients between the rhythmic activities of the contralateral ventral roots of the L2 segment before (blue) and after (grey) Ba^{2+} application (n = 6 mice in high $[K^+]_e$ and low $[Ca^{2+}]_e$ condition and n= 7 mice in neuromodulator cocktail condition). ns, no significance, *P < 0.05 (two-tailed Wilcoxon paired test for (d) and (f)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

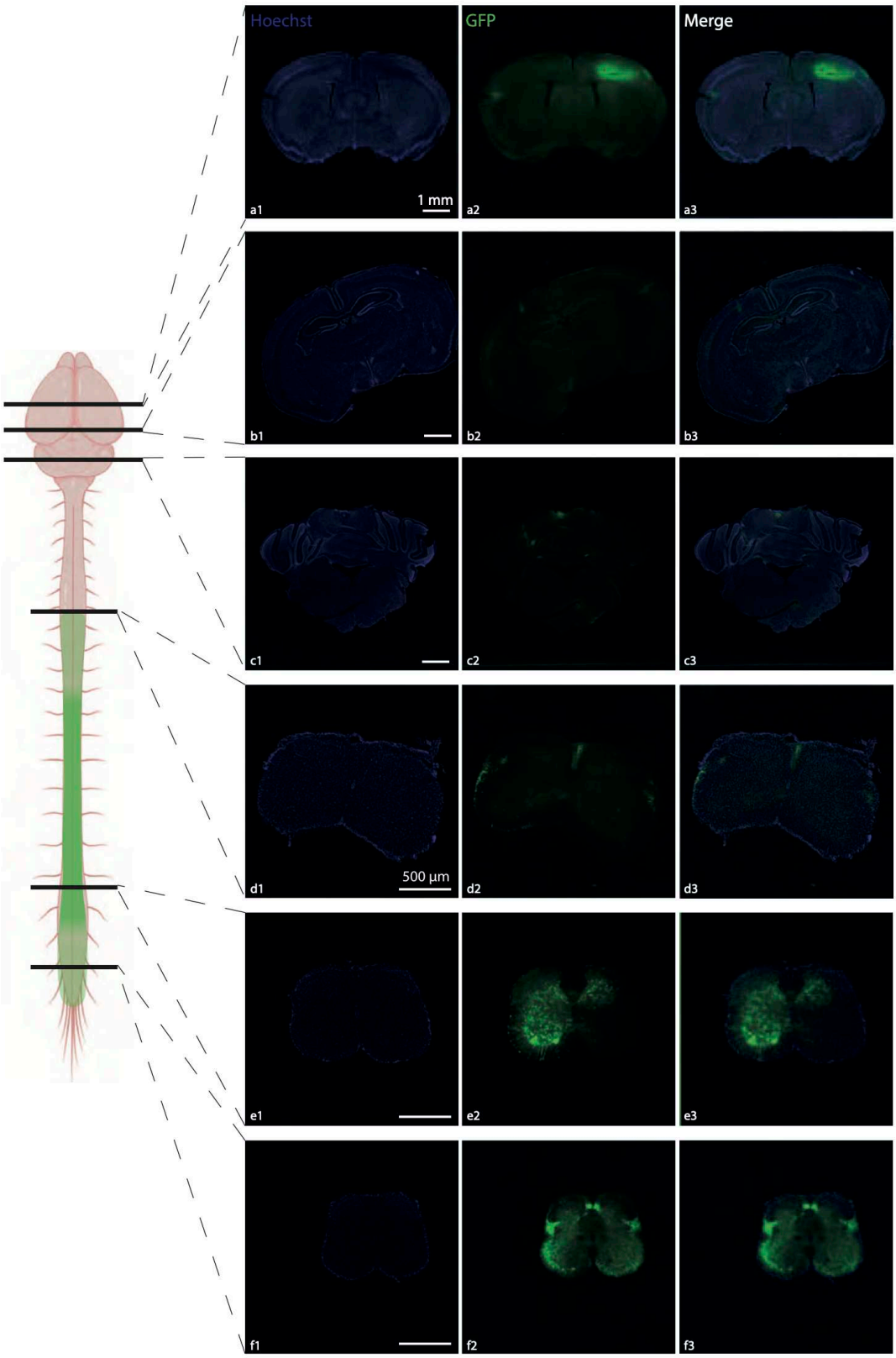

Hoechst
GFP
Merge
1 mm
a1
a2
a3
b1
b2
b3
c1
c2
c3
500 µm
d1
d2
d3
e1
e2
e3
f1
f2
f3

Figure S5: Absence of brain transduction following spinal intrathecal AAV9 administration. Representative confocal images of Hoechst dye (left) and eGFP fluorescence signal (middle) across three different coronal sections of the brain and three coronal sections of the spinal cord from the same P15 Ctrl-ShRNA mouse. Merge signal is indicated (right). The intrathecal administration of AAV9 harboring a self-complementary genome expressing CMV.eGFP and Ctrl-ShRNA or Kir4.1-ShRNA was performed at birth on 4 different mice (n =2 Kir4.1-ShRNA mice and n = 2 Ctrl-ShRNA mice). All 4 injected mice express very weak (or not at all for 3 mice over 4) GFP fluorescence in the brain structures involved in the motor control and locomotion.

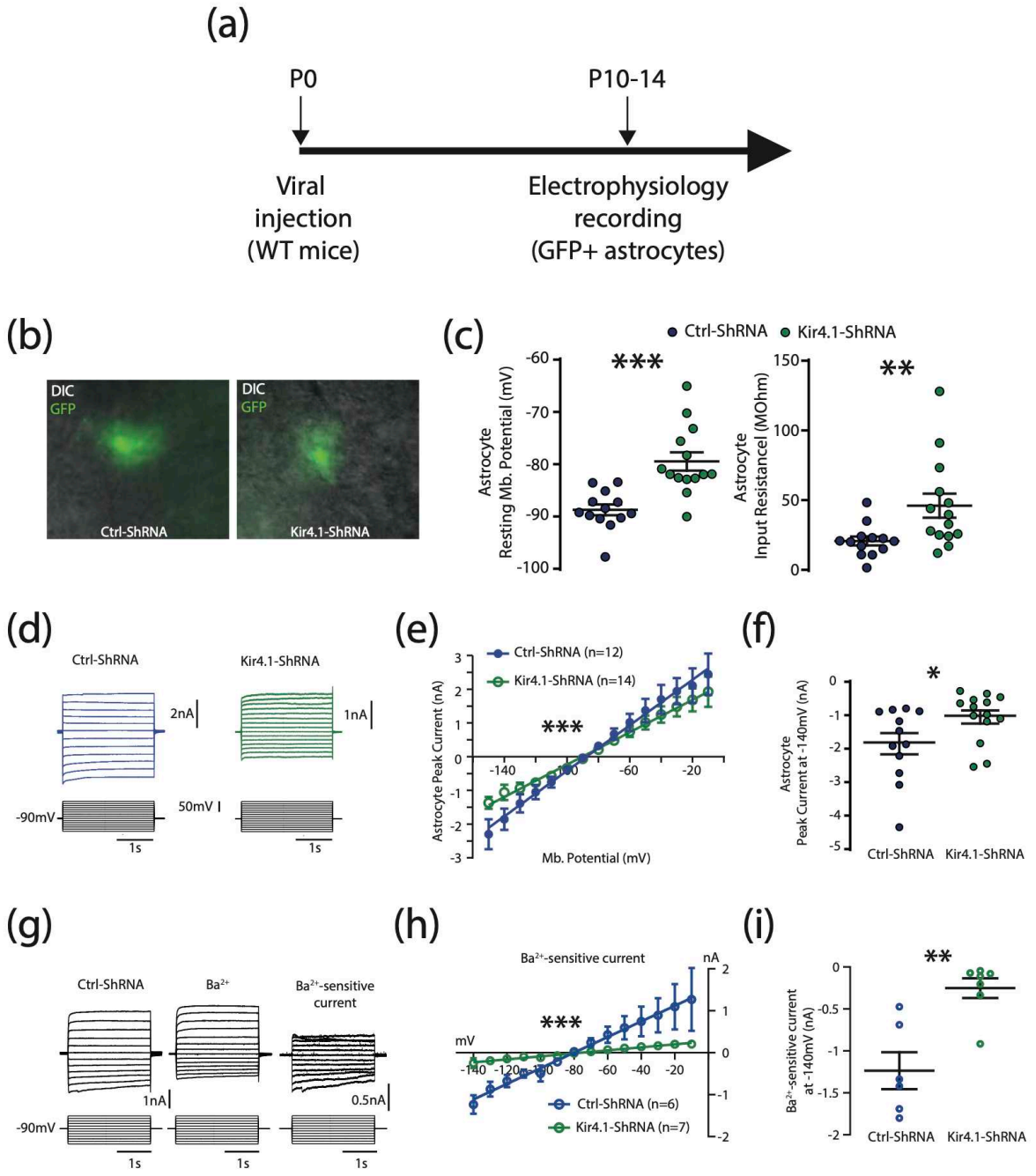


Figure S6. Kir4.1-shRNA decreases the Ba^{2+}-sensitive Kir4.1 channels current resulting in the astrocytic membrane potential depolarization and the input resistance increase. (a) Schematic representation of the experimental design. WT for wild-type, GFP for green fluorescent protein. **(b)** Superimposition of the DIC image and the GFP signal of a ventromedial astrocyte from a lumbar slice of a P10 mouse injected with AAV9-Ctrl-ShRNA-GFP (left) or AAV9-Kir4.1-ShRNA-GFP (right). **(c)** Mean RMP (left) and input resistance (right) of lumbar GFP+ astrocytes from 8 to 13 days-old mice injected at birth with AAV9 encoding either a control shRNA (blue circles, n = 13 astrocytes from n = 3 mice) or a Kir4.1-targeting shRNA (green circles, n = 14 astrocytes from n = 4 mice) recorded in standard aCSF. **(d)** Representative membrane currents (top) of two lumbar GFP+ astrocytes of Ctrl-ShRNA (left) and Kir4.1-ShRNA

(right) mice. Astrocytes were clamped at the RMP in response to incremental voltages pulses (bottom, 2.5s, -150 to -10mV, Δ = 10mV). **(e)** The averaged I/V curves from lumbar GFP+ astrocytes from Ctrl-ShRNA mice (blue circles, n = 12 astrocytes from n = 3 mice) and Kir4.1-ShRNA mice (green circles, n = 14 astrocytes from n = 4 mice). **(f)** Comparative quantification of the peak amplitude Kir4.1 current at -140mV of GFP+ astrocytes from Ctrl-ShRNA mice (n = 12 astrocytes from n = 3 mice) versus Kir4.1-ShRNA mice (n = 14 astrocytes from n = 4 mice). **(g)** Representative membrane currents (top) of one lumbar GFP+ astrocyte of a Ctrl-ShRNA mouse before (left) and during (middle, right) bath application of Ba^{2+} (100 µM). **(h)** Averaged Ba^{2+}-sensitive I/V curves of lumbar astrocytes from Ctrl-ShRNA mice (blue circles) or Kir4.1-ShRNA mice (blue circles) (n = 6 astrocytes from 2 Ctrl-ShRNA mice; n = 7 astrocytes from 2 Kir4.1-ShRNA mice) **(i)** Average Ba^{2+}-sensitive current amplitude at -140mV in GFP+ astrocytes from Ctl-ShRNA mice (n = 6 from 2 mice) compared to Kir4.1-ShRNA mice (n = 7 from 2 mice). *P < 0.05, ** P<0.01, ***P < 0.001 (two-tailed Mann–Whitney test for (c), (f) and (i); comparison of linear regression slopes for (e) and (h)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

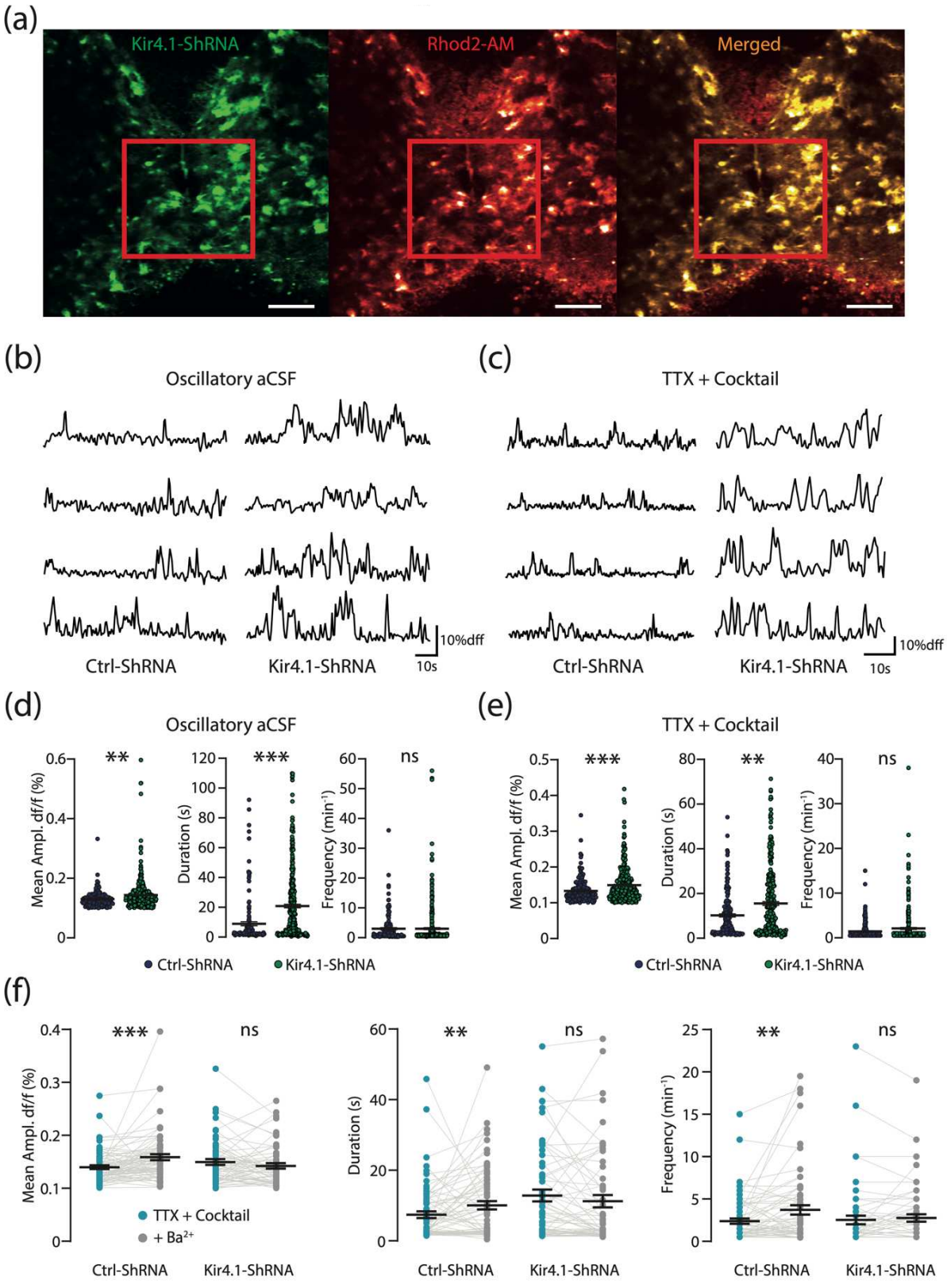


Figure S7. Targeted decrease in Kir4.1 channels disturb astrocytic Ca^{2+} activity during neuronal oscillations in lumbar spinal cord. (a) Two-photon fluorescent images of a lumbar slice (P13) injected at birth with the AAV encoding the Kir4.1-shRNA tagged with GFP (left), and bath loaded with the red Ca^{2+} indicator Rhod2-AM (middle). Merged signal is represented (right). Red inset represents the area of

interest. Scale bar is 100 µm. **(b-c)** Examples of astrocytic Rhod2-AM Ca^{2+} transients (ΔF/Fo) from a P12 Ctrl-ShRNA mouse (left) or P12 Kir4.1-ShRNA mouse (right) in oscillatory aCSF ($[K^+]_e$ = 6mM; $[Ca^{2+}]_e$ = 0.9mM) (b) or in presence of TTX + monoaminergic cocktail (c). **(d-e)** Quantification of the mean amplitude (left), duration (middle) and frequency (right) of the astrocytic Ca^{2+} transients from Ctrl-ShRNA (blue) or Kir4.1-ShRNA mice (green) in presence of oscillatory aCSF (each circle represents one astrocytic ROI; n = 146 and 375 ROIs from 3 Ctrl-ShRNA and 3 Kir4.1-ShRNA mice, respectively) (d) or in presence of TTX + cocktail (each circle represents one astrocytic ROI; n = 184 and 325 ROIs from 3 Ctrl-ShRNA and 3 Kir4.1-ShRNA mice, respectively) (e). **(f)** Effect of Ba^{2+} application (grey circles) in TTX + cocktail condition (blue circles) on the mean amplitude (left), duration (middle) and frequency (right) of the astrocytic Rhod2-AM Ca^{2+} transients from Ctrl-ShRNA (left part of each graph) or Kir4.1-ShRNA mice (right part of each graph). Each circle represents one astrocytic ROI (n = 72 and 59 ROIs from 2 Ctrl-ShRNA and 2 Kir4.1-ShRNA mice, respectively). Ns, no significance **P < 0.01, ***P < 0.001 (Two-tailed Mann–Whitney test for (d) and (e); two-tailed Wilcoxon paired test for (f)). Mean ± SEM. For detailed P values, see Source data file.

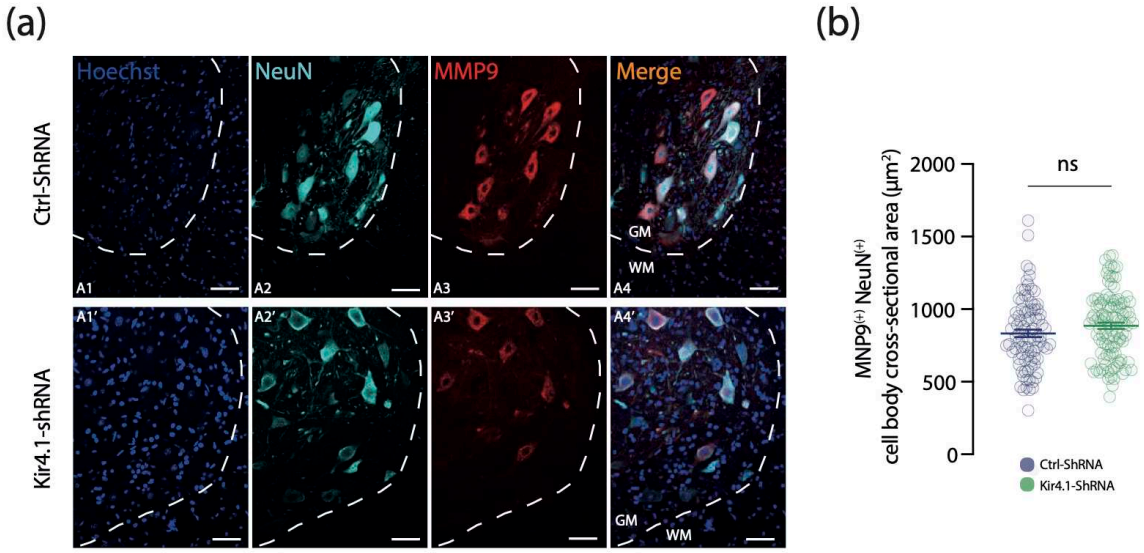


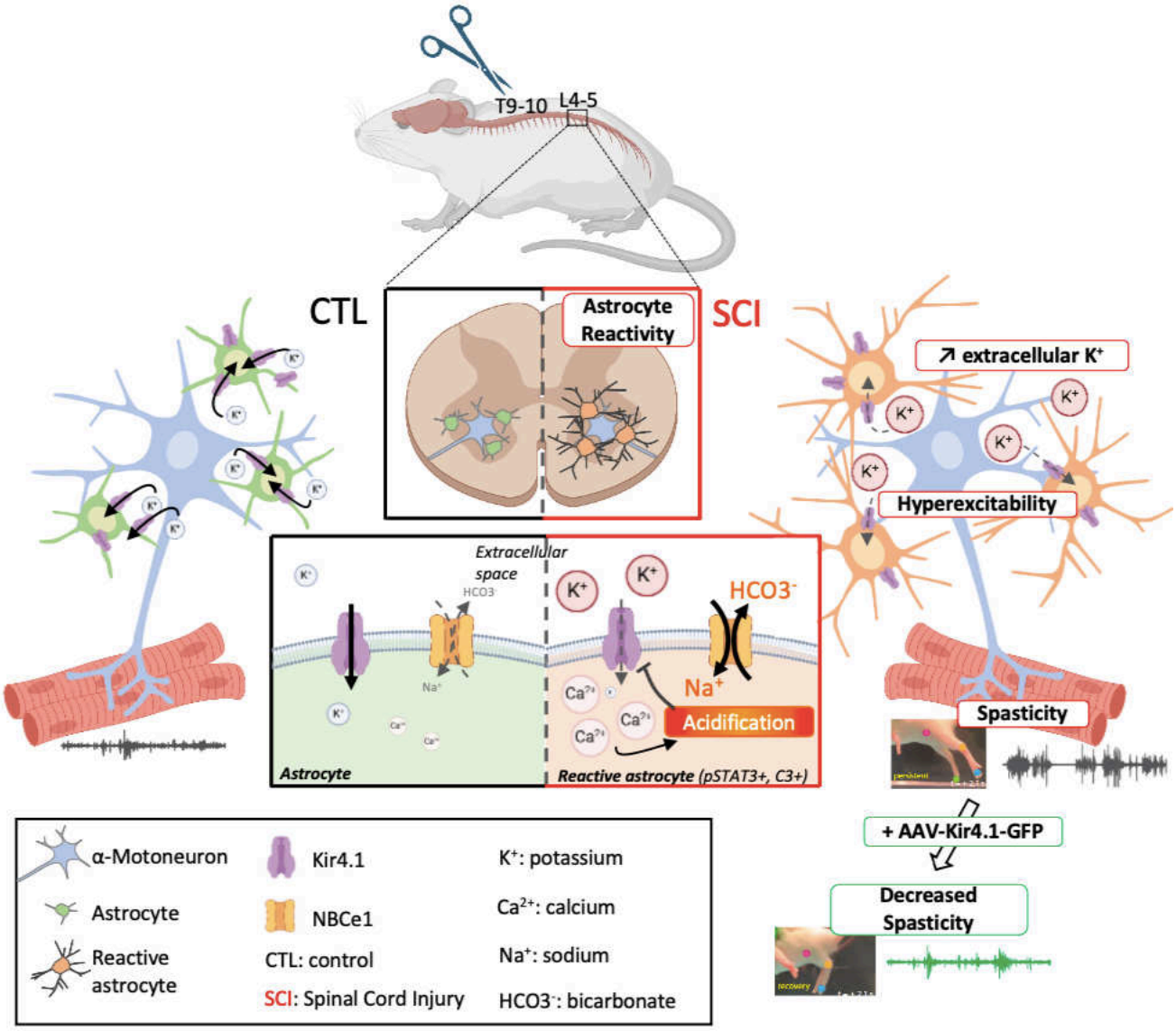
Figure S8. The soma size from MMP9 (+) motoneurons is not modified in Kir4.1-ShRNA mice. **(a)** Representative confocal images of the immunofluorescent labelling of the cells nuclei with Hoechst (a1), the neuronal marker NeuN (a2), the fast-twitch fatigable (IIb) α-motoneuron marker, MMP9 (a3) from a lumbar slice of a P14 Ctrl-ShRNA mouse (top) and a P14 Kir4.1-ShRNA mouse (bottom). Note the merge signal is shown in a4. GM for grey matter, WM for white matter. MMP9 for matrix metalloproteinase-9. Scale bar is 40 µm. **(b)** Quantification of the soma area of MMP9 (+) / NeuN (+) cells from Ctrl-ShRNA mice (88 cells from 3 mice) and from Kir4.1-ShRNA mice (105 cells from 3 mice). The error bars represent the SEM. The two-tailed unpaired t-test was used as data followed a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test. ns for no significance. Note that all the MMP9 (+) cells in each field of view were measured. For detailed P values, see Source data file.

II. Functionnal contribution of Kir4.1 channels to spasticity after spinal cord injury

RÉSUMÉ

La spasticité est un trouble moteur caractérisé par une hypertonie musculaire chronique. Les mécanismes cellulaires sous-jacents décrivent une hyperexcitabilité des motoneurones dû à une perte de la balance excitation/inhibition. Cependant, la potentielle implication de cellules non-neuronales dans ce trouble n'ont jamais été étudiée. En effet, il est maintenant connu que les astrocytes peuvent moduler l'excitabilité des neurones par le biais du $(K^+)_e$. De plus, si une diminution des canaux Kir4.1 au niveau du site de lésion a déjà été reportée, un tel phénomène au niveau de la sortie motrice en région lombaire n'a jamais été étudié. En utilisant une combinaison de techniques d'imagerie avancées, d'électrophysiologie, d'immunohistochimie et d'outils génétiques, cette étude révèle qu'après une lésion de la moelle épinière en thoracique, les souris présentent (1) des astrocytes réactifs en région lombaire, caractérisés par des changements morphologiques et inflammatoires des astrocytes, ainsi que (2) des propriétés électriques et Ca^{2+} altérées. De plus, au cours d'activité neuronale, les astrocytes montrent (3) une acidose exagérée médiée par NBCe1, entraînant (4) une fonction réduite de la conductance Kir4.1, (5) une recapture du K^+ altérée, conduisant (6) à une hyperexcitabilité accrue des motoneurones. Enfin, grâce à une (7) thérapie de gain de fonction impliquant la surexpression des canaux Kir4.1 dans les astrocytes, une réduction des symptômes spastiques suite à une lésion de la moelle épinière est observée, suggérant une cible thérapeutique prometteuse.

Résumé graphique :



Functional contribution of astrocytic Kir4.1 channels to spasticity after spinal cord injury

Authors: Tony Barbay[1], Emilie Pecchi[1], Jose Jorge Ramirez Franco[1], Anton Ivanov[2], Frédéric Brocard[1], Nathalie Rouach[3], Rémi Bos[1,4]

Affiliations : [1]Institut de Neurosciences de la Timone (UMR7289), Aix-Marseille Université and CNRS, Marseille, France ; [2]Aix-Marseille Univ, INSERM, INS, Inst Neurosci Syst, Marseille, France ; [3]Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France ; [4]Lead contact

Correspondence : remi.bos@univ-amu.fr

Running Title: Restoring astrocytic Kir4.1 function decreases spasticity after spinal cord injury

Highlights

- Lumbar astrocytes adopt a reactive phenotype following a thoracic SCI
- NBCe1-mediated acidosis in astrocytes disrupts Kir4.1 function post-SCI.
- Impaired K+ uptake leads to motoneuron hyperexcitability post-SCI.
- Enhanced astroglial Kir4.1 function reduces spastic-like symptoms in SCI mice.

Summary

Spasticity, a prevalent motor issue characterized by network hyperexcitability, causes pain and discomfort, with existing treatments offering limited relief. While past research has focused on neuronal factors, the role of astrocytes in spasticity has been overlooked. This study explores the potential of restoring astrocytic potassium (K^+) uptake to reduce spasticity following SCI. Astrocytes buffer extracellular K^+ via Kir4.1 channels, preventing neuronal hyperexcitability. Following spinal cord injury (SCI), Kir4.1 levels decrease at the injury site, though the consequences and mechanisms of this reduction within the motor output area have not been investigated. Utilizing advanced techniques, we demonstrate that lumbar astrocytes in a juvenile thoracic SCI mouse model switch to reactive phenotype, displaying morpho-functional and pro-inflammatory changes. These astrocytes also experience NBCe1-mediated intracellular acidosis, leading to Kir4.1 dysfunction and impaired K^+ uptake. Enhancing Kir4.1 function reduces spasticity in SCI mice, revealing new therapeutic targets for neurological diseases associated with neuronal hyperexcitability.

Keywords

spinal cord injury – spasticity – reactive astrocyte – Kir4.1 channels – astrocytic acidosis – NBCe1 transporter – astrocyte targeting therapy

Introduction

Traumatic spinal cord injury (SCI) is characterized by an acute mechanical injury, which drastically interrupts the sensory and motor tracts, leading to a wide spectrum of chronic dysfunctions, in particular spasticity affecting ~75% of the SCI patients[1]. Spasticity is characterized by a velocity-dependant increase in the tonic stretch reflex and spasms. It impairs the life quality of SCI patients by decreasing mobility and causing pain, sleep disturbances and depression[2]. Therapeutic approaches for spasticity are currently giving unsatisfactory results. Neurorehabilitation moderately attenuates the spastic symptoms[3], this is why the main clinical strategy is focused on pharmacology. However, anti-spastic medications display limited benefits relative to numerous side effects. A better understanding of the pathophysiological mechanisms of spasticity is needed to propose a more appropriate therapeutic strategy.

Previous works including our own, revealed that spasticity after SCI is associated with a neuronal dysfunction resulting from an excitatory/inhibitory imbalance of both (i) pre-motor neurons[4–6] and (ii) motoneurons (MNs) innervating the hindlimb muscles[7–13]. A switch in neuronal excitability occurs at lumbar levels where MNs switch from hypoexcitability during the initial 'spinal shock' to hyperexcitability a few weeks or months after SCI in adults[14]. In our newborn SCI model, we showed that neuronal hyperexcitability occurs within few days post-SCI after an initial short-term hypoexcitability[10,12]. In this model, neuronal hyperexcitability has been associated with an increase in persistent sodium induced by a calpain-driven cleavage of voltage-dependent sodium channels Nav1.6[11]. Besides this increase in neuronal excitability, we previously observed a neuronal disinhibition in MNs resulting from a decrease of KCC2 function, a cation-chloride cotransporter involved in the intracellular chloride

homeostasis[8,10]. When KCC2 is reduced, the inhibitory neurotransmistters GABA and glycine contribute to hyperexcitability by evoking depolarization instead of hyperpolarization[10]. So far, most of the mechanisms proposed to explain spasticity in adult or juvenile SCI models focused on intrinsic neuronal elements. To determine the role of astrocytes, a subtype of glial cells[15], in modulating the excitability of large-size MNs that innervate the fast-fatigable muscles, we chose a juvenile SCI model over an adult one. Indeed, recording these large-size MNs in adult lumbar spinal cord slices is extremely challenging largely due to (i) their extensive dendritic arborization[16] and (ii) their high metabolic demands, which makes them vulnerable to ischemia[17] , a common issue during *ex vivo* slicing. To overcome these limitations, we and others, conduct studies on spinal lumbar cord slices prepared from animals within the first 2 weeks after birth [11,12,18–20].

In response to neuronal activity, astrocytes prevent neuronal hyperexcitability by buffering the increase in extracellular potassium concentration ($[K^+]_o$) mainly through the inwardly rectifying K^+ channel, Kir4.1[21,22]. Recent evidences also indicate that astrocytes switching to a reactive phenotype contribute to the pathophysiology of neurodegenerative diseases and traumatic CNS injury[23]. Reactive astrocytes are defined as astrocytes that undergo morphological, molecular, and functional changes in response to pathological situations in surrounding tissue[23,24]. Among the molecular changes, a decrease in the expression of Kir4.1 channels has been observed in various neurological disorders[25]**,** including SCI in the area of the injury site[26]. However, the functional consequences of such a decrease within the motor output region (specifically the lumbar region where MNs are located) have not been investigated, especially in the chronic phase when spasticity emerges. Understanding the glial pathophysiological processes underlying this neuronal hyperexcitability might offer new therapeutic strategy for spasticity.

Here we investigated whether restoring astrocyte K^+ uptake alleviates spasticity after SCI. We demonstrate that, following thoracic SCI, lumbar astrocytes switch to a reactive phenotype exhibiting morpho-functional changes and inflammatory markers. These astrocytes also display prominent NBCe1-mediated intracellular acidosis leading to dysfunction of the inwardly-rectifying Kir4.1 channels, which ultimately results in impaired K^+ uptake, and MN hyperexcitability. Importantly, we demonstrate that enhancing Kir4.1 function alleviates spastic-like symptoms in SCI mice.

Results

Morphological changes of astrocytes and inflammatory marker expression in lumbar region after SCI

To determine whether astrocytic reactivity occurs in the lumbar spinal cord during the onset of spasticity following thoracic SCI, we performed immunohistofluorescence against GFAP in Aldh1L1-eGFP mice[27], in which astrocytes express GFP (Figure 1A). This revealed significant astrocytic hypertrophy and a widespread increase in GFAP fluorescence intensity in the gray matter of the lumbar ventral horn in SCI mice (Figures 1A-1B, Figure S1A-B). Using Sholl analysis based on GFAP labelling, we showed that lumbar GFP+ astrocytes from SCI mice display longer and more branched processes, characterized by an increased ramification index (Figure 1C), and occupy a larger space than their control counterparts (Figure 1D). These results suggest the emergence of astrocyte reactivity following SCI. Given that GFAP expression and morphological changes are not conclusive indicators of reactive astrocytes[23], we focused on additional pro-inflammatory biomarkers, namely the complement component 3d (C3d) and the transcription factor Signal Transducer and Activator of Transcrption 3 (STAT-3), both well-documented for their elevated levels in reactive astrocytes within cortical regions impacted by neurological disorders[28–30]. We found a notable rise in the proportion of Aldh1L1(+) astrocytes co-expressing the pro-inflammatory marker C3d, as shown by immunohistochemistry (Figures S1C-D). Active phosphorylated STAT3 could not be detected by immunohistochemestry in our SCI model. We used STAT3 nuclear localization as an indicator of pathway activation[29,30], and observed a significant increase of astrocytic nuclear STAT3 translocation in SCI mice compared to controls (Figures S1E-F). Collectively, these

findings reveal that thoracic SCI triggers morphological changes in astrocytes and inflammatory marker upregulation in the vicinity of lumbar ventro-lateral α-MNs.

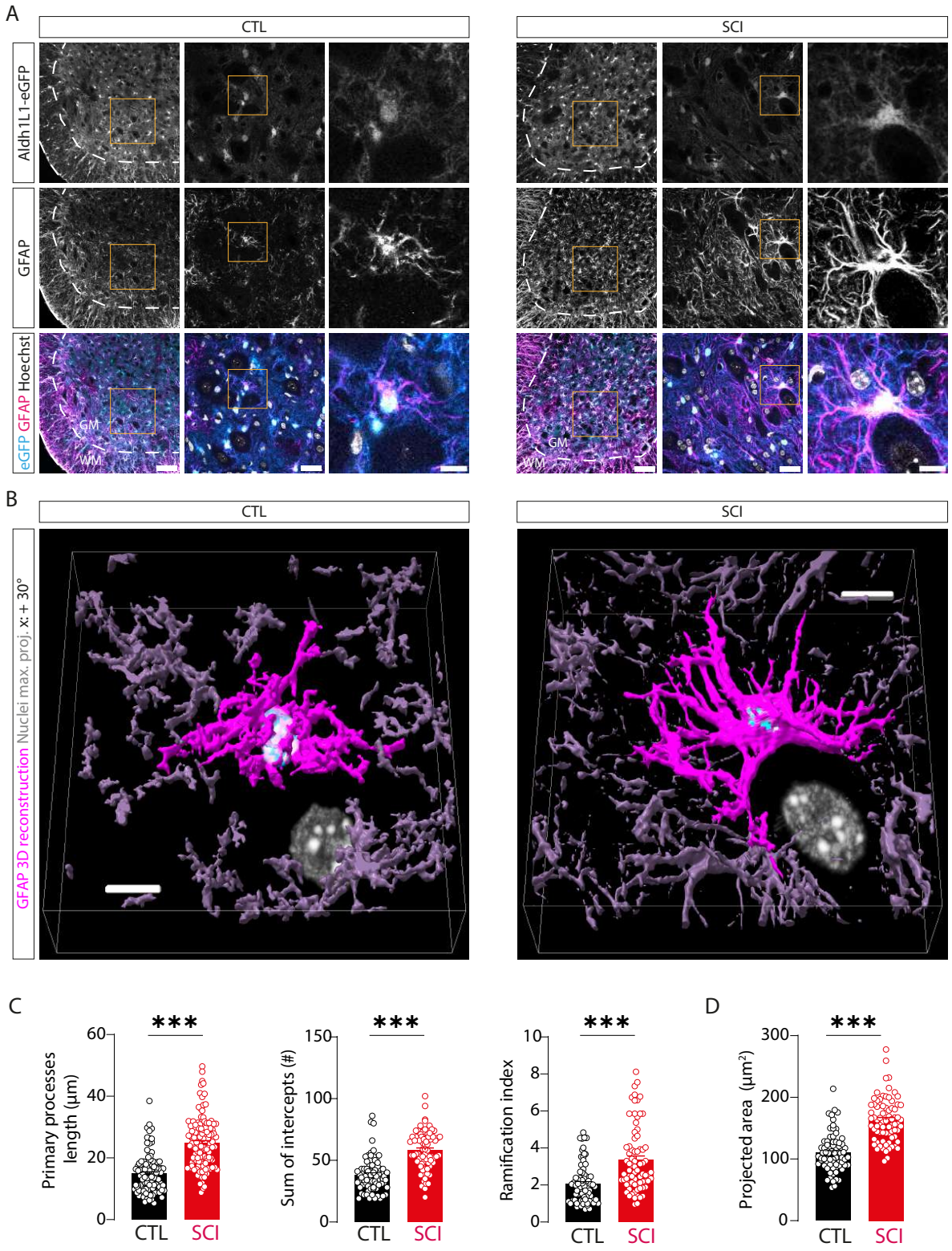


Figure 1. Lumbar astrocytes display morphological changes nearby motoneurons (MNs) after thoracic spinal cord injury (SCI). (A) Confocal images showing endogenous GFP (top) and immunofluorescent

staining with GFAP (middle), and Hoechst (bottom) in the ventro-lateral lumbar cord from control (CTL) Aldh1l1-eGFP (left) or SCI Aldh1L1-eGFP (right) mice. Images at different magnifications (left to right) depict the ventral section (scale bar: 120 µm), an intermediate view of the motoneuron (MN) pool (scale bar: 40 µm), and a high magnification of a single astrocyte near a MN (scale bar: 10 µm). **(B)** 3D reconstruction (using GFAP signal) of a single astrocyte (purple) from A (left : CTL mouse, right : SCI mouse) near MNs, showing only nuclei of the astrocyte and adjacent MNs (scale bar: 10 µm). **(C-D)** Quantification of key morphological parameters of GFAP (+) astrocytes from Aldh1L1-eGFP (+) mice, including primary process length, sum of intercepts, and ramification index (C), and the projected area from a single astrocyte (D), in control (black) and SCI (red) mice (CTL: n = 4 mice, n = 20 slices, n = 76 astrocytes; SCI: n = 4 mice, n = 20 slices, n = 76 astrocytes). Data: mean ± S.E.M. ***P < 0.001, Mann-Whitney test for E. See also Figures S1.

Functional alterations of astrocytes surrounding MNs after SCI

To evaluate the functional deficits associated with morphological alterations in astrocytes post-SCI, we conducted patch-clamp electrophysiology on GFP(+) astrocytes in acute lumbar slices from Aldh1L1-eGFP mice (Figure 2A). Our results revealed that GFP(+) astrocytes from SCI mice exhibit altered electrophysiological properties characterized by a depolarized resting membrane potential (RMP), an increased input resistance, and a decreased conductance (Figure 2B), leading to lower macroscopic currents (Figures 2C-2E) compared to controls. In addition, to better characterize these functional alterations at a cell population level, we performed two-photon imaging of astrocytic intracellular Ca^{2+} in the lumbar ventro-lateral horn (Figure 2F). Control and SCI mice were injected at birth with adeno-associated virus serotype 5 (AAV5) designed to express GCaMP6f in all astrocytic compartments (Figure 2G). We observed an increased proportion of astrocytes displaying spontaneous Ca^{2+} transients in the processes (+22%) and soma (+32%) post-SCI (Figures 2H and 2I; Figures S2A and S2B). Further analysis revealed a significant increase in the amplitude of spontaneous Ca^{2+} transients in processes and microdomains, with no change in the soma of SCI mice (Figures 2J-K; Figures S2C and S2F-H). While the duration and frequency of the spontaneous Ca^{2+} transients in soma and processes remained unchanged post-SCI, the duration decreased and the frequency increased in microdomains (Figures 2J-K; Figures S2C and S2F-H). Overall, these

findings support the view that reactive astrocytes surrounding MNs undergo specific functional alterations, characterized by altered membrane properties and increased spontaneous Ca^{2+} activity, which may contribute to the hyperexcitability of MNs following SCI.

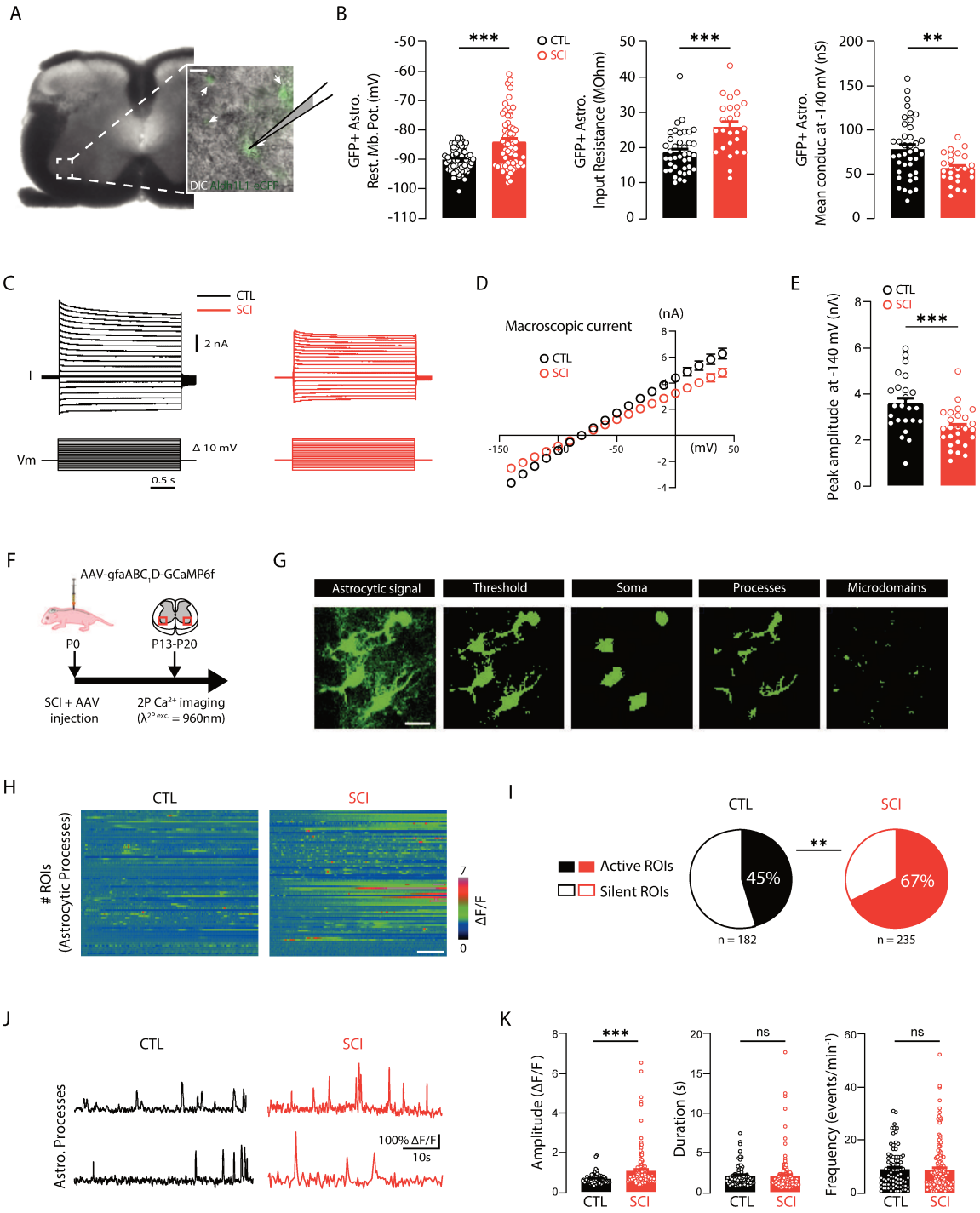


Figure 2. Lumbar astrocytes exhibit functional alterations after SCI. (A) Bright field image of a lumbar slice (L4) from an Aldh1L1-eGFP mouse under IR-DIC. Inset: High magnification of the outlined region

overlaid with GFP signal. White arrows: GFP+ astrocytes. The recording pipette is black, filled in gray. Scale bar, 30 µm. **(B)** Resting membrane potential (RMP), input resistance, and mean conductance at -140mV of GFP+ astrocytes from control (CTL, black) and SCI (red) mice (CTL: n=7 mice, 61 astrocytes; SCI: n=7 mice, 60 astrocytes for RMP; CTL: n=5 mice, 40 astrocytes; SCI: n=5 mice, 25 astrocytes for resistance and conductance). **(C)** Macroscopic currents of GFP+ astrocytes clamped at RMP in response to voltage steps (-140 to +40mV) from CTL (black) and SCI (red) mice. **(D)** Quantification of macroscopic currents as a function of voltage steps. **(E)** Peak amplitude of macroscopic current at -140mV (CTL: n=5 mice, 23 astrocytes; SCI: n=5 mice, 25 astrocytes). **(F)** Experimental design for viral infection at birth followed by Ca^{2+} imaging (GCaMP6f) two to three weeks later. **(G)** Astrocyte segmentation for sub-cellular compartment analysis (scale bar: 10 µm). **(H)** Heatmaps of spontaneous astrocytic processes ROIs transients (CTL: n=182 ROIs, 7 mice; SCI: n=235 ROIs, 5 mice). Color code: fluorescence changes (ΔF/F) (scale bar: 30 s). **(I)** Percentage of active versus silent astrocytic processes (CTL: n=182 ROIs, 7 mice; SCI: n=235 ROIs, 5 mice). **(J)** Examples of spontaneous GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocyte processes from CTL (left) and SCI (right) mice. **(K)** Quantification of the spontaneous GCaMP6f Ca^{2+} transients amplitude, duration, and frequency in astrocytic processes (CTL: n=83 ROIs, 7 mice; SCI: n=153 ROIs, 5 mice). Data: mean ± S.E.M. ns: not significant, **P < 0.01, ***P < 0.001, Mann-Whitney test for B, E, and K. Fisher's test for I. See also Figure S2.

Glutamate-evoked Ca^{2+} transients are enhanced in astrocytes and MNs after SCI

Spasticity resulting from SCI is partly attributed to MNs hyperexcitability[4,8,10,11]. Given that reactive astrocytes are known to modulate neuronal excitability[31,32], we investigated the SCI-induced changes in astrocyte-neuron signaling. To address this, we conducted simultaneous two-photon Ca^{2+} imaging of astrocytes and neurons in the ventro-lateral lumbar region. At birth, wild-type mice were injected with AAV5 to express GCaMP6f in astrocytes (Figure 3A) and AAV9 to express jRGECO1a in neurons (Figure 3B). Glutamate was bath applied to trigger widespread increases in neuronal activity. Following SCI, we observed significantly elevated Ca^{2+} transients in astrocytic processes (+214%), soma (+166%) and microdomains (+139%) in response to glutamate exposure, compared to control conditions (Figures 3C-E, Figures S2D-E and S2I-J). Additionally, large neurons in the ventro-lateral region, likely α-MNs, exhibited an amplified glutamate-induced Ca^{2+} signals (+34%) (Figures 3F-3H). This pronounced Ca^{2+} activity spread progressively throughout both astrocytic and neuronal networks (Figures 3I-J). Notably, we observed that the number of co-active astrocytes is transiently increased upon

glutamate exposure (+44% and +74% at 10 and 30s, respectively) in SCI mice compared to controls (Figure 3J). Altogether, these findings suggest that SCI amplifies astrocyte-neuron Ca^{2+} signaling in the lumbar motor network.

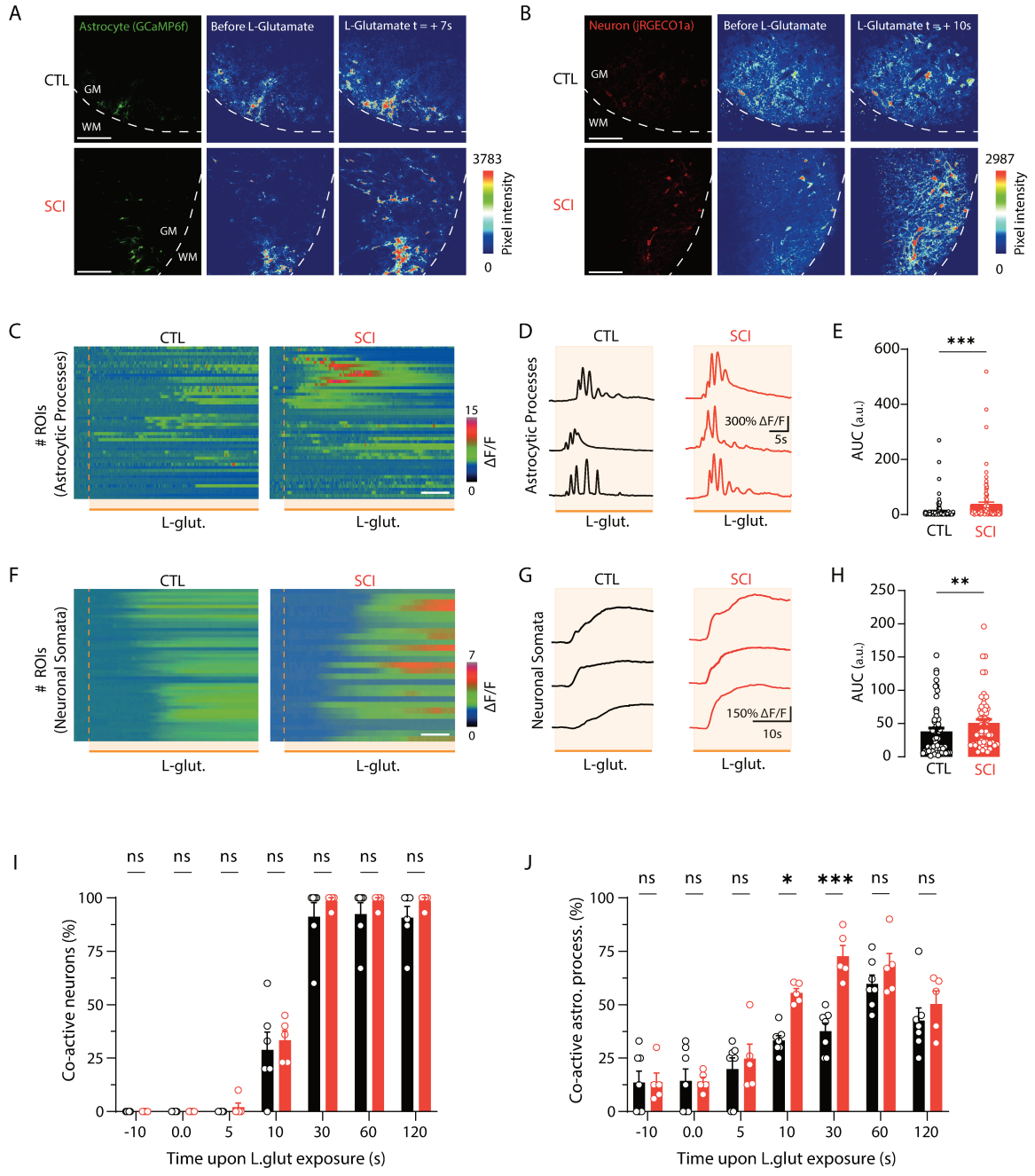


Figure 3. Simultaneous two-photon Ca^{2+} imaging of astrocytic and neuronal signals reveals increased glutamate-evoked Ca^{2+} transients after SCI. (A-B) Fluorescence images of the ventro-lateral lumbar slice showing astrocytic GCaMP6f (A) and neuronal jRGECO1a (B) Ca^{2+} signals from CTL (top left) and SCI (bottom left) mice. Pseudocolor images display Ca^{2+} transients before (middle) and after (right) L-glutamate (1mM) bath application in CTL (top) and SCI (bottom) mice. Color changes indicate pixel intensity variations. **(C)**

Heatmaps of glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocytic processes from CTL (left) and SCI (right) mice, with color representing fluorescence changes (ΔF/F). Scale bar: 30 s. **(D)** Examples of glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocyte processes from CTL (left) and SCI (right) mice. **(E)** Quantification of astrocytic area under the curve (AUC) of glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in CTL (black) and SCI (red) mice (CTL: n=121 ROIs, 7 mice; SCI: n=95 ROIs, 5 mice). **(F)** Heatmaps of glutamate-evoked jRGECO1a Ca^{2+} signals in neuronal soma from CTL (left) and SCI (right) mice, with color representing fluorescence changes (ΔF/F). Scale bar: 30 s. **(G)** Examples of glutamate-evoked jRGECO1a Ca^{2+} signals in neuronal soma from CTL (left) and SCI (right) mice. **(H)** Quantification of neuronal AUC of glutamate-evoked jRGECO1a Ca^{2+} transients in neuronal soma from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL: n=54 ROIs, 6 mice; SCI: n=57 ROIs, 5 mice). **(I)** Quantification of the co-active neurons (%) in function of the time upon L-glutamate exposure (CTL: n= 6 mice; SCI: n= 5 mice). **(J)** Quantification of the co-active astrocyte processes (%) in function of the time upon L-glutamate exposure (CTL: n= 7 mice; SCI: n= 5 mice). Data: mean ± S.E.M. **P < 0.01, ***P < 0.001, Mann-Whitney test for E and H. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparaison test for I and J. See also Figure S2.

Glutamate-evoked astrocytic acidosis is enhanced after SCI

In response to increased neuronal activity, astrocytes express a high level of electrogenic sodium (Na^+) – bicarbonate ($HCO3^-$) cotransporter 1 (NBCe1, *Slc4a4*) to maintain brain extracellular pH (pHe) homeostasis[33]. NBCe1 is a high affinity carrier primarily responsible for moving $HCO3^-$ across the astroglial membrane, and its activity is modulated by intracellular Ca^{2+} rise[34,35]. Given our observation of increased Ca^{2+} signals in astrocytes post-SCI, we investigated whether NBCe1 expression and function in spinal astrocytes are affected by SCI. We found a slight but significant upregulation of membrane-bound NBCe1 in astrocytes after SCI (Figures 4A and 4B). Consistent with our previous experiment, we activated the neuronal network with glutamate. Using two-photon imaging with the pH-sensitive probe BCECF during glutamate exposure, we monitored pH shifts in Td-tomato (+) astrocytes in the ventro-lateral region of lumbar slices (Figure 4C). Confirming BCECF pH-sensitivity (Figures S3A-C), astrocytes loaded with BCECF exhibited either alkalinization or acidification in response to glutamate (Figures 4D and 4E). We found a significant increase (~20%) in acidic responses in astrocytes post-SCI compared to control (CTL) mice (Figure 4F). Detailed analysis showed a pronounced glutamate-induced functional acidification of astrocytes post-SCI, attenuated by NBCe1

blockade (Figures 4G and 4H). These data suggest that reactive astrocytes exhibit increased NBCe1 expression and undergo prominent intracellular acidosis during sustained neuronal activity post-SCI.

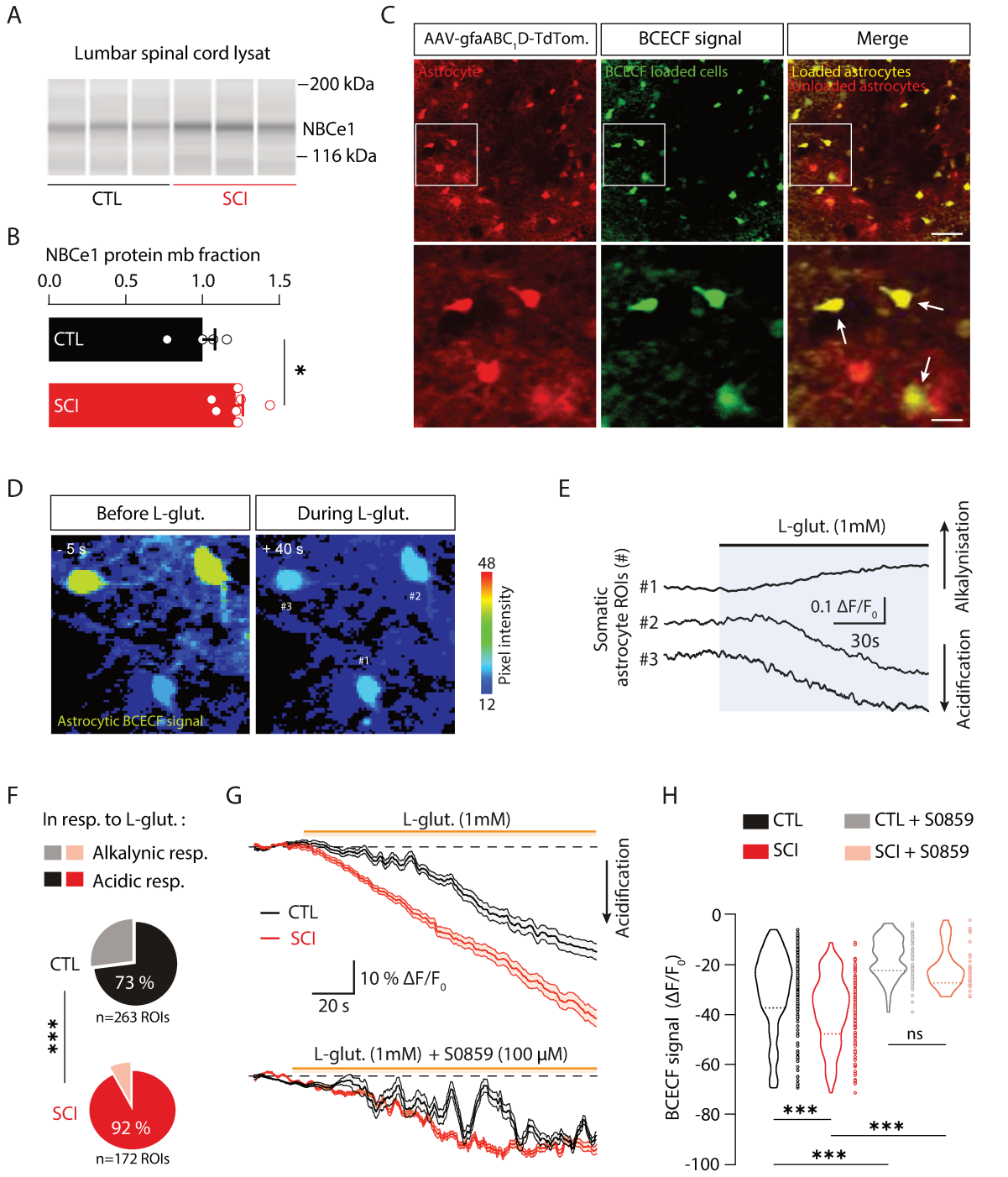


Figure 4. Astrocytes display increased NBCe1 levels and undergo prominent glutamate-evoked acidosis after SCI. (A) NBCe1 pseudo-gel images from capillary western blot of lumbar segment from CTL (left, black) and SCI (right, red) mice. **(B)** Group mean quantification of the NBCe1 band (~140 kDa) normalized to CTL

group (CTL: n=4 mice; SCI: n=7 mice). **(C)** Two-photon fluorescence images of lumbar cord showing identified astrocytes (tdTomato) and cells loaded with pH-sensitive BCECF. Scale bar: 50 µm; inset: BCECF-loaded astrocytes (white arrows). Scale bar : 15 µm. **(D)** Pseudocolor images of BCECF signals in tdTomato(+) astrocytes before (left) and after 40s of L-glutamate application (right). ROI#1 shows increased pixel intensity, while ROIs #2 and #3 show decreased signal intensity in response to L-glutamate. **(E)** BCECF signal changes in response to L-glutamate in astrocytic ROIs from the same FOV in (D), showing alkalinization (top) or acidification (bottom). **(F)** Percentage of alkalinizing and acidifying responses to glutamate in astrocytes from CTL (top, black) and SCI (bottom, red) mice (CTL: n=263 ROIs, 4 mice; SCI: n=172 ROIs, 4 mice). **(G)** (Top) Average astrocyte acidic responses during L-glutamate exposure in aCSF showing enhanced acidosis post-SCI; (Bottom) Reduced response with NBCe1 blocker, S0859 (100 µM). **(H)** Violin plots of maximum BCECF acidic changes during L-glutamate exposure in CTL (left, black) and SCI (right, red) mice without (left) or with (right) S0859 (CTL: n=158 ROIs, 4 mice; SCI: n=139 ROIs, 4 mice; with S0859, CTL: n=64 ROIs, 4 mice; SCI: n=32 ROIs, 3 mice). Data: mean ± S.E.M, hatched line in violin plots are median. ns: not significant, *P < 0.05, ***P < 0.001. Mann-Whitney test for B; Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's post-hoc test for H; Fisher's test for F. See also Figure S3.

NBCe1-mediated prominent acidosis in astrocytes decreases Kir4.1 function after SCI

Intracellular pH modulates various cellular functions, including the weakly inwardly rectifying K^+ (Kir4.1) channel activity[36,37]. Given the alterated astrocytic pH regulation post-SCI, we investigated its impact on Kir4.1 functionality in reactive astrocytes. Immunohistochemistry confirmed the presence of Kir4.1 channels in astrocytes enwrapping ventro-lateral MNs in the lumbar spinal segments (L4-L5) (Figure 5A). In parallel, we assessed their pH sensitivity in our preparation. Patch-clamp recordings of GFP(+) astrocytes in the ventro-lateral lumbar slices of Aldh1L1-eGFP mice revealed a barium (Ba^{2+},100µM) -sensitive current indicative of Kir4.1 function, which was significanlty reduced under intracellular acidic conditions or post-SCI (Figures 5B-E). Interestingly, blockade of NBCe1 with S0859 (50µM) restored Kir4.1 conductance, highlighting the acidosis' detrimental effect on Kir4.1 function (Figures 5C-E). Then, we challenged GFP(+) astrocytes with high extracellular K^+ puff application (Figure 5F) to analyze K^+ inward current dynamics. We first confirmed that blockade of Kir4.1 channels with Ba^{2+} (100µM) significantly decreases the astrocytic K^+-mediated inward

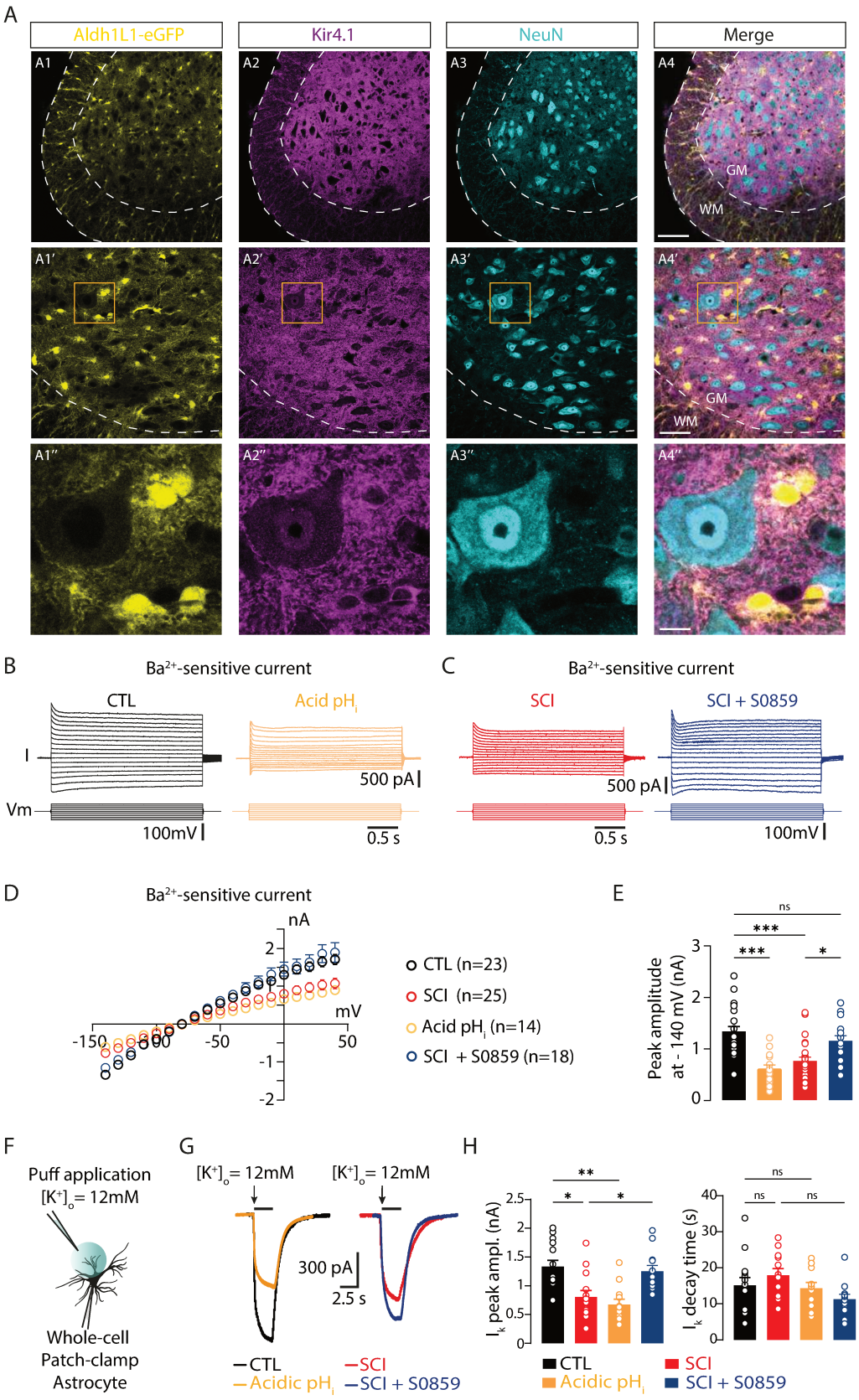


Figure 5. Increased NBCe1-mediated astrocytic acidosis following SCI impairs Kir4.1 function (A) Confocal images showing endogenous GFP (A1), and immunofluorescent staining for Kir4.1 (A2), NeuN (A3), and merged image (A4) in the ventro-lateral lumbar cord of an Aldh1L1-eGFP mouse. Scale bar: 120 µm. Higher

magnification (middle) shows astrocytes (A1') expressing Kir4.1 (A2') among neurons (A3'). Scale bar: 50 µm. Insets: close-up of astrocytes (A1'') expressing Kir4.1 (A2'') enwrapping a large ventro-lateral neuron, likely motoneurons (A3''). Scale bar: 10 µm. GM: gray matter; WM: white matter. **(B)** Superimposed Ba^{2+}-sensitive currents (top) from GFP+ astrocytes clamped at RMP in response to voltage pulses (bottom) in CTL mice with classic (pH=7.4, left) and acidic (pH=6.9, right) intracellular solution. **(C)** Superimposed Ba^{2+}-sensitive currents (top) from a GFP+ astrocyte at RMP with voltage pulses (bottom) in an SCI mouse without (left) and with (right) NBCe1 blocker, S0859. **(D)** I/V plots of Ba^{2+}-sensitive currents in CTL (black), CTL acidosis (yellow), SCI (red), and SCI + S0859 (blue). **(E)** Peak amplitude at -140 mV from Ba^{2+}-sensitive currents (CTL: n=23 astrocytes, 5 mice; CTL pH acidosis: n=14 astrocytes, 4 mice; SCI: n=25 astrocytes, 5 mice; SCI + S0859: n=18 astrocytes, 5 mice). **(F)** Experimental design diagram for recording K^+-inward currents in astrocytes. **(G)** Typical K^+-inward current traces following a K^+ puff (12mM) in astrocytes from CTL mice without (black) and with (yellow) acidic solution, and SCI mice without (red) and with (blue) S0859. (H) Peak amplitude of K^+ puff-mediated currents (CTL: n=14 astrocytes, 5 mice; CTL pH acidosis: n=12 astrocytes, 4 mice; SCI: n=14 astrocytes, 5 mice; SCI + S0859: n=12 astrocytes, 4 mice). Data: mean ± S.E.M. ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's post-hoc test for E and H. See also Figure S4.

current (Figures S4A-C). Additionally, the application of a K^+ puff (12 mM) induced an inward K^+ current, which was reduced in SCI astrocytes (Figures 5G and 5H). This decrease of the pH-sensitive current was restored by blocking NBCe1 . These results suggest that the NBCe1-mediated acidosis impairs K^+ uptake by decreasing Kir4.1 function in reactive astrocytes post-SCI.

Astrocytic Kir4.1 dysfunction leads to impaired K^+ homeostasis post-SCI

MN hyperexcitability occurs within a few days post-SCI in a newborn SCI model[10,12]. It has been shown that an effective regulation of extracellular K^+ concentration ($[K^+]_o$) is essential for limiting network hyperexcitability[38], with astrocytes primarily maintaining K^+ homeostasis through the activity of Kir4.1 channels[21,25]. Given that SCI induces Kir4.1 dysfunction, we investigated whether extracellular K^+ homeostasis was impaired in lumbar slices of SCI mice. To do so, we used K^+-sensitive microelectrodes to measure glutamate-induced changes in extracellular K^+ concentration in control and SCI lumbar slices, specifically in the ventro-lateral region where MNs are located (Figure 6A). The $[K^+]_o$ transients evoked by glutamate puff

(Figure 6B) showed a larger peak amplitude and area in SCI mice compared to controls while their rise slope and decay time were identical in both groups (Figure 6C). These findings indicate impaired glutamate-evoked K^+ homeostasis in the lumbar cord post-SCI. This prompted us to explore the impact of increased K^+ on the properties of large lumbar α-MNs in control mice (Figure 6D). We found that the rise in $[K^+]_o$ that we observed in SCI condition, enhanced MNs excitability by depolarizing their resting membrane potential (RMP) (Figure 6E) and decreasing their rheobase (Figures 6F), leading to a gain increase (Figure 6G). Additionally, we observed that the rise in $[K^+]_o$ decreased the peak amplitude of the slow inactivating outward K^+ currents, primarly mediated by the Kv1.2 channels, which may contribute to the amplification of the motor output[18]. Altoghether, these findings demonstrate that SCI impairs K^+ homeostasis in the lumbar cord, which in turn enhances MN excitability.

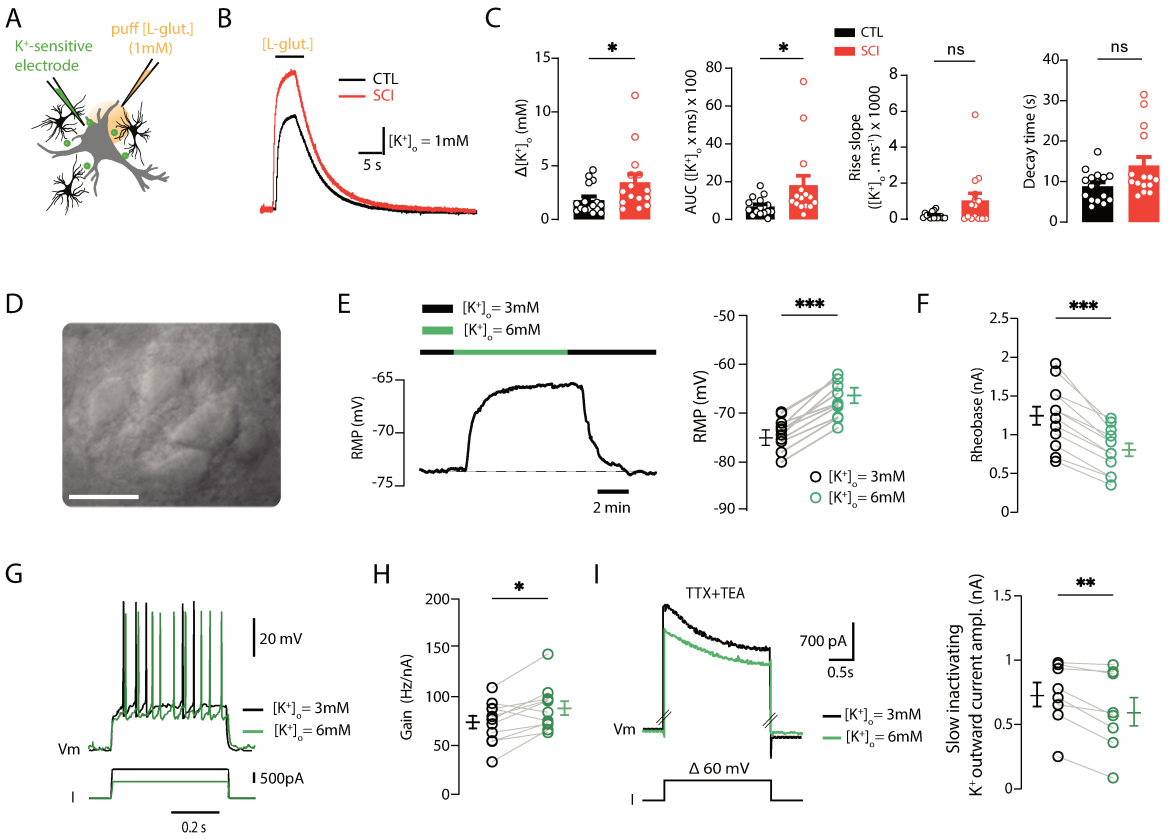


Figure 6. Impaired K^+ homeostasis mediates MN hyperexcitability after SCI (A) Schematic of experimental procedure. **(B)** Extracellular potassium concentration **(**$[K^+]_o$) increase following glutamate puff in the ventro-lateral horn of the lumbar cord from control (black) and SCI (red) mice. **(C)** Quantification of peak amplitude

(left), area under the curve (AUC) (middle left), rise slope (middle right), and decay time (right) of $[K^+]_o$ variation mediated by glutamate (CTL: n=16 slices, 7 mice; SCI: n=15 slices, 5 mice). **(D)** High magnification bright field image of an acute lumbar slice from a control mouse showing a pool of motoneurons (MNs) under IR-DIC. Scale bar : 40µm. **(E)** Illustration (left) and quantification (right) of reversible MN membrane depolarization mediated by $[K^+]_o$ = 6mM (green) (n=12 neurons, 4 mice). **(F)** Quantification of rheobase before (black) and during (green) [K+]o = 6mM. **(G)** Voltage traces from MNs recorded in response to incremented current steps before (black) and during (green) bath perfusion of $[K^+]_o$ = 6mM. **(H)** Quantification of the firing gain before (black) and during (green) $[K^+]_o$ = 6mM (n=11 neurons, 4 mice). **(I)** Superimposed outward K^+ currents in presence of TTX (1µM) and TEA (10mM) elicited by a depolarizing step (60mV) before (black) and during (green) $[K^+]_o$ = 6mM (n=8 neurons, 3 mice). Data: mean ± S.E.M. ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Mann-Whitney test for C, Wilcoxon test for E, F, H, and I.

Restoration of astrocytic Kir4.1 function reduces spasticity post-SCI

To evaluate whether restoring Kir4.1 function in astrocytes could alleviate spastic-like symptoms post-SCI, we performed EMG recordings of the *gastrocnemius* muscle in wild-type SCI mice (Figure 7A), injected at birth with AAV9 carrying GFP-tagged Kir4.1 (Kir4.1-GFP) or GFP-tagged Cre (Control-GFP) under the astrocytic promoter, gfaABC1D or GFAP, respectively. First, we confirmed that Kir4.1-GFP transduction increases Kir4.1 expression in the lumbar spinal cord (Figures S5A-D), while no Kir4.1-GFP transduction occurs in the supraspinal structures involved in motor control (Figure S5E). Then, we observed a significant reduction in spontaneous muscle spasm frequency from P15 in Kir4.1-GFP-treated SCI mice, although spasm duration remained unchanged (Figures 7C ; Figures S6A and S6B). Using sensory-evoked stimulation, we found a reduced duration of triggered spasms from P10 in Kir4.1-GFP-treated SCI mice (Figures 7D and 7E). Complementary DeepLabCut analysis[39] (Figures 7F; Figures S6C and S6D; Videos S1 and S2) demonstrated several additional differences between the Kir4.1-GFP-treated SCI mice and their control counterparts: (i) a decrease in spontaneous hindlimb motion frequency and acceleration from P10 and P20, respectively (Figure 7G), (ii) a significant decrease in duration of the hindlimb hyperextension from P10 in Kir4.1-GFP-treated SCI mice (Figure 7H), confirming our EMG recordings. Importantly, the tail pinch

stimulation was consistent accross both conditions (Figures S6Fand S6G).and no change in ankle angle variation in response to tail pinch was observed in both conditions (Figure 7H; Figure S6E). These *in vivo* results suggest that restoring Kir4.1 function in astrocytes decreases spastic-like symptoms, suggesting Kir4.1 as a therapeutic target for neurological disorders characterized by neuronal hyperexcitability.

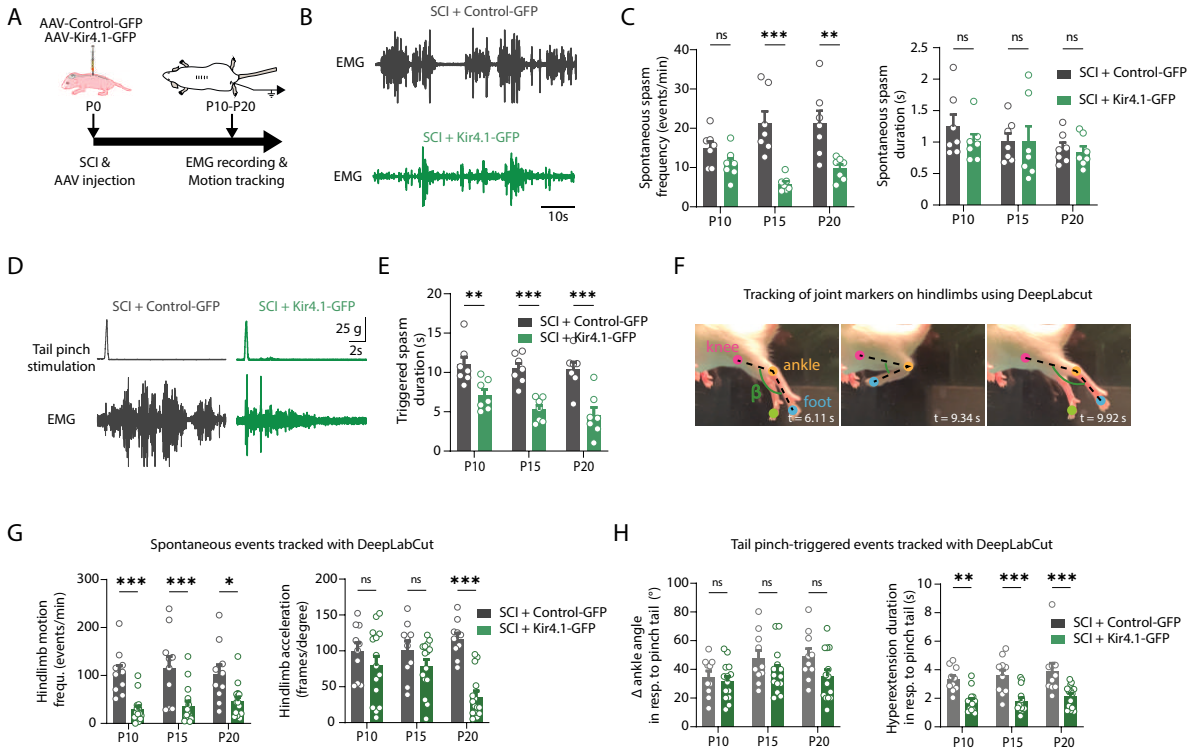


Figure 7. Kir4.1 gain of function in astrocytes reduces spastic-like symptoms in SCI mice (A) Experimental design for AAV targeting astrocyte therapy and *gastrocnemius* EMG recordings. **(B)** Typical *gastrocnemius* spontaneous EMG traces from SCI mice infected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green). **(C)** Quantification of spontaneous muscular event frequency (left) and duration (right) at three different ages in SCI mice injected with control (grey) or Kir4.1-AAV (green). **((D)** Example of *gastrocnemius* EMGs following tail pinch stimulation from SCI mice infected with control-AAV (left, grey) or Kir4.1-AAV (right, green). **(E)** Quantification of tail pinch-evoked muscular event duration at different ages in SCI mice injected with control-AAV (grey) and Kir4.1-AAV (green). For (C-E), SCI + control-AAV: n=7 mice; SCI + Kir4.1-AAV: n=7 mice. **(F)** Example of DeepLabCut tracking of joint markers on hindlimbs. Colored circles show digital markers for analysis. **(G)** Quantification of spontaneous hindlimb motion event frequency (left) and acceleration (right) at different ages in SCI mice injected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green). **(H)** Quantification of ankle angle variation (left) and hindlimb hyperextension duration (right) triggered by tail-pinch stimulation at different ages in SCI mice injected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green). For (G-H), SCI + control-AAV: n=10 mice; SCI + Kir4.1-AAV: n=15 mice. Data: mean ± S.E.M. ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test. See also Figures S5 and S6.

Discussion

Our study reveals novel insights into neuro-glial interactions within spinal motor circuits and demonstrate that improving Kir4.1 function in astrocytes reduces spasticity in SCI mice. Employing a multifaceted methodology that includes advanced imaging techniques, electrophysiology, immunohistochemistry, and genetic tools, we explored the effects of enhancing astrocytic K^+ uptake in alleviating spasticity. We found that thoracic SCI prompts lumbar astrocytes to adopt a reactive phenotype characterized by significant morphological and functional alterations, as well as the upregulation of inflammatory markers. These reactive astrocytes exhibit increased intracellular acidosis mediated by NBCe1, disrupting the function of Kir4.1 channels and leading to compromised K^+ absorption which heightened MN excitability.

Morphological and inflammatory changes from lumbar astrocytes following thoracic SCI

Reactive astrocytes undergo morphological, molecular and functional remodelling in response to various CNS injuries in surrounding tissue[23,24,40]. Reactive astrocytes at the glial scar protect tissue and preserve function after SCI by restricting the spread of inflammatory cells[41,42]. However, the occurrence and nature of astrocyte reactivity in regions distal to the injury site post-SCI remain poorly understood. Here, we reveal that thoracic SCI induces significant astrocyte reactivity within the lumbar region, evidenced by hypertrophied and increased complexity of astrocytic processes. We also report an overall rise in GFAP intensity within the ventral horn's gray matter, without modification of the astrocyte/motoneuron ratio, thus underscoring the pervasive astrocytic presence around α-MNs as observed in amyotrophic lateral sclerosis[43] or spinal muscular atrophy[44] mouse models. In our study, we also observed a modest but significant increase in the pro-inflammatory markers (C3d, STAT3) in lumbar

astrocytes following SCI. Previous studies focusing on the spinal motor networks, indicated that pro-inflammatory cytokines from microglia, such as IL-1α, IL-6, TNF-α, and C1q, may drive the enhanced astrocytic expression of C3[28,43] and pSTAT3 signaling[45,46]. Moreover, the persistent activation of astrocytic STAT3 has been shown to depend on increased Ca^{2+} signaling in a mouse model of chronic inflammatory itch[47]. These findings further underscore the significance of exploring the astrocytic Ca^{2+} dynamics after SCI.

Functional changes from lumbar astrocytes following thoracic SCI

In conjunction with morphological evaluations, we investigated the functional plasticity of lumbar astrocytes post-SCI. Reactive astrocytes demonstrate varied Ca^{2+} dynamics across different pathological models, stages (acute vs. chronic), and anatomical regions[40]. Generally, these cells show dysregulated Ca^{2+} signaling, predominantly characterized by heightened Ca^{2+} activity[48–50], though reductions in Ca^{2+} signaling have also been reported[51,52]. Our two-photon Ca^{2+} imaging data indicate significant alterations in Ca^{2+} signaling in lumbar astrocytes from SCI mice. Specifically, we observed an increase in both (i) the proportion of spontaneous active astrocytic Ca^{2+} transients and (ii) the glutamate-evoked Ca^{2+} activity in astrocytic soma, processes, and microdomains. Ca^{2+} signaling is crucial as it impacts numerous cellular processes, including the modulation of neurotransmitter release[53] and K^+ buffering capacity[54,55]. Moreover, simultaneous Ca^{2+} imaging from both neurons and astrocytes using dual-color genetically encoded calcium indicators (GECIs) revealed that astrocyte-neuron Ca^{2+} signalling is enhanced after SCI. While further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms, these findings suggest that the increased and widespread Ca^{2+} signalling in astrocytes may fuel neuronal hyperexcitability and subsequent spasticity following SCI.

Supporting this notion, a proconvulsive potential of astrocyte Ca^{2+} signals in promoting the spread of epileptiform activity within the hippocampal networks has been demonstrated[56].

pH alterations in lumbar astrocytes post-SCI

Alterations in brain pH are recognized as critical indicators of various pathological states[57], with astrocytes playing a key role in maintaining an intricate pH balance between the intra and extracellular environments[15]. In our study, we identified two distinct astrocytic populations in control mice that responded to glutamate in divergent ways affecting intracellular pH: the majority (~70%) exhibited intracellular acidification, likely for maintaining the extracellular pH homeostasis during sustained neuronal activity through activity-dependent $HCO3^-$ efflux[33], whereas the minority (~30%) showed intracellular alkalinization, possibly facilitated by K^+-stimulated NBCE1 activity that supports energy metabolism during astrocytic glycolysis[58]. Following SCI, our two-photon imaging data indicated a rise in the proportion of acidifying astrocytes to 92%, with an increase in the amplitude of acidifying pHi responses. These changes could be attributed to a pSTAT3-dependent increase in NBCE1 expression[59] and a shift in NBCE1 activity towards its outward mode triggered by enhanced astrocytic Ca^{2+} signaling[34,35]. Additionally, chronic hypoxia beneath the injury site, due to compromised capillary blood flow[60], may further drive NBCe1-induced Ca^{2+} transients in astrocytes, thereby exacerbating intracellular pH acidification[35,61,62]. Additional research is needed to explore the roles of other factors (i.e. NCX, AE, …) in this intensified astrocytic pH acidification[57,63].

Acidosis-mediated dysfunction of Kir4.1 leading to increased extracellular K+ post-SCI

Effective extracellular potassium (K^+) removal is essential for maintaining brain homeostasis and limiting network hyperexcitability, as impairments in K^+ clearance are associated with various pathological states[38,64–66]. The maintenance of K^+ homeostasis is predominantly performed by astrocytes, primarily through the activity of the weakly inwardly rectifying Kir4.1 K^+ channels[21,25]. Given the pH sensitivity of Kir4.1 to acidosis[36,37], we confirmed that NBCe1-mediated pH acidification impairs Kir4.1 channel function post-SCI, thereby compromising the reactive astrocytes' capacity to buffer extracellular K^+. This dysfunction is exacerbated by acidosis but can be reversed by NBCe1 blockade, emphasizing the detrimental impact of acidosis on Kir4.1 activity and resulting K^+ imbalance post-SCI. We previously demonstrated that SCI displays early and chronic MN hyperexcitability[10,12], which occurs alongside with the astrocytic Kir4.1 deficits observed in this study. Additionnally, we observed that increase in extracellular K^+ reduces the delayed rectifying K^+ current, Kv1.2, potentially amplifying motor output[18]. However, unlike in the hippocampus[67], the increase in K^+ did not affect the persistent sodium current (INaP) that is typically amplified post-SCI[11]. This discrepancy may be attributed to the moderate (~3mM) rise in K^+ in response to glutamate post-SCI, aligning with the sensory-evoked K^+ rise observed in striatal and hippocampal networks under pathological conditions[65,66]. Collectively, these findings underscore the importance of correcting K^+ dysregulation to decreases MN hyperexcitability and thus potentially reduce spasticity post-SCI.

Kir4.1 gain of function for decreasing spasticity post-SCI

The observation that impaired K^+ homeostasis leads to MN hyperexcitability post-SCI raise the question of whether increasing astrocytic Kir4.1 function could decrease spasticity. Previous studies have shown that a selective restoration of Kir4.1 function in astrocytes reverts Huntington disease-like symptoms[51,65], can relieve chronic hyperalgesia in neuropathic pain[68] and improves cognitive and social performance in a Fragile X syndrome mouse model[66]. Spinal astrocytes might thus play a key role in modulating motor troubles after SCI as: (i) they are present in high proportion in the ventral horn[69], (ii) they control pathological tremor by tuning excitatory synaptic transmission through the release of purines[19], and (iii) the Rac1 activity in astrocytes can contribute to hyperreflexia following SCI[70]. Our viral approach specifically targeted Kir4.1 channels, which are highly expressed in astrocytes around large α-MNs[22]. α-MNs have the capacity to display a sustained firing pattern[71,72], which is enhanced post-SCI[4,7,12]. By enhancing Kir4.1 function in spinal astrocytes, we observed a significant alleviation of spastic-like symptoms in SCI mice. The reduction in muscle spasm frequency and duration in treated mice highlights the functional importance of Kir4.1 channels in modulating neuronal excitability and controlling spasticity post-SCI.

Limitations of the Study

Our study provides new biological insights onto neuroglial crosstalk in the spinal motor network and broaden the spectrum of therapeutic targets for restoring compromised neuronal excitability in neurological diseases involving altered K^+ homeostasis. However, some limitations warrant consideration. Primarily, by focusing on Kir4.1, we may have overlooked the potential contributions of other ion channels or molecular components, notably Na^+K^+ ATPase pump, which could play a pivotal role in regulating K^+ homeostasis[73]. Additionally, in a

translational point of view, the juvenile SCI model may not accurately mirror the complexities of adult SCI environment. Moreover, considering the diverse forms of spasticity in humans and the various models used in mice[74], it will be important in future work to establish whether our findings extend to the other forms and models of spasticity, such as those induced by SCI, stroke or neurodegenerative diseases like Parkinson's disease or multiple sclerosis. Our results also highlight the significance of astrocyte-selective AAV gene therapy in biomedical research. However, AAV technologies are still in their infancy regarding clinical trials aimed at treating CNS disorders, and optimizing delivery methods to enhance both safety and efficacy[75] are necessary.

Supplementary Figures

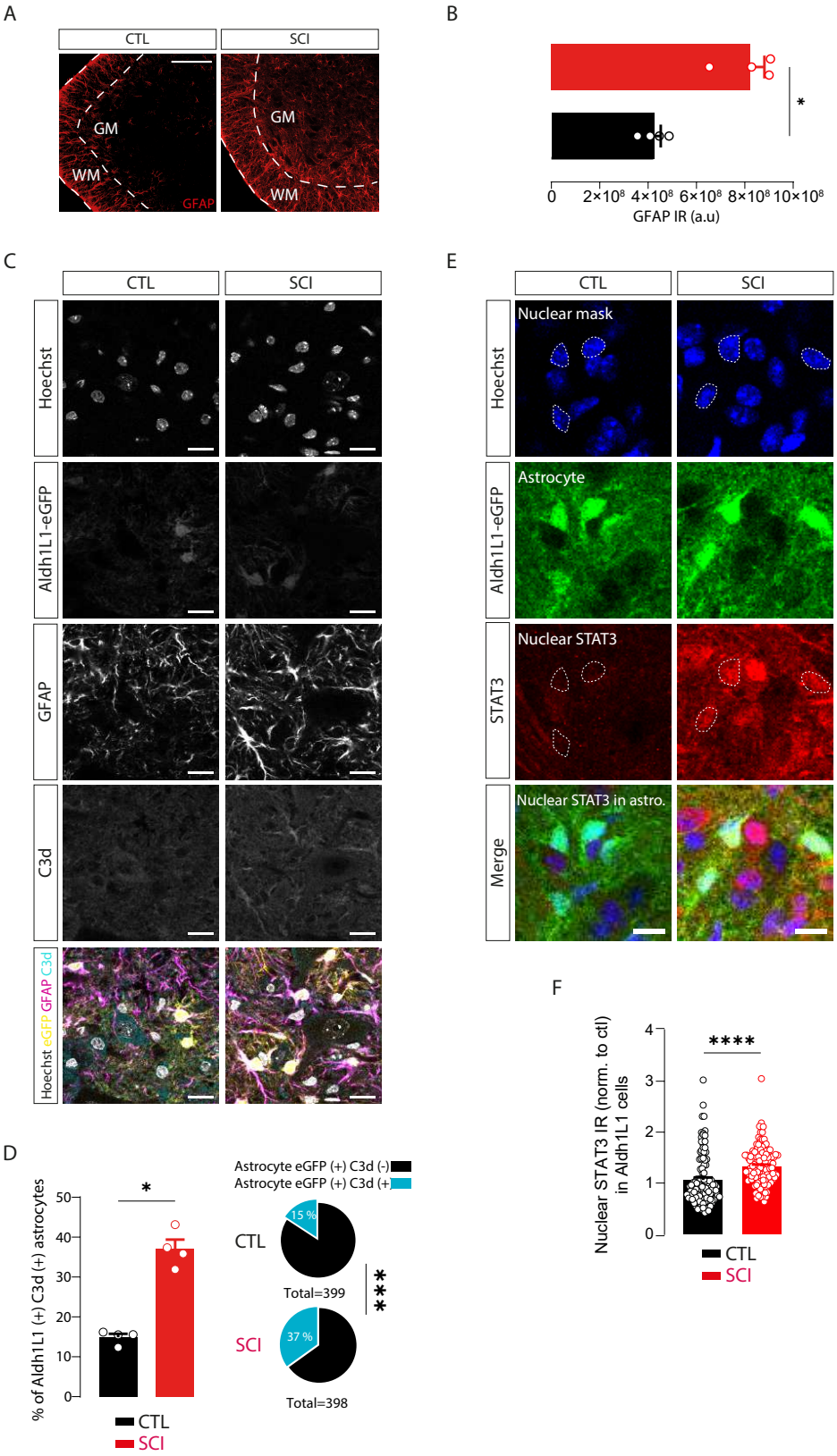


Figure S1 : Increased GFAP staining is associated with increased inflammatory markers the lumbar segments after thoracic SCI. (A) Confocal images showing immunoflorescent staining of GFAP in the ventro-lateral region of the lumbar cord from control (CTL) (left) or spinal cord injured (SCI) (right) mice. Scale bar

= 100 µm. GM : grey matter ; WM : white matter. **(B)** Quantification of GFAP immunoreactivity (IR) within the ventro-lateral part of the spinal cord (CTL: n = 4 mice ; SCI: n = 4 mice). **(C)** Confocal images of the MNs pool from a CTL Aldh1L1-eGFP mouse (left) and an SCI Aldh1L1-eGFP mouse (right), showing endogenous eGFP (upper middle) and immunofluorescent staining for Hoechst (top), GFAP (middle), C3d (lower middle), and the merged image (bottom). Scale bar = 15 µm **(D)** *Left*, quantification of double Aldh1L1 (+) and C3d (+) astrocytes in CTL (black) and SCI (red) mice. *Right***,** cumulative proportion of double Aldh1L1 (+) and C3d (+) astrocytes in CTL (top) and SCI (bottom) mice (CTL: n = 4 mice, n = 399 astrocytes; SCI: n = 4 mice, n = 398 astrocytes). **(E)** Confocal images of the MNs pool from a CTL Aldh1L1-eGFP mouse (left) and an SCI Aldh1L1-eGFP mouse (right), showing endogenous eGFP (upper middle) and immunofluorescent staining for Hoechst (top), STAT3 (lower middle), and the merged image (bottom). Note that the hatched white line regions of interest (ROIs) represent the nuclear segmentation (Hoechst signal) used to measure nuclear STAT3 immunoreactivity (IR). Scale bar = 10 µm. **(F)** Quantification of nuclear STAT3 IR in Aldh1L1(+) astrocytes (CTL: n = 2 mice, n = 109 astrocytes; SCI: n = 2 mice, n = 122 astrocytes). Data: mean ± S.E.M. *P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 Mann-Whitney test for B, D (left) and F; Fisher's test for D (right).

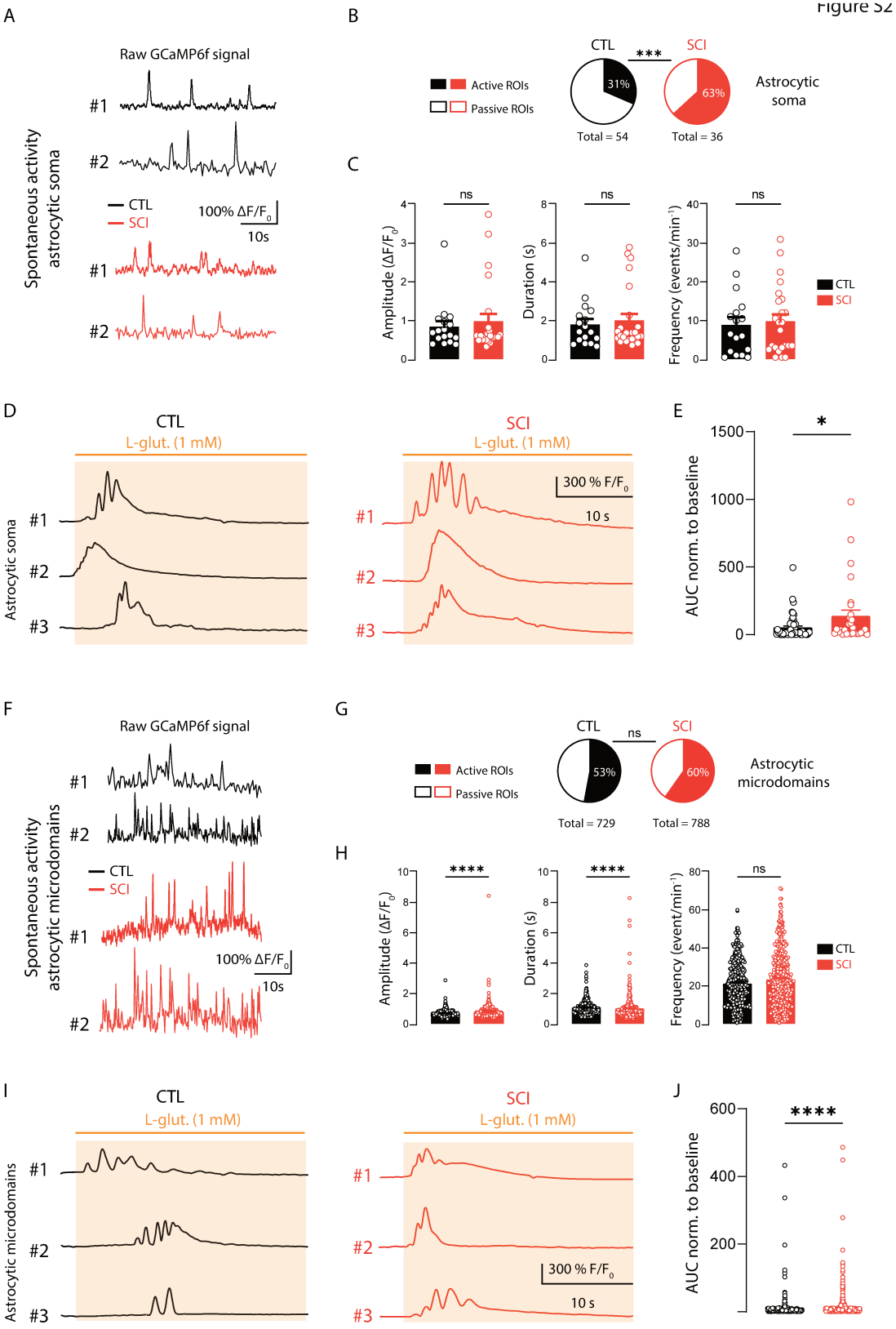


Figure S2 : Spontaneous and glutamate-evoked Ca^{2+} transients in astrocytic soma and microdomains after SCI. (A) Examples of spontaneous GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocyte soma from CTL (top, black) and SCI (bottom, red) mice. **(B)** Percentage of active versus silent astrocytic soma from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 54 ROIs, n = 7 mice ; SCI : n = 36 ROIs, n = 5 mice). **(C)** Quantification of the spontaneous

GCaMP6f Ca^{2+} transients amplitude (left), duration (middle), and frequency (right) in astrocytic soma from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 54 ROIs, n = 7 mice ; SCI : n = 36 ROIs, n = 5 mice). **(D)** Examples of glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocytic soma from CTL (left, black) and SCI (right, red) mice. **(E)** Quantification of the astrocytic area under the curve (AUC) of the glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in soma from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 29 ROIs, n = 6 mice, SCI : n = 52 ROIs, n = 5 mice). **(F)** Examples of spontaneous GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocytic microdomains from CTL (top, black) and SCI (bottom, red) mice. **(G)** Percentage of active versus silent astrocytic microdomains from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 729 ROIs, n = 7 mice ; SCI : n = 788 ROIs, n = 5 mice). ROIs means regions of interest. **(H)** Quantification of the spontaneous GCaMP6f Ca^{2+} transients amplitude (left), duration (middle), and frequency (right) in astrocytic microdomains from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 729 ROIs, n = 7 mice ; SCI : n = 788 ROIs, n = 5 mice). **(I)** Examples of glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in astrocytic microdomains from CTL (left, black) and SCI (right, red) mice. **(J)** Quantification of the astrocytic area under the curve (AUC) of the glutamate-evoked GCaMP6f Ca^{2+} transients in microdomains from CTL (black) and SCI (red) mice (CTL : n = 611 ROIs, n = 6 mice, SCI : n = 593 ROIs, n = 5 mice). ROIs mean regions of interest. All data are expressed as mean ± S.E.M. ns: not significant, **P < 0.01, ***P < 0.001, Mann-Whitney test for C, E, H and J; Fisher's test for B and G.

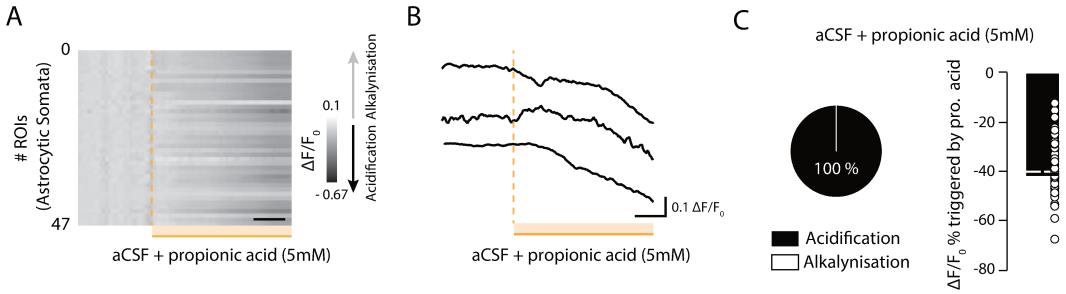


Figure S3 : Effect of propionic acid on astrocytic intracellular pH monitored with the pH-sensitive probe BCECF. **(A)** Heatmap showing BCECF fluorescent changes in tdTomato (+) astrocytes before (left from the orange vertical dashed line) and during (right from the orange vertical dashed line) exposure of propionic acid. **(B)** Examples of BCECF signal changes in response to propionic acid exposure in astrocytes. Note, astrocytes exhibit only one response pattern : acidification (decrease in fluorescence) in response to propionic acid exposure. **(C)** Percentage of alkalynizing and acidifying responses in astrocytes from CTL mice in response to propionic acid perfusion (CTL : n = 263 ROIs, n = 4 mice). All data are expressed as mean ± S.E.M.

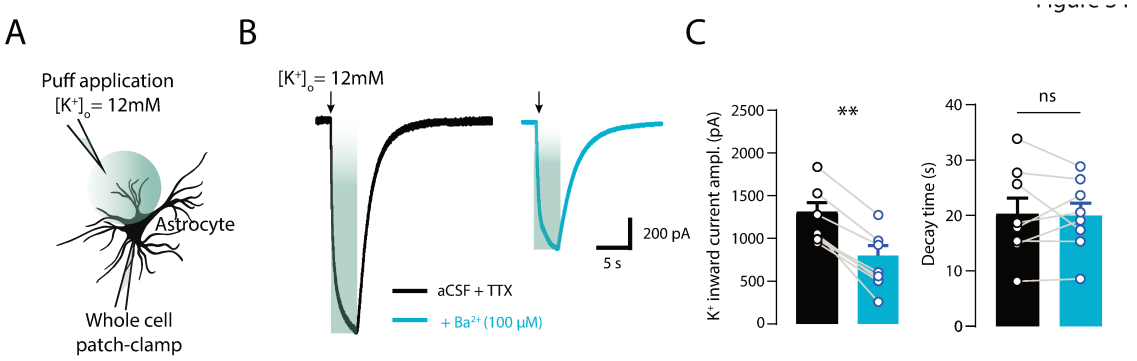


Figure S4 : Blockade of Kir4.1 channels affects astrocytic K^+ uptake. **(A)** Diagram illustrating the experimental procedure for recording K^+-inward current in astrocytes in presence of the voltage-gated sodium channel blocker, tretodotoxin (TTX). **(B)** Typical K^+-inward current traces under TTX following a puff application of K^+ (12mM) in astrocytes clamped at resting membrane potential from CTL mice in the absence (black) or presence (cyan) of the Kir4.1 channels blocker, Barium (Ba^{2+}). **(C)** Quantification of the astrocytic current peak amplitude and decay time time mediated by the K^+ puff in TTX (black) and TTX + Ba^{2+} (cyan) (n = 8 astrocytes, n = 3 mice). All data are expressed as mean ± S.E.M. ns : not significant, $^{**}P < 0.01$, Wilcoxon test for C.

Figure S5

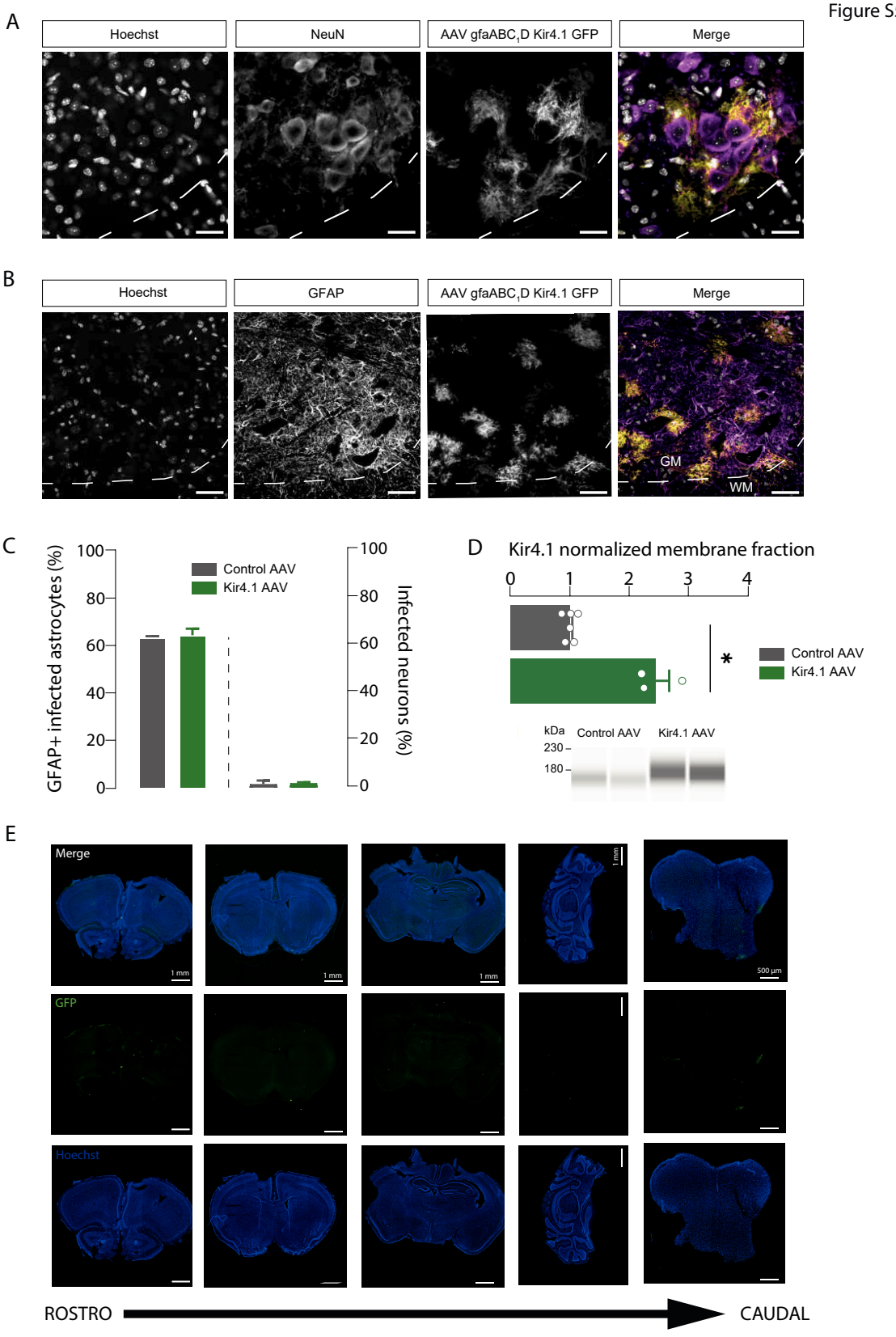

A
Hoechst
NeuN
AAV gfaABC1D Kir4.1 GFP
Merge
B
Hoechst
GFAP
AAV gfaABC1D Kir4.1 GFP
Merge
GM
WM
C
GFAP+ infected astrocytes (%)
Infected neurons (%)
Control AAV
Kir4.1 AAV
D
Kir4.1 normalized membrane fraction
Control AAV
Kir4.1 AAV
kDa
230
180
E
Merge
GFP
Hoechst
ROSTRO
CAUDAL

Figure S5 : Efficiency, specificity and diffusion of the viral strategy for boosting astrocytic Kir4.1. (A) Confocal images showing immunoflorescent staining with Hoechst (left), NeuN (middle left), the endogenous GFP (middle right) and the merged signal (right) in the ventro-lateral region of a lumbar slice from a wild-type mouse (P21) injected at birth with AAV2/9-gfaABC1D-Kir4.1-GFP. The images, presented at different magnifications (top to bottom), depict the ventral section with grey matter (GM) and white matter (WM) (top), and an intermediate view of the motoneuron pool (bottom). (**B)** Confocal images showing immunoflorescent staining with Hoechst (left), GFAP (middle left), the endogenous GFP (middle right) and the merged signal (right) in the ventro-lateral region of a lumbar slice from a wild-type mouse (P21) injected at birth with AAV2/9-gfaABC1D-Kir4.1-GFP. **(C)** Proportion of GFAP (+) astrocytes (left y axis) or NeuN (+) neurons (right y axis) expressing GFP at P21 in response to birth injection of AAV-Control-GFP (grey) or AAV-Kir4.1-GFP (green). **(D)** Top : Group mean quantification of the Kir4.1 band (~ 180 kDa) normalized to the CTL group (CTL : n = 4 mice ; SCI: n = 7 mice). Kir4.1 bands were normalized to their own total protein content. Bottom : Kir4.1 pseudo-gel images from capillary western blot of lumbar segments from wild-type mice injected with Control-AAV (left) and Kir4.1-AAV (right). **(E)** Representative confocal images display Hoechst dye (left) and eGFP fluorescence signal (middle) across various coronal sections of the brain, hindbrain, and brainstem in a P21 mouse injected at birth with AAV-Control-GFP. The merged signals are shown on top. AAV2/9 with a self-complementary genome expressing eGFP was administered intrathecally (n = 2 Control-GFP mice and n = 2 Kir4.1-GFP mice). None of the four injected mice exhibited GFP fluorescence in brain structures associated with motor control. Data are presented as mean ± S.E.M. *P < 0.05, Mann-Whitney test for D.

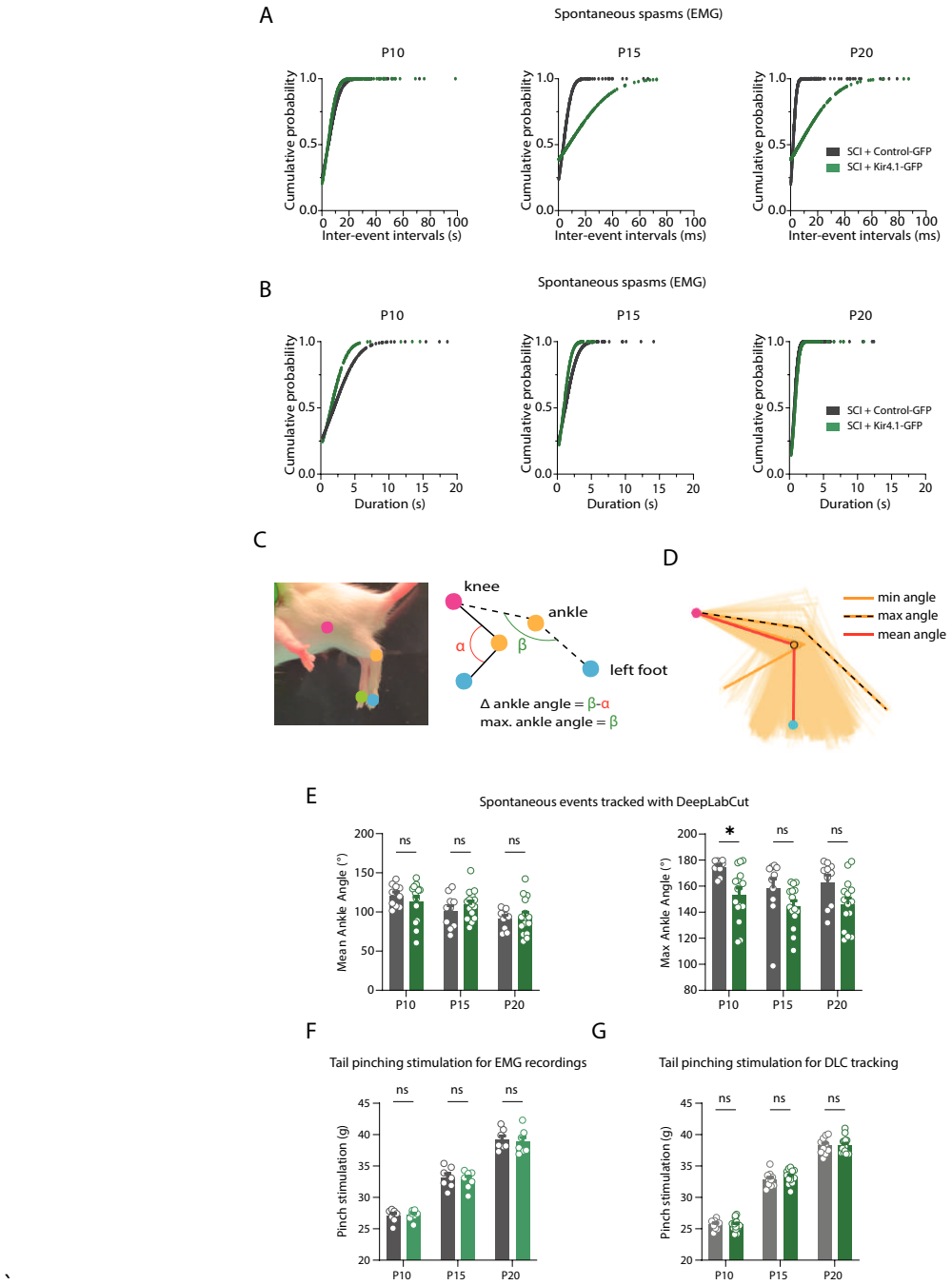


Figure S6 : Complementary metrics for assessing spasticity using EMG recordings and DLC tracking. (A-B) Cumulative probability distribution for spontaneous inter-event intervals (A) and event durations (B) at P10, P15 and P20 in SCI mice injected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green) (SCI control AAV n=7 mice ; SCI Kir4.1 AVV n=7 mice). **(C)** Video frame of a mouse with automated body part labeling using DLC. **(D)** Representative stick diagram of hindlimb motion following tail pinch showing an example of the mean and the maximum ankle angle (β). Each stick represents a frame extrated from a video recording. **(E)** Quantification of the variation in the mean (left) and the maximum (right) ankle angle induced by tail-pinch stimulation at P10, P15 and P20 in SCI mice injected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green). SCI + control-GFP: n = 10 mice ; SCI + Kir4.1-GFP : n=15 mice. **(F)** Quantification of the tail pinching stimulation intensity for EMG procedure (left) and for DLC acquisition (right) showing no differences between mice injected with control-AAV (grey) or Kir4.1-AAV (green) at P10, P15 and P20. SCI + control-GFP: n = 10 mice ;

SCI + Kir4.1-GFP : n=15 mice. All data are expressed as mean ± S.E.M. ns : non significant, *P < 0.05, 2 way ANOVA Sidak's multiple comparaison test for E, F and G.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model

Mice and ethical standards

CD1 mice of either sex (P12-P18 for patch-clamp recording, P13-P20 for two-photon Ca^{2+} imaging, P10, P15 and P20 for EMG recordings and DeepLabCut procedure) were housed under a 12h light/dark cycle in a temperature-controlled area with *ad libitum* access to water and food. *Aldh1L1*-eGFP mice (CD1 background) expressing GFP in astrocytes were kindly provided by Nathalie Rouach (Collège de France, CNRS, INSERM, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France). Animals from different litters were used for each experiment. Sample sizes (number of spinal cords and/or cells) for each experiment are indicated in figure legends. All animal care and use were conformed to the French regulations and approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique en experimentation animale CE n°071 (INT-Marseille, Nb B 13 014 04), APAFIS authorizations: Nb 17485-2018110819197361 and Nb 44572-2023072115506121).

Experimental procedures

Spinal cord injury (SCI)

The spinal cord transsection was performed on P0-P1 neonatal mice, including both wild-type and *Aldh1L1*-eGFP mice. The animals were anesthetized *via* hypothermia and received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.025 mg/kg; Vetergesic, CEVA Santé Animale, France). After a midline skin incision, a laminectomy was performed to expose lower thoracic segments of the spinal cord. The dura was opened and the spinal cord was completely transected at the T8-T9 segmental level. The lesion cavity was filled with sterile absorbable collagen contact hemostat (Pangen, Urgo Medical, France). One drop (ca 20-30 µl) of the antibiotic amoxicillin (Citramox, Axience, France) was subcutaneously applied at the incision site. Finally, the wound was closed with 6-0 absorbable suture (Z1032H, Ethicon, NJ) and covered with adhesive suture (Steri-Strip, R1546, 3M Health Care, MN). Animals were kept in a warm and wet chamber for 2 hr in cotton-wool swab impregnated with their mother smell before they returned to the home cage with their mother. Sham animals were submitted to all procedures except the laminectomy and the spinal cord transection.

Adeno-associated virus (AAV) constructs

AAV2/5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f (52925-AAV5, titer ≥ $1*10^{13}$ vg/mL), AAV2/9-Syn.NES-jRGECO1a.WPRE.SV40 (100854-AAV9, titer ≥ $1*10^{13}$ vg/mL), AAV2/5-gfaABC1D-tdTomato (44332-AAV5, titer ≥ $7*10^{12}$ vg/mL) were sourced from Addgene (https://www.addgene.org/). AAV2/9-GFAP-eGFP-Cre (titer ≥ $2.5*10^{10}$ vg/mL) AAV2/9-gfaABC1D-eGFP-Kir4.1 (titer ≥ $2.3*10^{11}$ vg/mL) were kindly provided by the Hu lab[76].

Intrathecal AAV delivery

A minimally invasive technique was employed to micro-inject AAV vectors through the intervertebral space. Briefly, in cryoanesthetized pups, a beveled microcapillary (30-60 µm in diameter) preloaded with the AAV particles was lowered to reaches the subarachnoidal space at the L3-L4 segments. A total volume of 2 µL per animal was then progressively injected (1 µL/5s).

Lumbar slice preparation and artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) solution

Mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of a mixture of ketamine/xylazine (100mg/kg and 10 mg/kg, respectively). They were then decapitated, eviscerated and the spinal cord removed by laminectomy, and placed in a Sylgard-lined petri dish with ice-cold (1-2°) aCSF containing (in mM): sucrose (252), KCl (3), NaH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (4), $CaCl_2$ (0.2), $NaHCO_3$ (26), D-glucose (25), pH 7.4. The lumbar spinal cord was mounted on an agar block, embedded in a 4% agarose solution, quickly cooled, and then sliced into 325 µm sections through the L4–L5 lumbar segments using a vibrating microtome (Leica, VT1000S). Slices were immediately transferred into the holding chamber filled with bubbled (95% O_2 and 5% CO_2) standard aCSF composed of (in mM): NaCl (120), KCl (3), NaH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (1.3), $CaCl_2$ (1.2), $NaHCO_3$ (25), D-glucose (20), pH 7.4, 30-32°C. After a 30-60 min resting period, individual slices were transferred to a recording chamber continuously perfused with standard aCSF heated to 32-34°C.

Ex vivo electrophysiological recordings

Aldh1L1-eGFP positive astrocytes were visualized in the ventrolateral region of lamina IX in L4-L5 horizontal slices using an Nikon FN1 microscope with appropriate filters. Whole-cell patch-clamp recordings of GFP(+) astrocytes and surrounding large motoneurons (MNs) (soma area >800 μm^2)[72] were performed using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices) with

electrodes pulled from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.12 mm ID; World Precision Instruments) on a Sutter P-97 puller (Sutter Instruments Company). For MN recordings, electrodes (2-4 MΩ) were filled with an intracellular solution containing (in mM): K^+-gluconate (140), NaCl (5), $MgCl_2$ (2), HEPES (10), EGTA (0.5), ATP (2), GTP (0.4), pH 7.3. For GFP+ astrocyte recordings, electrodes (6-8 MΩ) were filled with an intracellular solution containing (in mM): K^+-gluconate (105), NaCl (10), KCl (20), $MgCl_2$ (0.15), HEPES (10), EGTA (0.5), ATP (4), GTP (0.3), pH 7.3. In some experiments, the intracellular pH was lowered to 6.9 by the addition of HCl. Patch clamp recordings were made using a Multiclamp 700B amplifier driven by PClamp 10 software (Molecular Devices). Recordings were digitized on-line and filtered at 10 kHz (Digidata 1550B, Molecular Devices). Pipette and neuronal capacitive currents were canceled and, after breakthrough, the access resistance was compensated. All experiments were designed to gather data within a stable period (i.e., at least 1-2 min after establishing whole-cell access).

Ex vivo two-photon Ca^{2+} imaging

Two-photon fluorescence measurements were obtained with a dual-scanhead two-photon microscope (FemtoS-Dual, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary) and made using an Olympus XLUMPlanFLN 20X, 1.00 NA objective (Olympus America, Melville, NY) or a Nikon LWD 16X/0.80W objective (Nikon Instruments Inc. Melville, NY). For two-photon Ca^{2+} imaging, excitation of GCaMP6f and jRGECO1a was simultaneously evoked with a femtosecond pulsed laser (Chameleon Ultra II; Coherent, Santa Clara, CA) tuned to 960 nm. Recordings were performed at ~32−34 °C in standard aCSF saturated with 95% O_2/5% CO_2 (pH 7.4). The microscope system was controlled by MESc acquisition software (https://femtonics.eu/femtosmart-software/, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary). A single acquisition plane was selected and full-frame imaging was started in a resonant scanning mode at 30.5202 Hz. Scan parameters were [pixels/line × lines/frame (frame rate in Hz)]: [512 × 519 (30.5202)]. Scanning area was 468 µm * 474 µm. This microscope was equipped with two detection channels for fluorescence imaging.

Ex vivo two-photon imaging of intracellular pH (pH_i) in astrocytes

Lumbar slices were incubated in standard aCSF containing BCECF (5 µM) and Pluronic® F-127 (0.02%) for ≃ 45 min followed by a through washing out to allow de-esterification of the dye.

Two-photon fluorescence measurements were obtained with a dual-scanhead two-photon microscope (FemtoS-Dual, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary) and made using an Olympus XLUMPlanFLN 20X, 1.00 NA objective (Olympus America, Melville, NY) or a Nikon LWD 16X/0.80W objective (Nikon Instruments Inc. Melville, NY). For two-photon BCECF signal imaging, excitation was simultaneously evoked with a femtosecond pulsed laser (Chameleon Ultra II; Coherent, Santa Clara, CA) tuned to 820 nm. Recordings were performed at ~32−34 °C in aCSF saturated with 95% O_2/5% CO_2 (pH 7.4). Astroglial loading of BCECF was confirmed by analysing the characteristic morphology of the BCECF-stained cells featuring astrocytic phenotype from mice injected at birth with AAV AAV2/5-gfaABC1D-tdTomato. Changes in pH_i are expressed as changes in BCECF fluorescence at the maximum of the fluorescent signal over the baseline ($\Delta F/F_0$). The microscope system was controlled by MESc acquisition software (https://femtonics.eu/femtosmart-software/, Femtonics Ltd, Budapest, Hungary). A single acquisition plane was selected and full-frame imaging was started in a resonant scanning mode at 30.5202 Hz. Scan parameters were [pixels/line × lines/frame (frame rate in Hz)]: [512 × 519 (30.5202)]. Scanning area was 468 µm * 474 µm. This microscope was equipped with two detection channels for fluorescence imaging.

Puff-application of extracellular **K^+**

To measure the astrocytes' potassium (K+) uptake capacity, a high extracellular potassium concentration ($[K^+]_o$, 12mM) was added to standard aCSF and delivered via a pipette similar to the recording pipette, controlled by a Picospritzer (Picrospritzer II, General Valve Corporation) set at 10 psi. The electrode was positioned in the ventro-lateral part (lamina IX) of a lumbar slice, within ~60 µm of a GFP+ astrocyte soma.

Measurement of extracellular K^+ concentration

K^+-sensitive microelectrodes were made from thin-walled borosilicate theta tubes (GC150T-10, Harvard Apparatus, MA) following the procedure described in[77]. Briefly, the theta tubes were washed in 70% ethanol for 1 hour, then for 1 hour in ultra-pure water, and dried in the oven overnight at 60°C. The double-channel pipettes were pulled to obtain a tip diameter of 3-5 µm. One channel was filled with 150 mM NaCl and the second one with 100 mM KCl. The inside of the tip of the KCl-containing channel was silanized using Silanization Solution I (85126, Merck-Sigma Aldrich) and then filled with Potassium Ionophore I Cocktail A (99311,

Merck- Sigma Aldrich). The electrode tip was immersed in a 100 mM KCl solution for 3 hours or longer for stabilization. Before each recording session, the electrode was calibrated using ACSF solutions enriched with gradually decreasing KCl concentrations: 20 mM, 10 mM, 6 mM, 3 mM, 1.25 mM, 0.6 mM, 0.3 mM. The K^+ sensor was accepted for the experiment if it generated a stable potential at each K^+ concentration and displayed a >540 mV increase at 30 mM K^+ drop.

The extracellular potassium concentration ($[K^+]_o$) was measured in acute lumbar slices from control and spinal cord injury (SCI) mice. Experiments were conducted in standard aCSF, saturated with 95% O2/5% CO2 (pH 7.4) and heated to 32-34°C. L-glutamate (1 mM, 5 s, at 10 psi) was puffed using a glass pipette connected to a picospritzer (Picrospritzer II, General Valve Corporation). Both the puff electrode and the K^+-sensitive microelectrode were aligned and positioned in the ventro-lateral part (lamina IX) of the lumbar slice, within ~50 µm of each other in the z axis. Basal $[K^+]_o$ was measured after proper positioning and stabilization of the K^+-sensitive microelectrode in the lumbar slice.

Data acquisition was performed in current-clamp mode using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices), sampled at 10 kHz, filtered at 4 kHz, and digitized with a Digidata 1550B (Molecular Devices). The peak amplitude, area under the curve (AUC) of $[K^+]_o$ transients, the rise slope from glutamate puff onset to peak amplitude, and decay time from peak amplitude to baseline recovery were measured.

Pharmacological compounds and dyes

All solutions were oxygenated with 95% O_2/5% CO_2. Barium chloride dihydrate (Ba^{2+}, 100µM; 217565), Pluronic® F-127 (0.02%; P2443), DMSO (0.1%; D4540), L-glutamic acid (L-glutamate, 1 mM; G1251) and Sodium Propionate (5mM; P1880) were obtained from Merck Sigma-Aldrich. Tetrodotoxin (TTX, 0.5-1µM; 1078) from Tocris Bioscience. S0859 (50-100 µM, M5069) from Abmole Europe Branch (Forlab). 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetomxymethyl Ester (BCECF-AM, 5 µM) from Invitrogen. All drugs were dissolved in water and added to the standard aCSF except BCECF-AM incubated in Pluronic® F-127 (0.02%) and DMSO (0.2%).

Immunohistochemistry

Spinal cords of 14-16 days-old mice were.dissected out and fixed for 5-6 h in 4% paraformaldehyde (PFA), then rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and cryoprotected overnight in 20% sucrose at 4°C. Spinal cords were frozen in OCT medium (Tissue Tek) and 30 µm cryosections were collected from the L4-L5 segments. After having been washed in PBS 3×5 min, the slides were incubated for 1 h in a blocking solution (BSA 1%, Normal Donkey Serum 3% in PBS) with 0.2% triton X-100 and for 24 h at 4 °C in a humidified chamber with the following primary antibodies diluted in the blocking solution with triton x-100: rabbit anti-Kir4.1 (1/1000; APC-035, Alomone, Israel), mouse anti-NeuN (1/1000; MAB377, Merck Millipore, MA), rabbit anti-GFAP (1/1000; Z0334, Dako, Agilent, CA) and/or goat anti-C3d (1/40; AF2655, R&D Systems, MN). For STAT-3 staining, slices were pretreated with a drop of MetOH 100% (34860-1L-R; Merck Sigma-Aldrich, MA) for 10 minutes at -20°C. After 3 washes of 5 min in PBS, they were incubated for 1h in a blocking solution (Normal Donkey Serum 5% in PBS 0.1M) with 0.3% triton X-100. The primary antibody anti-STAT3 (1/300; 8768, Cell Signaling Technology, MA) was incubated with Cell signal blocking solution (8112, Cell Signaling Technology, MA) for 48 h at 4°C. Slides were then washed 3×5 min in PBS and incubated for 2 h with the appropriate secondary antibodies diluted in the blocking solution: Alexa Fluor® Plus 555- donkey anti-rabbit (1/400; A32794, Invitrogen, MA), Cy5- donkey anti-mouse (1/400; 715-175-151, Jackson ImmunoResearch, PA) and/or Alexa Fluor® Plus 555-donkey anti-goat (1/400; A32816, Invitrogen, MA). After 3 washes of 5 min in PBS, slides were incubated with Hoechst 33342 (2 µM in PBS; 62249, Thermo Fisher Scientific, MA) for 5 min and washed again 3x5 min before being mounted with a homemade gelatinous aqueous medium. Images were acquired using a confocal microscope (LSM700, Zeiss) equipped with either a 20x air objective, a 40x oil objective or a 63x oil objective and processed with the Zen software (Zeiss).

Protein analysis by capillary Western Blot

The lumbar parts of the spinal cords were dissected in aCSF at 4°C and conserved at -80°C until protein extraction. Tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer (250 mM sucrose, 3.9 mM Tris pH 7.5, 10 mM iodoacetamide) supplemented with protease inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 11836170001, Roche Diagnostics, Germany). Unsolubilized material was pelleted by centrifugation at 7,000 x g for 5 min at 4°C and

discarded. The supernatants were subjected to an additional centrifugation step at 19,000 x g for 70 min at 4°C. The resulting pellets corresponding to the membrane-enriched fraction were resuspended in ice-cold lysis buffer (PBS 1X, IGEPAL® CA-630 1%, SDS 0.1%) supplemented with protease inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 11836170001, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific, MA). Kir4.1 and NBCe1 expressions were then analyzed using the 12-230 kDa and the 66-440 kDa separation modules respectively (SM-W004 and SM-W008, ProteinSimple, Bio-Techne, MN) on an automated capillary western blotting system ('Jess', ProteinSimple, Bio-Techne, MN) according to the manufacturer's protocol with small modifications. Samples were not implemented with DTT and they were not submitted to heat denaturation in order to keep proteins in a more 'native' form. Total protein concentrations of 0.1 mg/mL and 0.5 mg/mL were used for Kir4.1 and NBCe1 respectively. Samples were probed with a rabbit polyclonal Kir4.1 antibody (1:60; APC-035, Alomone, Israel) or a rabbit polyclonal NBCe1 antibody (1:90; ANT-075, Alomone, Israel) and revealed with the appropriate detection module (DM-001, ProteinSimple, Bio-Techne, MN). Loaded samples were normalized to their own total protein content using the 'total protein detection module' (DM-TP01, ProteinSimple, Bio-Techne, MN).

Assessement of electromyography (EMG) recordings

Mice were tested at 10, 15, and 20 days post-SCI, when signs of spastic motor behaviors, such as excessive involuntary twitches/movements and exaggerated reflexes, were evident. For electrophysiological assessment of spasticity, a stainless steel needle electrode was transcutaneously inserted into the lateral gastrocnemius muscle (ankle extensor). Two reference electrodes were placed subcutaneously on the back and in contact with the patellar tendon. Because mice were spinalized, they did not feel any pain during this procedure. Following a 30-minute acclimation period to the recording environment, mice were immobilized with tape. Spontaneous motor responses were recorded for 15 minutes. Motor responses evoked by tail pinch (50.5 ± 5.6 g, 0.5 ± 0.2 s) were recorded until baseline activity returned. Each mouse experienced five consecutive sensory stimuli, each separated by a resting period of at least 30 seconds. The proximal ends of the recording wires were connected to a A-M Systems Amplifier (Model 1700, Everett, WA). EMG signals were amplified (1000x)

and bandpass filtered (100 Hz to 5 kHz), then sampled at 13.5 kHz (Digidata 1440A, Molecular Devices). The applied pressure (measured in grams) to the distal third of the tail was recorded by a miniature pressure sensor (#FS1901-000-0500-G, Farnell) placed between the thumb and the tail, and monitored in real-time.

Assessment of DeepLabCut video acquisition

Animals were tested at P10, P15, and P20, when signs of a spastic motor phenotype, such as excessive involuntary hindlimb twitches and exaggerated reflexes, were visible.

Assessment of mice hindlimb spontaneous activity: Animals were removed from their home cages, weighted, and individually subjected to a single 20-second video recording in a standardized homemade setup. Video acquisition was performed at 240 frames per second (FPS) to allow complete visualization of hindlimb spasms from a lateral view, at a distance of 10 cm from the mouse.

Assessment of mice hindlimb induced activity: For the behavioral assessment of induced activity, the same procedure was applied as previously described. Induced activity was initiated by gently pinching the tail (without causing discomfort or signs of physical pain) with the thumb. Hindlimb motor responses following tail pinching were recorded by a miniature pressure sensor placed between the thumb and the tail and monitored online. Each animal underwent three consecutive pinching stimulations, separated by 10 seconds, through a single video recording

Experimental design and statistical analysis

No statistical method was used to predetermine sample size. Group measurements are expressed as means ± S.E.M. The Mann-Whitney test was used for comparisons between two groups, while the Fisher's test was employed to compare percentages. For comparisons between two conditions, the Wilcoxon matched pairs test was utilized. One-way or two-way ANOVA test was applied for multiple comparisons. Normality of the data sets was evaluated for all statistical analyses, and the significance level was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 9 software. Details of the analyses are provided in each figure legend.

Data analysis

Assessment of astrocyte reactivity

(i) ***Morphometric analyses.*** Confocal images at 63X magnification, immunostained with GFAP antibody in Aldh1L1-eGFP mice, were serially stacked and maximally projected. The maximal projection image of the GFAP signal in the ventral horn of the spinal cord was used for analysis. The maximal projection image of the GFAP signal in the ventral horn of the spinal cord was used for analysis. The Sholl analysis plugin in ImageJ automatically drew serial concentric circles at 5 µm intervals from the center of the nucleus (Hoechst signal) to the end of the longest process in each individual astrocyte. This plugin provided key morphometric parameters such as the number of intercepts of GFAP processes with each circle, the ramification index, and the ending radius (longest process). Four different fields from the left and right parts of the ventral spinal cord were analyzed in at least five different slices from the same mouse, evaluating all astrocytes within the field. For illustrative purposes, a few representative astrocytes were fully reconstructed in 3D using Chimera software.

(ii) **Evaluation of C3d positive astrocytes:** Immunofluorescence staining was analyzed from stacked confocal images (15 steps; Z-step, 1 µm, maximum intensity stack) acquired with a 40× objective on five slices per mouse, with four different fields on each slice. All Aldh1L1-eGFP positive astrocytes in the field, including those co-expressing C3d markers (Aldh1L1+ C3d+), were evaluated.

(iii) **Quantification of astrocytic STAT3 nuclear fraction.** To evaluate the nuclear fraction of the STAT3 signal, we measured the STAT3 signal intensity within the Hoechst (nuclei) signal. Immunofluorescence staining was analyzed from stacked confocal images (15 steps; Z-step, 1 µm, maximum intensity stack) acquired with a 40× objective on five slices per mouse, with four different fields on each slice. All Aldh1L1-eGFP positive astrocytes in the field with a clear Hoechst signal were included. Nuclear masks were manually segmented using the Hoechst signal, applied to the STAT3 channel, and the mean fluorescence intensity was measured (see [30]).

Analysis of *ex vivo* electrophysiological (Patch-clamp) recordings

Electrophysiological data were analyzed offline using Clampfit 10.7 software (Molecular Devices). To ensure optimum quality of intracellular recordings, several criteria were established: only cells exhibiting a stable resting membrane potential (RMP), access resistance with less than 20% variation, and an action potential amplitude larger than 40 mV under standard aCSF were considered.

Passive Membrane Properties: Passive membrane properties of astrocytes and motoneurons (MNs) were measured by determining the largest voltage deflections induced by small current pulses from the holding potential, avoiding activation of voltage-sensitive currents. Input resistance was determined by the slope of linear fits to voltage responses evoked by small positive and negative current injections.

Recording Kir4.1-Currents in GFP (+) Astrocytes. Voltages were repeatedly stepped for 2.5s from -140 to 0 mV in 10 mV increments, with astrocytes initially clamped at their RMP. Approximately 5 minutes after the start of the recording, barium chloride (Ba^{2+}, 100 µM) was bath-applied to the slice. The current amplitude was measured as the difference between the baseline level before the initial voltage step and the mean amplitude over a 10 ms window starting 10 ms after the onset of the hyperpolarizing voltage step. The Ba^{2+}-sensitive current was obtained by subtracting the current after Ba^{2+} application from the current before application.

MNs excitability. For MNs, firing properties were measured from depolarizing current pulses of varying amplitudes. The rheobase was defined as the minimum step current intensity required to induce an action potential from the membrane potential held at RMP. The instantaneous discharge frequency was determined as the inverse of the interspike interval. The firing gain refers to the ratio between the measured instantaneous firing frequency (Hz) and the injected current (pA).

Analysis of two-photon Ca^{2+} and BCECF pH_i changes imaging

The fluorescent time series depicting Ca^{2+} and BCECF changes in ex vivo neurons and/or astrocytes were analyzed using MESc data acquisition software (Femtonics Ltd, Budapest, Hungary) and the MES curve analyzer tool. Regions of interest (ROIs) for neurons and

astrocytic soma were selected manually, while ROIs for astrocytic processes and microdomains were selected automatically using a custom script in ImageJ (Fiji). A signal was declared as a Ca^{2+} transient if it exceeded the baseline by more than twice the baseline noise (standard deviation, SD). We defined active astrocytes as astrocytes displaying at least one Ca^{2+} transient during the recording session.

In Ca^{2+} imaging experiments, ROIs included : (i) active soma for neurons (jRGECO1a), (ii) active soma, processes and microdomains for astrocytes (GCaMP6f). In BCECF experiments, ROIs corresopnded to astrocytic soma double-labeled with Td-tomato (AAV2/5-gfaABC1D-TdTomato).

For the two-photon Ca^{2+} imaging analysis, raw fluorescence traces were extracted to Excel and analyzed using a custom Matlab script. These traces were converted to show fluorescence changes according to Equation (1):

$$\Delta F/F=(F_1-F_0)/F_0 \quad (1)$$

where *F* is the fluorescence at any given time, and F_0 is the mean fluorescence value for the 5 to 10 s range, preceding the bath perfusion of L-Glutamate (1 mM). The signal-to-noise ratio (SNR) was calculated as:

$$SNR = (\Delta F/F)_{peak}/ \sigma F$$

where σF is the SD of the baseline period. Events were considered as Ca^{2+} response if they exceeded twice the SD of the baseline period. The peak amplitude, duration and frequency of both spontaneous and glutamate-evoked Ca^{2+} transients were analysed by using a Matlab script.

For the two-photon pH_i imaging analysis, raw fluorescence traces were extracted to Excel. The proportion of Tdtomato (+) astrocytes showing increased or decreased fluorescence (ΔF/F) and the peak amplitude of acidic pHi reponses to L-glutamate were analyzed from both control and SCI mice.

Analysis of *in vivo* electromyography (EMG) recordings

Custom-built amplifiers enabled simultaneous online rectification and integration (100ms time constant) of the raw AC-mode signals. Data analysis was performed offline with the automatic event detection plugin in Clampfit 11 software. Spontaneous muscle contractions were identified when the signal envelope exceeded a predetermined threshold, and the contraction was considered to end when the signal fell below this threshold. This threshold

was adjusted for each signal, typically set at 1.3 times the background noise level. For an event to be classified as a valid muscle spasm, it needed to remain above the threshold for at least 250 ms. We quantified both the average and cumulative distribution of the duration and frequency of these muscle events over a 15 min intervals. For responses triggered by tail stimulation, spasm duration was measured from the stimulus artefact until the recovery of a stable baseline. The experimenter was blinded during both the procedure and the data analysis of the electrophysiological experiments.

Analysis of mice spastic motor behaviors with DeepLabCut

Analysis of kinematics hindlimbs spontaneous activity. For hindlimb spams analysis, videos captured during experiments were analyzed using the markerless pose estimation software DeepLabCut 2.2 (DLC)[39] to extract tracks based on digital markers placed on the mice (Figure 7). For tracking DeepLabCut was installed on a PC equipped with a NVIDIA Ge-Force RTX 3060 12Go graphics card. DeepLabCut was used to identify four reference points among the mouse body (hip, knee, ankle and foot) on a side view (Figure 7) for kinematic analysis. The ResNet-50 based neural network (imgaug augmentation, 500,000 iterations) was used to identify points of interest on the mice. The training was performed on a set of 800 frames randomly selected by DeepLabCut from 40 videos representatives of experimentation conditions (same background, luminosity, distance from the mouse and the camera).
Note that two separate training has been performed between the first post-natal and second post-natal week face to the very fast morpho-physical changes occurring in mice at this period. Network was trained until it reaches a stable error rate plateau (> 400,000 iterations, 0.0005 error per frame). Next network was evaluated (test error = 2.89 pixels 0,19 mm), and videos analysis was consecutively performed. Raw data provide by DeepLabCut was extracted and proceeded to collect key parameters such as the number of events, acceleration of the spasms, maximum angle of the ankle and the mean ankle angle using custom scripts in Python (see below).

(i) *Acceleration*. Sudden increase in the speed of the hindlimb was quantify by estimating the instantaneous acceleration derived from the instantaneous speed estimates:

$$at = \Delta vt / \Delta t (\text{cms}^{-2})$$

(ii) *Number of events.* Hindlimbs motion event was considered as ankle angle variation of more than 10° degree from the initial position through the entire video recording

Analysis of hindlimb evoked activity.

(i) *Measure of the ankle angle variation following stimulation.* Angle of the ankle was measured using the angle tool of Fiji (ImageJ) before stimulation and immediately following the stimulation. Each measure is performed for the 3 consecutives stimulation for each animal.

(ii) *Measure of spasms duration.* Spasms duration was measured from the end of the stimulation until the recovery of a stable hindlimb motion activity (e.g no hindlimb twitches) using the free and open source cross-platform multimedia player and framework, VLC.

(iii) *Measure of tail pinch force*. Stimulation intensity was recorded by a miniature pressure sensor (#FS1901-000-0500-G, Farnell) placed between the thumb and the tail, and monitored in real-time. The applied pressure measurements were compared between the groups (SCI + control-GFP *vs* SCI + Kir4.1-GFP) and were similar.

References

1. Andresen, S.R., Biering-Sørensen, F., Hagen, E.M., Nielsen, J.F., Bach, F.W., and Finnerup, N.B. (2016). Pain, spasticity and quality of life in individuals with traumatic spinal cord injury in Denmark. Spinal Cord *54*, 973–979. https://doi.org/10.1038/sc.2016.46.

2. Ehrmann, C., Mahmoudi, S., Prodinger, B., Kiekens, C., and Ertzgaard, P. (2020). Impact of spasticity on functioning in spinal cord injury: an application of graphical modelling. J Rehabil Med, 0. https://doi.org/10.2340/16501977-2657.

3. Tian, T., Zhang, S., and Yang, M. (2023). Recent progress and challenges in the treatment of spinal cord injury. Protein & Cell *14*, 635–652. https://doi.org/10.1093/procel/pwad003.

4. Marcantoni, M., Fuchs, A., Löw, P., Bartsch, D., Kiehn, O., and Bellardita, C. (2020). Early delivery and prolonged treatment with nimodipine prevents the development of spasticity after spinal cord injury in mice. Sci. Transl. Med. *12*, eaay0167. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0167.

5. Bellardita, C., Caggiano, V., Leiras, R., Caldeira, V., Fuchs, A., Bouvier, J., Löw, P., and Kiehn, O. (2017). Spatiotemporal correlation of spinal network dynamics underlying spasms in chronic spinalized mice. eLife *6*. https://doi.org/10.7554/eLife.23011.

6. Brommer, B., He, M., Zhang, Z., Yang, Z., Page, J.C., Su, J., Zhang, Y., ZhuJ., Gouy, E., Tang, J., et al. (2021). Improving hindlimb locomotor function by Non-invasive AAV-mediated manipulations of propriospinal neurons in mice with complete spinal cord injury. Nat Commun *12*, 781. https://doi.org/10.1038/s41467-021-20980-4.

7. Li, Y., and Bennett, D.J. (2003). Persistent Sodium and Calcium Currents Cause Plateau Potentials in Motoneurons of Chronic Spinal Rats. Journal of Neurophysiology *90*, 857–869. https://doi.org/10.1152/jn.00236.2003.

8. Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., et al. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nature Medicine *16*, 302–307. https://doi.org/10.1038/nm.2107.

9. Murray, K.C., Nakae, A., Stephens, M.J., Rank, M., D'Amico, J., Harvey, P.J., Li, X., Harris, R.L.W., Ballou, E.W., Anelli, R., et al. (2010). Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT2C receptors. Nature Medicine *16*, 694–700. https://doi.org/10.1038/nm.2160.

10. Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., and Vinay, L. (2013). Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 348–353. https://doi.org/10.1073/pnas.1213680110.

11. Brocard, C., Plantier, V., Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bouhadfane, M., Viallat-Lieutaud, A., Vinay, L., and Brocard, F. (2016). Cleavage of Na+ channels by calpain increases persistent Na+ current and promotes spasticity after spinal cord injury. Nature Medicine *22*, 404–411. https://doi.org/10.1038/nm.4061.

12. Plantier, V., Sanchez-Brualla, I., Dingu, N., Brocard, C., Liabeuf, S., Gackière, F., and Brocard, F. (2019). Calpain fosters the hyperexcitability of motoneurons after spinal cord injury and leads to spasticity. eLife *8*, e51404. https://doi.org/10.7554/eLife.51404.

13. Mahrous, A., Birch, D., Heckman, C.J., and Tysseling, V. (2024). Muscle Spasms after Spinal Cord Injury Stem from Changes in Motoneuron Excitability and Synaptic Inhibition, Not Synaptic Excitation. J. Neurosci. *44*, e1695232023. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1695-23.2023.

14. Ditunno, J., Little, J., Tessler, A., and Burns, A. Spinal shock revisited: a four-phase model. Spinal Cord.

15. Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. Physiol Rev *98*, 151.

16. Castro, R.W., Lopes, M.C., Settlage, R.E., and Valdez, G. (2023). Aging alters mechanisms underlying voluntary movements in spinal motor neurons of mice, primates, and humans. JCI Insight *8*, e168448. https://doi.org/10.1172/jci.insight.168448.

17. Duggal, N., and Lach, B. (2002). Selective Vulnerability of the Lumbosacral Spinal Cord After Cardiac Arrest and Hypotension. Stroke *33*, 116–121. https://doi.org/10.1161/hs0102.101923.

18. Bos, R., Harris-Warrick, R.M., Brocard, C., Demianenko, L.E., Manuel, M., Zytnicki, D., Korogod, S.M., and Brocard, F. (2018). Kv1.2 Channels Promote Nonlinear Spiking Motoneurons for Powering Up Locomotion. Cell Reports *22*, 3315–3327. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.093.

19. Carlsen, E.M.M., Falk, S., Skupio, U., Robin, L., Pagano Zottola, A.C., Marsicano, G., and Perrier, J.-F. (2021). Spinal astroglial cannabinoid receptors control pathological tremor. Nature Neuroscience *24*, 658–666. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00818-4.

20. Leroy, F., Lamotte d'Incamps, B., Imhoff-Manuel, R.D., and Zytnicki, D. (2014). Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. eLife *3*. https://doi.org/10.7554/eLife.04046.

21. Sibille, J., Dao Duc, K., Holcman, D., and Rouach, N. (2015). The Neuroglial Potassium Cycle during Neurotransmission: Role of Kir4.1 Channels. PLOS Computational Biology *11*, e1004137. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004137.

22. Kelley, K.W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G.E., Tolman, M., Miller, J.G., Tsai, H.-H., Chang, S.M., Molofsky, A.V., Yang, Y., et al. (2018). Kir4.1-Dependent Astrocyte-Fast Motor

Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. Neuron *98*, 306-319.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.010.

23. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J.P., Petzold, G.C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., et al. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci *24*, 312–325. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4.

24. Sofroniew, M.V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. Trends in Immunology *41*, 758–770. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004.

25. Nwaobi, S.E., Cuddapah, V.A., Patterson, K.C., Randolph, A.C., and Olsen, M.L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. Acta Neuropathol *132*, 1–21. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1.

26. Olsen, M.L., Campbell, S.C., McFerrin, M.B., Floyd, C.L., and Sontheimer, H. (2010). Spinal cord injury causes a wide-spread, persistent loss of Kir4.1 and glutamate transporter 1: benefit of 17 -oestradiol treatment. Brain *133*, 1013–1025. https://doi.org/10.1093/brain/awq049.

27. Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. J. Neurosci. *28*, 264–278. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.

28. Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature *541*, 481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029.

29. Ben Haim, L., Ceyzériat, K., Carrillo-de Sauvage, M.A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., et al. (2015). The JAK/STAT3 Pathway Is a Common Inducer of Astrocyte Reactivity in Alzheimer's and Huntington's Diseases. J. Neurosci. *35*, 2817–2829. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015.

30. Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M.-A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., et al. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. acta neuropathol commun *6*, 104. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1.

31. Verhoog, Q.P., Holtman, L., Aronica, E., and Van Vliet, E.A. (2020). Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis. Front. Neurol. *11*, 591690. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.591690.

32. Sobolczyk, M., and Boczek, T. (2022). Astrocytic Calcium and cAMP in Neurodegenerative Diseases. Front. Cell. Neurosci. *16*, 889939. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.889939.

33. Theparambil, S.M., Hosford, P.S., Ruminot, I., Kopach, O., Reynolds, J.R., Sandoval, P.Y., Rusakov, D.A., Barros, L.F., and Gourine, A.V. (2020). Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. Nat Commun *11*, 5073. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18756-3.

34. Gross, E., Hawkins, K., Pushkin, A., Sassani, P., Dukkipati, R., Abuladze, N., Hopfer, U., and Kurtz, I. Phosphorylation of Ser982 in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO3_ : Na+ stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells. J. Physiol.

35. Thornell, I.M., and Bevensee, M.O. (2015). Regulators of Slc4 bicarbonate transporter activity. Front. Physiol. *6*. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00166.

36. Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M.C., Salvatore, L., and Tucker, S.J. (2001). Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. The Journal of Physiology *532*, 359–367. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0359f.x.

37. Xu, H., Cui, N., Yang, Z., Qu, Z., and Jiang, C. (2000). Modulation of Kir4.1 and Kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. The Journal of Physiology *524*, 725–735. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00725.x.

38. Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J.W., and Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K + spatial buffering. Neuroscience & Biobehavioral Reviews *77*, 87–97. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002.

39. Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V.N., Mathis, M.W., and Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. Nat Neurosci *21*, 1281–1289. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y.

40. Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F., and Koizumi, S. (2019). Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. IJMS *20*, 996. https://doi.org/10.3390/ijms20040996.

41. Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. J. Neurosci. *24*, 2143–2155. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.

42. Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a Critical Regulator of Astrogliosis and Scar Formation after Spinal Cord Injury. Journal of Neuroscience *28*, 7231–7243. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008.

43. Guttenplan, K.A., Weigel, M.K., Adler, D.I., Couthouis, J., Liddelow, S.A., Gitler, A.D., and Barres, B.A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease

progression in an ALS mouse model. Nat Commun *11*, 3753. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17514-9.

44. Schmitt, L.-I., David, C., Steffen, R., Hezel, S., Roos, A., Schara-Schmidt, U., Kleinschnitz, C., Leo, M., and Hagenacker, T. (2023). Spinal astrocyte dysfunction drives motor neuron loss in late-onset spinal muscular atrophy. Acta Neuropathol *145*, 611–635. https://doi.org/10.1007/s00401-023-02554-4.

45. Wang, X., Li, X., Zuo, X., Liang, Z., Ding, T., Li, K., Ma, Y., Li, P., Zhu, Z., Ju, C., et al. (2021). Photobiomodulation inhibits the activation of neurotoxic microglia and astrocytes by inhibiting Lcn2/JAK2-STAT3 crosstalk after spinal cord injury in male rats. J Neuroinflammation *18*, 256. https://doi.org/10.1186/s12974-021-02312-x.

46. Zhou, Z.-L., Xie, H., Tian, X.-B., Xu, H.-L., Li, W., Yao, S., and Zhang, H. (2023). Microglial depletion impairs glial scar formation and aggravates inflammation partly by inhibiting STAT3 phosphorylation in astrocytes after spinal cord injury. Neural Regen Res *18*, 1325. https://doi.org/10.4103/1673-5374.357912.

47. Shiratori-Hayashi, M., Yamaguchi, C., Eguchi, K., Shiraishi, Y., Kohno, K., Mikoshiba, K., Inoue, K., Nishida, M., and Tsuda, M. (2021). Astrocytic STAT3 activation and chronic itch require IP3R1/TRPC-dependent Ca2+ signals in mice. Journal of Allergy and Clinical Immunology *147*, 1341–1353. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.039.

48. Kuchibhotla, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2009). Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. Science *323*, 1211–1215. https://doi.org/10.1126/science.1169096.

49. Kim, S.K., Hayashi, H., Ishikawa, T., Shibata, K., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., Inada, H., Roh, S.E., Kim, S.J., Lee, G., et al. (2016). Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. Journal of Clinical Investigation *126*, 1983–1997. https://doi.org/10.1172/JCI82859.

50. Sano, F., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., Tsuzukiyama, H., Saito, K., Mikoshiba, K., Horiuchi, H., Cheung, D.L., Nabekura, J., Sugita, K., et al. (2021). Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus. JCI Insight *6*, e135391. https://doi.org/10.1172/jci.insight.135391.

51. Jiang, R., Diaz-Castro, B., Looger, L.L., and Khakh, B.S. (2016). Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. Journal of Neuroscience *36*, 3453–3470. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3693-15.2016.

52. Plata, A., Lebedeva, A., Denisov, P., Nosova, O., Postnikova, T.Y., Pimashkin, A., Brazhe, A., Zaitsev, A.V., Rusakov, D.A., and Semyanov, A. (2018). Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca2+ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. Front. Mol. Neurosci. *11*, 215. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00215.

53. De Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D.G., Lind, B.L., Carriero, G., Latagliata, E.C., Bindocci, E., Di Castro, M.A., Savtchouk, I., Vitali, I., et al. (2023). Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. Nature *622*, 120–129. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06502-w.

54. Weiss, S., Melom, J.E., Ormerod, K.G., Zhang, Y.V., and Littleton, J.T. (2019). Glial Ca2+signaling links endocytosis to K+ buffering around neuronal somas to regulate excitability. eLife *8*, e44186. https://doi.org/10.7554/eLife.44186.

55. Barbay, T., Pecchi, E., Ducrocq, M., Rouach, N., Brocard, F., and Bos, R. (2023). Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network. Glia *71*, 1259–1277. https://doi.org/10.1002/glia.24337.

56. Heuser, K., Nome, C.G., Pettersen, K.H., Åbjørsbråten, K.S., Jensen, V., Tang, W., Sprengel, R., Taubøll, E., Nagelhus, E.A., and Enger, R. (2018). Ca2+ Signals in Astrocytes Facilitate Spread of Epileptiform Activity. Cerebral Cortex *28*, 4036–4048. https://doi.org/10.1093/cercor/bhy196.

57. Theparambil, S.M., Begum, G., and Rose, C.R. (2024). pH regulating mechanisms of astrocytes: A critical component in physiology and disease of the brain. Cell Calcium *120*, 102882. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102882.

58. Ruminot, I., Gutierrez, R., Pena-Munzenmayer, G., Anazco, C., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Niemeyer, M.I., Shull, G.E., and Barros, L.F. (2011). NBCe1 Mediates the Acute Stimulation of Astrocytic Glycolysis by Extracellular K+. Journal of Neuroscience *31*, 14264–14271. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2310-11.2011.

59. Giannaki, M., Schrödl-Häußel, M., Khakipoor, S., Kirsch, M., and Roussa, E. (2021). STAT3-dependent regulation of the electrogenic $Na^{+/}$ HCO_3^- cotransporter 1 (NBCe1) functional expression in cortical astrocytes. J Cell Physiol *236*, 2036–2050. https://doi.org/10.1002/jcp.29990.

60. Li, Y., Lucas-Osma, A.M., Black, S., Bandet, M.V., Stephens, M.J., Vavrek, R., Sanelli, L., Fenrich, K.K., Di Narzo, A.F., Dracheva, S., et al. (2017). Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury. Nat Med *23*, 733–741. https://doi.org/10.1038/nm.4331.

61. Brune, T., and Deitmer, J.W. (1995). Intracellular acidification and Ca^{2+} transients in cultured rat cerebellar astrocytes evoked by glutamate agonists and noradrenaline. Glia *14*, 153–161. https://doi.org/10.1002/glia.440140210.

62. Bevensee, M.O., and Boron, W.F. (2008). Effects of acute hypoxia on intracellular-pH regulation in astrocytes cultured from rat hippocampus. Brain Research *1193*, 143–152. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.002.

63. Turovsky, E., Theparambil, S.M., Kasymov, V., Deitmer, J.W., del Arroyo, A.G., Ackland, G.L., Corneveaux, J.J., Allen, A.N., Huentelman, M.J., Kasparov, S., et al. (2016). Mechanisms

of CO_2 /H^+ Sensitivity of Astrocytes. J. Neurosci. *36*, 10750–10758. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1281-16.2016.

64. David, Y., Cacheaux, L.P., Ivens, S., Lapilover, E., Heinemann, U., Kaufer, D., and Friedman, A. (2009). Astrocytic Dysfunction in Epileptogenesis: Consequence of Altered Potassium and Glutamate Homeostasis? J. Neurosci. *29*, 10588–10599. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-09.2009.

65. Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Haustein, M.D., Anderson, M.A., Mody, I., Olsen, M.L., Sofroniew, M.V., et al. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. Nat Neurosci *17*, 694–703. https://doi.org/10.1038/nn.3691.

66. Bataveljic, D., Pivonkova, H., De Concini, V., Hébert, B., Ezan, P., Briault, S., Bemelmans, A.-P., Pichon, J., Menuet, A., and Rouach, N. (2024). Astroglial Kir4.1 potassium channel deficit drives neuronal hyperexcitability and behavioral defects in Fragile X syndrome mouse model. Nat Commun *15*, 3583. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47681-y.

67. Somjen, G.G., and Müller, M. (2000). Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. Brain Research *885*, 102–110. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02948-6.

68. Ou, M., Chen, Y., Liu, J., Zhang, D., Yang, Y., Shen, J., Miao, C., Tang, S.-J., Liu, X., Mulkey, D.K., et al. (2023). Spinal astrocytic MeCP2 regulates Kir4.1 for the maintenance of chronic hyperalgesia in neuropathic pain. Progress in Neurobiology *224*, 102436. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2023.102436.

69. Endo, F., Kasai, A., Soto, J.S., Yu, X., Qu, Z., Hashimoto, H., Gradinaru, V., Kawaguchi, R., and Khakh, B.S. (2022). Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. Science *378*, eadc9020. https://doi.org/10.1126/science.adc9020.

70. Benson, C.A., Olson, K.-L., Patwa, S., Kauer, S.D., King, J.F., Waxman, S.G., and Tan, A.M. (2023). Conditional Astrocyte Rac1 Knockout Attenuates Hyperreflexia After Spinal Cord Injury. J. Neurosci., JN-RM-1670-22. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1670-22.2023.

71. Bos, R., Drouillas, B., Bouhadfane, M., Pecchi, E., Trouplin, V., Korogod, S.M., and Brocard, F. (2021). Trpm5 channels encode bistability of spinal motoneurons and ensure motor control of hindlimbs in mice. Nat Commun *12*, 6815. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27113-x.

72. Harris-Warrick, R.M., Pecchi, E., Drouillas, B., Brocard, F., and Bos, R. (2024). Effect of size on expression of bistability in mouse spinal motoneurons. Journal of Neurophysiology *131*, 577–588. https://doi.org/10.1152/jn.00320.2023.

73. Larsen, B.R., Stoica, A., and MacAulay, N. (2016). Managing Brain Extracellular K+ during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na+/K+-ATPase Subunit Isoforms. Frontiers in Physiology *7*. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00141.

74. Wieters, F., Weiss Lucas, C., Gruhn, M., Büschges, A., Fink, G.R., and Aswendt, M. (2021). Introduction to spasticity and related mouse models. Experimental Neurology *335*, 113491. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113491.

75. Daci, R., and Flotte, T.R. (2024). Delivery of Adeno-Associated Virus Vectors to the Central Nervous System for Correction of Single Gene Disorders. IJMS *25*, 1050. https://doi.org/10.3390/ijms25021050.

76. Cui, Y., Yang, Y., Ni, Z., Dong, Y., Cai, G., Foncelle, A., Ma, S., Sang, K., Tang, S., Li, Y., et al. (2018). Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. Nature *554*, 323–327. https://doi.org/10.1038/nature25752.

77. Odackal, J., Colbourn, R., Odackal, N.J., Tao, L., Nicholson, C., and Hrabetova, S. (2017). Real-time Iontophoresis with Tetramethylammonium to Quantify Volume Fraction and Tortuosity of Brain Extracellular Space. JoVE, 55755. https://doi.org/10.3791/55755.

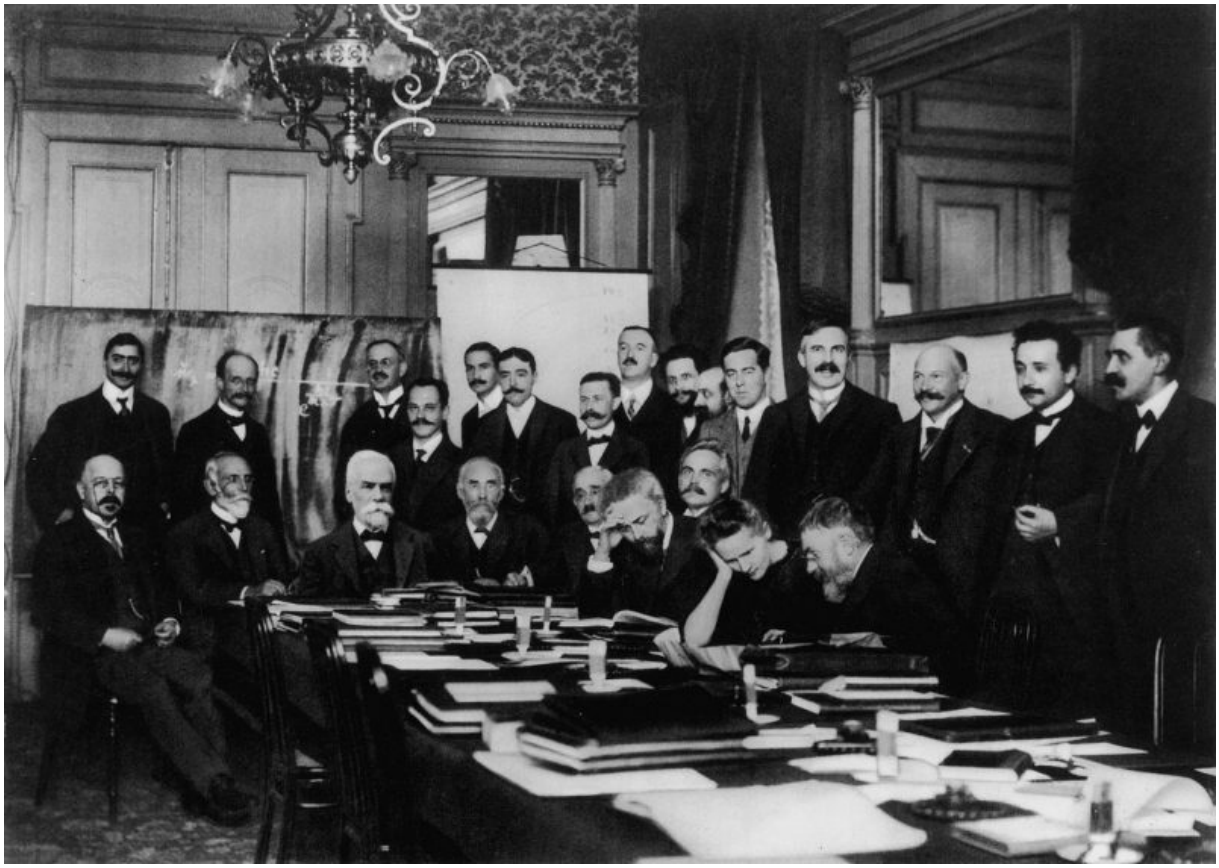
Acknowledgments

We thank A. Duhoux for animal care, I. Vanzetta, and A. Lombardini for their technical advices in imaging sessions. J. Verneuil for kindly providing his original scripts. We also gratefully acknowledge E. Gascon, F. Jaouen, C. Lepolard and A. Borges-Correia from Neuro-Vir platform of the Neuro-Bio-Tools facility (Institut de Neurosciences de la Timone, UMR 7289, Marseille, France) for their advices, support and assistance in the design and production of vectors used in this work. We also thank L. Ben Haïm for kindly providing the protocol for STAT3 staining/analysis, and G. Rougon for her critical insights on the manuscript.

DISCUSSION

« Je préfère de loin la virulente critique d'un seul Homme d'esprit
à l'approbation inconsidérée de la masse »

Johannes Kepler
Astronome, Scientifique (1571-1630)



Photographie de la 5ème édition du congrès de Solvay, prise en 1927.
Cette photographie illustre le rassemblement de pionniers scientifiques en physique et chimie. Ces conférences, établies tous les 3 ans, ont permis aux scientifiques de l'époque de discuter sur des thématiques spécifiques comme « les électrons et les photons » en 1927 ou encore la structure et évolution de l'univers en 1958. Ces discussions permirent des avancées importantes notamment en mécanique quantique. De gauche à droite (haut en bas), Robert Goldschmidt, Max Planck, Heinrich Rubens, Arnold Sommerfeld, Frederick Lindemann, Maurice de Broglie, Martin Knudsen, Friedrich Hasenöhrl, Edouard Herzen, James Hopwood, Ernest Rutherford, Heike Kamerlingh Onnes, Albert Einstein, Paul Langevin, Walther Nernst, Marcel Brillouin, Ernest Solvay, Hendrik Antoon Lorentz, Emil Warburg, Jean-Baptiste Perrin, Wilhelm Wien, Marie Curie, Henri Poincaré.

I. Les astrocytes du GPC locomoteur, mécanistique et hétérogénéité : un prérequis essentiel ?

A. Les astrocytes dans le rythmogénèse : un acteur essentiel ?

Une question essentielle se pose : les astrocytes sont-ils nécessaires et indispensables pour l'émergence et le maintien des bouffées rythmiques, afin d'établir une locomotion fonctionnelle ? Mon étude révèle un fait intéressant : une augmentation de l'activité Ca^{2+} dans certains astrocytes précède l'apparition de la rythmogénèse neuronale, une observation corroborée dans d'autres recherches (Broadhead et Miles, 2020 ; Barbay et al., 2023). Cela suggère fortement un rôle actif des astrocytes dans l'émergence des bouffées rythmiques neuronales.

Dans cette perspective, des travaux *ex vivo* suggèrent que les astrocytes sont effectivement un prérequis essentiel pour l'émergence des propriétés rythmiques neuronales. Au niveau du GPC masticateur, la perfusion de BAPTA, un chélateur du Ca^{2+}, dans le syncytium astrocytaire local, abolit toute activité calcique astrocytaire (Morquette et al., 2015). Dans ce contexte, il devient impossible de générer des activités rythmiques (Morquette et al., 2015). L'activité Ca^{2+} des astrocytes semble donc être un prérequis crucial pour l'émergence des propriétés oscillatoires neuronales. De même, l'application d'un bloqueur des jonctions communicantes astrocytaires empêche également l'induction d'oscillations neuronales (Condamine et al., 2017), soulignant encore une fois le rôle indispensable des astrocytes.

La première étude de ma thèse, offre une vision moins drastique. En utilisant un *short harpin RNA* pour diminuer l'expression des canaux Kir4.1, on a pu empêcher l'émergence d'oscillations neuronales dans 76% des interneurones enregistrés, contre 20% dans le groupe témoin (*short harpin RNA* control) (Barbay et al., 2023). Ce résultat indique que les astrocytes jouent également un rôle dans l'initiation des bouffées rythmiques, mais de manière moins prépondérante. Pour preuve, l'étude du comportement locomoteur *in vivo* chez des animaux avec une expression réduite des canaux Kir4.1 montre une altération du *patron* locomoteur, affectant les performances locomotrices lors de tâches plus exigeantes, sans toutefois abolir complètement la locomotion. Cela peut s'expliquer par l'efficacité partielle de la diminution des canaux Kir4.1. En effet, malgré une réduction de 40% de l'expression des canaux Kir4.1, 24% des interneurones enregistrés parviennent encore à générer des oscillations, ce qui pourrait expliquer la persitance du comportement locomoteur. En parallèle, l'application de

Ba^{2+}, un bloqueur des canaux Kir4.1, après l'induction de bouffés rythmiques chez des interneurones abolit progressivement le patron rythmique au profit d'une activité tonique chez 100% des interneurones enregistrés.

Pour conclure, des travaux sur la locomotion fictive induite par stimulation pharmacologique sur moelle épinière isolée suggèrent également un rôle plus modéré des astrocytes. Cette étude a utilisé une approche par pharmacogénétique de type DREADs pour augmenter ou diminuer l'activité calcique des astrocytes. Quel que soit l'approche utilisée, que l'activité Ca^{2+} astrocytaire soit augmenté ou réduite, le rythme locomoteur est perturbé sans être abolit (Broahead et Miles, 2020).

En conclusion, il apparait que selon l'espèce, le mécanisme astrocytaire étudié, l'approche utilisée, la région cérébrale et l'échelle étudiée, il existe des divergences quant au rôle des astrocytes en tant que prérequis dans l'émergence de la rythmogénèse neuronale. Cependant, un élément est certain : les astrocytes jouent un rôle fondamental dans l'intégrité de la rythmogénèse neuronale.

B. Les astrocytes dans le puzzle de la rythmogénèse : comment concilier l'ensemble des mécanismes ?

Ma première étude souligne l'importance de la régulation de l'homéostasie K^+ par les canaux Kir4.1 astrocytaires, dans les bouffées rythmiques, essentielle au comportement locomoteur. Même si le nombre de travaux étudiant les astrocytes dans la rythmogénèse sont peu nombreux, il convient ici de concilier les résultats de ma première étude avec les précédentes, afin de raffiner les connaissances sur la circuiterie de la rythmogénèse locomotrice.

Premièrement, une étude par Morquette et ses collaborateur.e.s, démontre l'importance du relargage dépendant du Ca^{2+} du S100β par les astrocytes dans l'émergence des bouffées rythmiques neuronales au niveau du GPC masticateur (Morquette et al., 2015). Deuxièmement, une autre étude révèle l'importance du couplage jonctionnel astrocytaire dans l'émergence des bouffées rythmiques neuronales au niveau de la même structure (Condamine et al., 2017). En outre, une troisième étude met en évidence une communication bi-directionnelle entre neurone et astrocyte par le biais des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR5) et l'adénosine diphosphate (ADP), essentielle à la modulation de

la locomotion (Broadhead et Miles, 2020). Enfin, ma première étude montre également que les canaux Kir4.1 astrocytaires jouent un rôle dans de la régulation de l'homéostasie K^+, influençant ainsi le comportement locomoteur.

Dans chacune de ces études, plusieurs approches ont démontré que les astrocytes répondent aux divers stimuli induisant des activités rythmiques. Ce point commun nous permet d'affirmer que les astrocytes situés dans diverses régions du GPC (locomoteur et masticateur) sont fonctionnellement capables de détecter la mise en place de ces activités rythmiques. Bien que les récepteurs impliqués dans cette détection restent encore à identifier, Broadhead et Miles suggèrent que les récepteurs mGluR5 sont à l'origine de ce processus, sans exclure d'autres composants (Broadhead et Miles, 2020), alors que Morquette et ses collaborateur.e.s mettent en évidence l'importance des récepteurs NMDA (Morquette et al., 2015).

Mon hypothèse, qui réunit l'ensemble des découvertes précédentes, est que l'initiation de la locomotion par les centres supraspinaux, par le biais de diverses afférences (glutamatergiques, serotoninergiques et dopaminergiques), induit des potentiels d'actions (PAs) au niveau des différents interneurones du GPC locomoteur. Ces premiers PAs vont conduire à une élévation de la K^+ extracellulaire (Brocard et al., 2013) qui va être permise et contrôlé par les canaux Kir4.1 au niveau des astrocytes (Barbay et al., 2023). Ces élévations de K^+ provoque des augmentations d'activité Ca^{2+} au sein des astrocytes ce qui pourrait, d'une part, induire la libération de S100β dans le milieu extracellulaire afin de diminuer localement le Ca^{2+} extracellulaire (Morquette et al., 2015), et d'autre part, propager ce mécanisme en augmentant l'efficacité du couplage jonctionnel astrocytaire (Condamine et al., 2017). La régulation du K^+, combinée à la diminution du Ca^{2+} extracellulaire par le S100β, contrôlée et diffusée par le biais du couplage jonctionnel, offriraient un environnement ionique adéquat pour l'émergence des oscillations neuronales, permettant ainsi une locomotion efficiente.

En conclusion, les neurones possèdent des propriétés intrinsèques pour générer des bouffées rythmiques, tandis que les astrocytes assurent la modulation ionique essentielle à l'émergence et au maintien de ces bouffées. Dans cette perspective, on peut également imaginer que les astrocytes jouent un rôle dans l'arrêt de la locomotion (Mu et al., 2019). Cependant il semble que le mécanisme décrit ci-dessus ne soit pas unique et qu'une hétérogénéité fonctionnelle des astrocytes complique notre compréhension.

C. L'hétérogénéité fonctionnelle des astrocytes dans la rythmogénèse

Dans ma première étude, l'imagerie Ca^{2+} simultanée des astrocytes et des neurones a révélé un phénomène inattendu. Lors de l'induction pharmacologique de bouffées rythmiques neuronales, les astrocytes ont réagi différemment donnant lieu à une classification en plusieurs sous-types. Certains astrocytes ont vu leur activité Ca^{2+} augmenter avant même l'apparition des bouffées rythmiques neuronales, alors que pour d'autres, cette activité augmentait durant les activités rythmiques. Cela suggère l'existence de deux sous-types fonctionnels d'astrocytes qui travaillent en tandem afin de générer et maintenir un pattern rythmique au niveau des neurones. Ces observations ont également été faites dans une autre étude d'imagerie Ca^{2+} astrocytaire sur hémi-moelle, où deux sous types astrocytaires ont été identifiés (Broahead et Miles, 2020), bien que cette observation n'ait pas été discutée en détail dans cette étude.

Selon mon hypothèse, les astrocytes dont l'activité est exacerbée avant l'induction des activités rythmiques joueraient un rôle d'initiateur via la gliotransmission, en libérant des molécules tels que le S100β, l'ATP et le glutamate. En revanche, les astrocytes dont l'activité se déclenche au cours des activités rythmiques seraient davantage impliqués dans le maintien de ces activités par une recapture active du K^+ environnant. Il ne s'agit pas de deux sous-populations strictes, mais plutôt d'un *continuum* où une proportion d'astrocytes possède la machinerie complète afin de réaliser les deux processus.

Une approche de transcriptomique spatiale combinée à l'analyse de transcrits sur cellules uniques permettrait d'associer les sous-types astrocytaires à leur profil transcriptomique, afin de détecter différents marqueurs spécifiques. Enfin, des approches de manipulation génétique de ces marqueurs permettraient de préciser le rôle spécifique des potentiels sous-types astrocytaires au niveau du GPC locomoteur.

D. Les astrocytes et les répertoires locomoteurs

A première vue, la locomotion peut sembler assez simple, mais en réalité, cette grande fonction physiologique complexe fait appel à un large éventail de répertoires (Hubbard et al., 2016 ; Sternberg et al., 2016 ; Wyart, 2017 ; Carbo-Tano et al., 2023). Au cours de cette étude, je me suis focalisé sur le rythme locomoteur, mais ce répertoire comprend également le

support de poids, la posture, les différents degrés de vitesse allant de la marche au sprint, qui constituent ensemble des éléments clés de la locomotion. Peut-on alors envisager différents rôles des astrocytes dans ces divers aspects de la locomotion ? Peu d'études existent sur ce sujet, laissant donc beaucoup de place à l'exploration.

Concernant le rythme locomoteur, Broadhead et Miles ont montré que les astrocytes pourraient moduler la fréquence du rythme et donc influencer la vitesse de la locomotion (Broadhead et Miles, 2020). Dans mon étude, nous avons démontré que la diminution de l'expression des canaux Kir4.1 entraînait une perturbation de la régularité des pas, empêchant les souris d'atteindre une vitesse élevée sans pour autant affecter leur support de poids (Barbay et al., 2023).

Une autre étude révèle qu'une suppression des canaux Kir4.1 au niveau astrocytaire affecte les performances au rotarod ainsi que le cycle de marche (Kelley et al., 2018). De plus, la puissance de préhension des pattes avant est fortement diminuée, ce qui pourrait indiquer un impact sur le support de poids.

Ces observations suggèrent que différents sous-types d'astrocytes, ayant des fonctions variées, sont présents et qu'à l'échelle individuelle, ils possèdent des mécanismes distincts permettant leur implication dans multiples aspects de la locomotion.

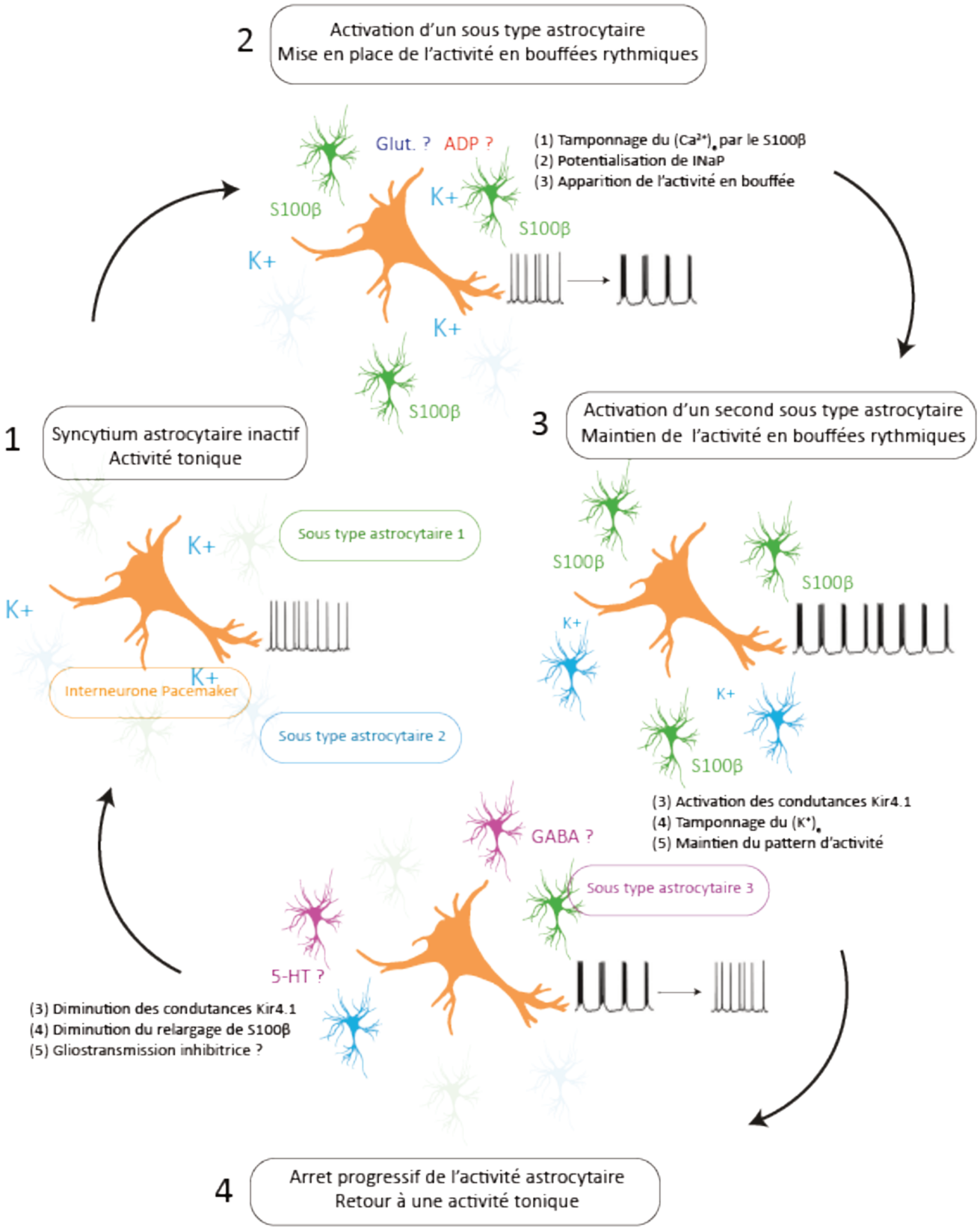


Figure 41 : Proposition des mécanismes astrocytaires pour favoriser l'environnement ionique propice à l'émergence des bouffées rythmiques au niveau des interneurones dy GPC locomoteur.

II. Les astrocytes dans la spasticité : une nouvelle piste thérapeutique ?

A. À la recherche du fautif dans l'émergence des astrocytes réactifs dans la spasticité suite à une lésion spinale

L'apparition des astrocytes réactifs peut résulter d'un large panel de stimuli internes et/ou externes, tels qu'une inflammation excessive, un traumatisme physique, une ischémie ou encore une neurodégénérescence. Une étude a démontré qu'un sous-type d'astrocytes devient réactif à la suite de l'activation de la microglie (Liddelow et al., 2017). De ce fait, il est très probable que la microglie soit responsable de l'émergence des astrocytes réactifs dans ma deuxième étude. Cependant, aucune évaluation de l'intégrité microgliale n'a été réalisé dans ce projet, laissant cette question en suspens.

Mon hypothèse se concentre également sur l'hypoxie chronique, en complément de l'activation microgliale. Une étude a montré qu'à la suite d'une contusion de la moelle épinière, le tissu spinal au-dessous de la lésion se trouve en état d'hypoxie (Li et al., 2017). En effet, une hyperactivité des récepteurs 5-HT_1 au niveau des péricytes induit une vasoconstriction excessive, créant cet état hypoxique (Li et al., 2017). Bien que mon modèle d'étude soit une transsection complète et non une contusion, il est tout fait probable que ce mécanisme soit également présent, voire accentué par la transsection de la veine centrale de la moelle épinière.

En parallèle, des études montre que l'hypoxie peut être un initiateur de réactivité astrocytaire (Kaur et al., 2006 ; Järlestedt et al., 2010). De plus, les conditions d'hypoxie induisent une augmentation de l'activité calcique astrocytaire (Smith et al., 2005 ; Peers et al., 2006 ; Aley et al., 2006 ; Christie et al., 2023 ; Angelova et al., 2015), ce qui pourrait, en retour, induire l'activation de différentes voies de signalisation, telles que la voie JAK/STAT, responsable de la réactivité astrocytaire (Ben Haïm et al., 2015). La hausse de l'activité Ca^{2+} observée pourrait être due au relargage des stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique (Aley et al., 2006) mais également des mitochondries (Smith et al., 2005, Agarwal et al. 2017). Ces dernières, au niveau des cardiomyocytes ont montré une plus faible recapture du Ca^{2+} intracellulaire en condition hypoxique (Griffiths et al., 1998), ce qui pourrait contribuer aux altérations calciques des astrocytes dans mon modèle. Cependant un tel mécanisme au niveau des astrocytes reste à démontrer.

En conclusion mon hypothèse quant à l'émergence des astrocytes réactifs repose sur le duo microglie-hypoxie, qui favorise l'activation de voies de signalisation au sein des astrocytes et induit leur réactivité.

B. Hétérogénéité des astrocytes dans la spasticité après une lésion de la moelle épinière

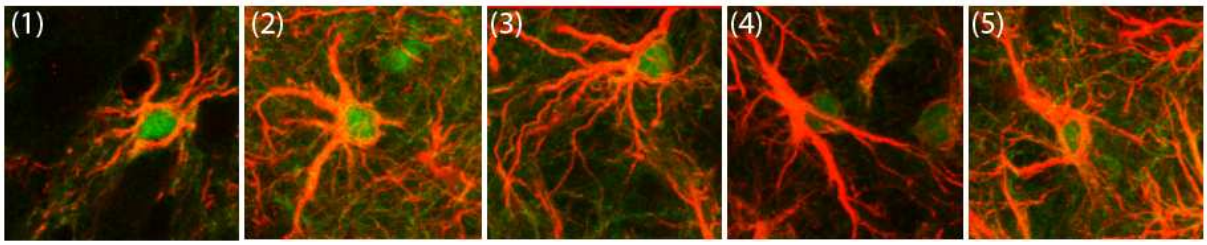
1. Hétérogénéité territoriale, morphologique et inflammatoire

Pendant longtemps la réactivité astrocytaire a été considérée comme un phénomène simpliste où l'ensemble des astrocytes subissaient des modifications de manière homogène. Cependant, il est désormais communément admis que la réactivité astrocytaire est un phénomène complexe impliquant une grande hétérogénéité parmi les astrocytes (Escartin et al. 2021). Ma deuxième étude ne fait pas exception à cette observation.

D'un point de vue territorial, à la suite d'une lésion de la moelle épinière, certains astrocytes entourent complètement les motoneurones adjacents, alors que d'autres vont rester à distance. Cela soulève des questions sur les facteurs qui dirigent ce positionnement en conditions de réactivité. Est-ce les neurones qui polarisent la direction des nouveaux prolongements astrocytaire ? La microglie ? Ou ce phénomène est-il intrinsèquement régulé par les astrocytes eux-mêmes ?

De plus, la morphologie des astrocytes présente une grande diversité. En examinant attentivement les résultats de la *figure 1* de ma deuxième étude, on observe une augmentation de la complexité morphologique des astrocytes. Cependant, en comparant les astrocytes d'une souris intacte et ceux d'une souris lésée, une proportion non négligeable d'astrocytes présentent des valeurs morphologiques similaires pour certains paramètres. Par conséquent, il est difficile de distinguer les astrocytes réactifs des non-réactifs en se basant uniquement sur des critères morphologiques dans mon modèle de lésion. Pour illustrer ce point, je vous propose un exercice interactif.

Parmi les astrocytes suivants, lesquels proviennent d'une souris lésée à la moelle épinière et seraient donc potentiellement qualifié de réactifs ?



Réponse le jour de la soutenance

Cela soulève plusieurs questions : est-ce que l'ensemble des astrocytes d'une région donnée deviennent réactifs de manière spécifique ? Existe-t-il une proportion d'astrocytes qui reste non réactifs ? Pour affiner la définition de la réactivité astrocytaire dans notre modèle pathologique, nous avons dû utiliser des marqueurs supplémentaires.

Nous avons choisi d'utiliser le marqueur pro-inflammatoire C3d. Étonnamment, j'ai trouvé qu'environ 15 % des astrocytes exprimaient le marqueur C3d chez les souris intactes. En comparant mes résultats avec plusieurs études, j'ai découvert qu'il est tout à fait normal de trouver des astrocytes pro-inflammatoires dans des conditions physiologiques pouvant même aller jusqu'à plus de 20% (Liddelow et al., 2017). De plus, en conditions physiologiques, la proportion d'astrocytes C3d positifs semble varier en fonction de la région cérébrale étudiée (Liddelow et al., 2017). Dans notre modèle de lésion spinale, j'ai observé une hausse de 22%, portant à 37% la proportion d'astrocytes exprimant C3d.

Si l'on se fie uniquement au marqueur C3d, il apparaît qu'une faible proportion d'astrocytes s'engage dans un processus pro-inflammatoire au niveau de la corne ventrale suite à une lésion de la moelle épinière. Bien qu'une hausse significative de ce marqueur soit observée, il ne peut pas être considéré comme un marqueur spécifique de réactivité astrocytaire et semble peu refléter les changements morphologiques que subissent les astrocytes après une lésion spinale.

2. Hétérogénéité fonctionnelle

D'un point de vue fonctionnel, l'utilisation de l'imagerie Ca^{2+} nous a permis de mettre en évidence certaines spécificités des astrocytes réactifs après une lésion spinale. Selon nos

analyses, des perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} spontanée surviennent de manière spécifique en fonction des compartiments cellulaires des astrocytes réactifs. En général, quel que soit le compartiment cellulaire (soma, prolongements et microdomaines) étudié, la proportion d'astrocytes actifs/silencieux augmente après une lésion de la moelle épinière. Cependant, l'analyse de paramètres tels que la fréquence, la durée et l'amplitude montre des différences intéressantes. Si au niveau du soma aucune différence est observée, les prolongements présentent une amplitude augmentée et les microdomaines montrent une amplitude augmentée associée à une diminution de la durée de l'activité Ca^{2+}. Les astrocytes réactifs provenant de souris injectées au LPS, montre quant à eux une hausse de la fréquence de l'activité Ca^{2+} tant au niveau du soma que des prolongements (Novakovic et al., 2023), ainsi que des perturbations mineures dans une autre étude (Diaz-Castro et al., 2021). Chez des modèles murins de la maladie d'Huntington, une diminution d'amplitude, de durée et de fréquence de l'activité Ca^{2+} est reportée au niveau des astrocytes réactifs (Jiang et al., 2016). Ces études indiquent qu'il n'existe pas de règle universelle pour prédire le phénotype Ca^{2+} des astrocytes réactifs. Bien que les astrocytes réactifs présentent une altération de leur activité calcique, la direction de cette altération (augmentation ou diminution) semble dépendre de la région ainsi que de la pathologie étudiée.

Une autre approche fonctionnelle, visant à imager les variations de pH au niveau des astrocytes a potentiellement révélé un nouveau marqueur de réactivité astrocytaire. Dans notre étude, suite à une stimulation par du glutamate les astrocytes se sont vu adopter deux réponses distinctes : une alcalinisation ou une acidification. Chez les souris intactes, 73 % des astrocytes s'acidifient, alors que chez les souris lésées, ce pourcentage d'acidification atteint 92 %. De plus, chez les astrocytes qui s'acidifient, l'acidification est exacerbée chez les souris lésées. Cependant, aucune étude à ce jour n'a investigué les variations de pH chez les astrocytes réactifs. Une étude montre qu'une surexpression de STAT3 conduit à des acidifications plus fortes due à une augmentation du transporteur NBCe1 (Giannaki et al., 2020). Des données préliminaires en cours d'analyse visent à déterminer si une hausse de la forme phosphorylée de STAT3, pSTAT3, un inducteur de réactivité astrocytaire (Ben Haïm et al., 2015), serait responsable de l'émergence de nos astrocytes réactifs associés à une hausse du transporteur NBCe1, ce qui expliquerait les altérations de pH observées. Bien qu'une proportion minime d'astrocytes réactifs s'alcalinise, on pourrait envisager qu'une hausse de l'acidification astrocytaire constitue un marqueur fonctionnel de réactivité astrocytaire. En

effet, une étude a montré qu'une hausse de l'expression du transporteur NBCe1 survient au sein des astrocytes après une ischémie (Sohn et al., 2011), mais davantage d'études sur les astrocytes réactifs sont nécessaires pour éclaircir le rôle du transporteur NBCe1.

Un dernier point intéressant est à souligner. Chez les souris lésées, on observe (i) une hausse de 15 % d'astrocytes exprimant C3d, (ii) une hausse de 32 % des somas actifs, et (iii) une hausse de 19 % des astrocytes qui s'acidifient. Étant donné que ces pourcentages sont relativement proches, on peut se demander si ce sont spécifiquement les astrocytes exprimant C3d qui présentent des altérations d'activité Ca^{2+} et de pH. Malheureusement dans le cadre de ma thèse, il est impossible de répondre à cette question. Toutefois, l'association d'imagerie fonctionnelle avec l'analyse des transcrits pour établir ou non une corrélation serait un point de recherche intéressant.

C. L'œuf ou la poule, les neurones ou les astrocytes ? Qui est à l'origine de l'émergence des symptômes spastiques ?

La question centrale à laquelle je dois tenter de répondre est de savoir si ce sont les neurones ou les astrocytes qui sont à l'origine des symptômes spastiques. Le modèle de transsection complète chez le nouveau-né utilisé par notre équipe est assez complexe. Si ma thèse a permis d'identifier les astrocytes comme un acteur des symptômes spastiques, il ne faut pas oublier que des travaux précédents de l'équipe ont également montré des déficits au sein même des motoneurones. En effet, comme mentionné en introduction (Chapitre 3 – section II-b), une perturbation de la balance excitation/inhibition due à une diminution des transporteurs KCC2 à la membrane ainsi qu'au clivage des canaux Nav1.6 conduits à une excitabilité des motoneurones (Plantier et al., 2019 ; Brocard et al., 2016 ; Bos et al., 2013 ; Boulenguez et al., 2010). Parmi ces mécanismes et ceux mis en évidence chez les astrocytes dans le cadre de ma thèse, lequel survient en premier ?

Une première étude indique que la réactivité astrocytaire survient avant la dégénérescence des motoneurones spinaux dans un modèle de souris d'atrophie musculaire spinale (Schmitt et al., 2023). Dans ce contexte, une diminution des transporteurs au glutamate GLT1 conduit à des élévations anormales de glutamate, induisant la mort des motoneurones (Schmitt et al., 2023). Une autre étude montre que les astrocytes réactifs sont à l'origine de la mort des cellules ganglionnaires de la rétine à la suite d'une ligature du nerf

optique (Guttenplan et al., 2020). Empêcher la réactivité astrocytaire ou neutraliser leur action protège les cellules ganglionnaires de la rétine (Guttenplan et al., 2020). De même, dans la maladie d'Alzheimer, les astrocytes réactifs sont détectés dans les phases précoces de la maladie, voire avant la mort neuronale, et jouent un rôle majeur dans la progression du déclin cognitif (Jack et al., 2010 ; Osborn et al., 2016). Une mutation du gène codant pour une protéine astrocytaire, l'aquaporine 4 (APOE4), constitue un facteur de risque pour développer la maladie d'Alzheimer (Sienski et al., 2021).

Ces études suggèrent que les astrocytes sont à l'origine des symptômes des pathologies sous-jacentes.

En revanche, une étude sur des modèles murins de la maladie d'Huntington (R6/2 et Q175), met en évidence une absence de réactivité astrocytaire à des âges symptomatiques de la maladie (Tong et al., 2014). Les déficits fonctionnels des astrocytes pendant les âges symptomatiques sont absents durant la phase pré-symptomatique. La réactivité astrocytaire apparaitrait uniquement dans une phase plus tardive de la maladie, au moment où la neurodégénération survient (Tong et al., 2014). Cette étude indique que la réactivité astrocytaire est une conséquence de la neurodégénération et non sa cause. Bien que les astrocytes ne participent pas toujours à l'initiation de la maladie, ils sont fortement associés à la progression des symptômes et accélèrent l'évolution de la maladie (Brandebura et al., 2023).

Malheureusement, dans le cadre de mon étude, la cinétique de mise en place des astrocytes réactifs vis-à-vis des symptômes n'a pas été étudiée. Il est donc difficile de savoir, qui des astrocytes ou des neurones, sont à l'origine des symptômes spastiques. D'un point de vue moléculaire, les astrocytes et les neurones sont équipés afin de détecter les différents composants inflammatoires tel que les cytokines et ROS (Giovannoni et Quintana et al., 2020). Il est donc difficile de savoir dans mon modèle de lésion spinale, si les astrocytes détectent et entreprennent des changements moléculaires avant les neurones. Ces premiers changements fonctionnels au niveau des astrocytes pourraient perturber le fonctionnement des neurones, entraînant un phénotype hyperexcitable. Alternativement, suite à une lésion de la moelle épinière et en condition d'hypoxie (Li et al., 2017), les astrocytes et les neurones pourraient subir des modifications indépendantes, conduisant aux changements observés dans les deux types cellulaires. Une autre hypothèse est que l'hyperexcitabilité neuronale pourrait induire la réactivité astrocytaire, une activité neuronale pouvant déclencher la réactivité des

astrocytes. Cette hyperexcitabilité chronique des motoneurones pourrait alors alimenter la réactivité astrocytaire, créant un cercle vicieux où les astrocytes réactifs, développent des dysfonctions qui, à leur tour, augmentent l'hyperexcitabilité des motoneurones.

En réalité, je ne privilégie aucune de ces hypothèses individuellement. Je propose de les considérer comme un mécanisme global, sans chercher à discriminer l'un des sous types cellulaires. Le fonctionnement des neurones dépend directement de l'activité des astrocytes et *vice versa*. Ces deux sous types cellulaires appartiennent à un réseau qui, dans un contexte pathologique, tente constamment de s'équilibrer. Je penche pour la théorie du cercle vicieux où, à la suite d'une hausse des molécules inflammatoires, combinée à une hypoxie, le duo neurone-astrocyte entre dans une boucle d'hyperexcitabilité chronique.

D. Les astrocytes peuvent-ils vraiment soigner la spasticité ?

La conclusion de ma dernière étude vise à explorer l'utilisation des astrocytes comme potentiel traitement thérapeutique. Cependant, est-il vraiment légitime de penser que les astrocytes peuvent soigner des pathologies ? À mon avis, oui, mais cela dépend de plusieurs facteurs, comme l'étiologie de la pathologie et de son stade. De nombreuses études ont récemment mis en lumière le potentiel thérapeutique des astrocytes chez la souris. Par exemple, la modulation de l'activité ou de l'inflammation astrocytaire a permis de réduire les symptômes de la dépression (Gonzàlez-Arias et al., 2023), de la maladie d'Huntington (Tong et al., 2014), de la maladie d'Alzheimer (Ceyzériat et al., 2018), du syndrome de l'X fragile (Bataveljic et al., 2024) ainsi que des lésions traumatiques du cortex (Liu et al., 2022).

Dans ma dernière étude, une dysfonction des canaux Kir4.1 astrocytaires a été observée. En parallèle, plusieurs études ont montré l'impact thérapeutique des Kir4.1 dans la réduction des symptômes de diverses pathologies (Tong et al., 2014 ; Bataveljic et al., 2024). Mis ensemble, ces éléments offrent de bonnes perspectives pour traiter la spasticité par le biais des astrocytes.

Il est également important de noter que, parmi les différentes structures du cerveau de la souris, la région ayant le plus grand ratio astrocyte-neurone est la moelle épinière ventrale, siège des motoneurones (Endo et al., 2022). Des données préliminaires au sein de l'équipe estime ce ratio à 2.1 pour 1 dans notre modèle, ce qui laisse optimiste quant à la puissance thérapeutique du ciblage astrocytaire au sein de cette région.

C'est pourquoi ces arguments nous ont conduits à tenter de traiter la spasticité en ciblant les astrocytes. En pratique, la mesure de l'activité musculaire par EMG combinée à l'analyse de la cinétique du mouvement par DeepLabCut, a révélé un effet thérapeutique sur la spasticité. En effet, la surexpression des canaux Kir4.1 dans les astrocytes après une lésion spinale a montré une réduction des symptômes spastiques. Cependant bien que les symptômes soient réduits, les souris présentent encore des spasmes musculaires incontrôlés, indiquant que cette approche thérapeutique est quelque peu limitée. Cela n'est pas surprenant car les symptômes résiduels peuvent être attribués à des changements moléculaires survenant au niveau des motoneurones. De plus, bien qu'une partie de ma thèse se soit concentrée sur les perturbations de l'homéostasie K^+ après lésion, il serait naïf de penser que ce sont les seules dysfonctions survenant dans les astrocytes après une lésion spinale. Il est possible également d'observer une altération de la recapture glutamatergique, phénomène souvent observé au sein des astrocytes réactifs (Schmitt et al., 2023 ; Olsen et al., 2010). De même, une potentielle diminution du couplage jonctionnel pourrait également expliquer la diminution de la conductance Kir4.1 (Stevenson et al., 2023). En outre, étudier la potentielle implication de la gliotransmission dans l'hyperexcitabilité neuronale serait un projet intéressant. Il serait également pertinent de réduire la réactivité astrocytaire de manière localisée au niveau des motoneurones par le biais d'AAVs (AAV-SOCS3) pour inhiber la voie de la réactivité astrocytaire telle que Jak2-STAT3 (Ceyzériat et al., 2018).

En conclusion, les astrocytes offrent une perspective de traitement prometteuse contre la spasticité. Cependant, afin d'affiner cette piste thérapeutique, davantage de fonctions astrocytaires doivent être étudiées. Pour le moment, la piste thérapeutique la plus probable serait d'utiliser les astrocytes pour des formes mineures de spasticité, ou en association avec d'autres traitements ciblant les neurones.

E. La spasticité dans diverses pathologies : les astrocytes réactifs en tant que dénominateur commun ?

Le mécanisme de la spasticité chez la souris dans le cadre de ma thèse survient après une lésion de la moelle épinière. Cependant, la spasticité est également présente dans d'autres pathologies telles que l'arrêt vasculaire cérébral (AVC), la sclérose en plaque (SEP), la paralysie cérébrale, les traumatismes crâniens ou encore la spasticité héréditaire (Zakel et al.,

2024 ; Mathis et al., 2024 ; Bavikatte et al., 2024). Il est intéressant de noter que dans chacune de ces pathologies, on retrouve également le phénomène de réactivité astrocytaire (Pekny et al., 2019 ; Ludwin et al., 2016 ; Burda et al., 2016 ; Liu et al., 2023). Dans le cadre de la spasticité héréditaire et de la SEP, la GFAP est même utilisée comme biomarqueur de la maladie (Kessler et al., 2022 ; Cross et al., 2024).

En effet, si un AVC touche une région cérébrale responsable du maintien du tonus musculaire, 25 à 43% des patients peuvent développer de la spasticité au cours de la première année suivant l'AVC (American Heart Association, 2019). On peut alors se demander si les astrocytes réactifs pourraient constituer un mécanisme commun dans l'émergence et le maintien de la spasticité dans ces pathologies. À ce jour, les évidences s'accumulent en faveur des astrocytes réactifs comme responsables d'une hyperexcitabilité neuronale s'accumulent. Pour preuve, un déficit de la recapture du K^+ peut être considéré comme un marqueur de réactivité astrocytaire (Escartin et al., 2021). Étant donné que la spasticité résulte d'une hyperexcitabilité neuronale, il est plausible que les astrocytes réactifs en soient à l'origine.

Les astrocytes réactifs peuvent influencer l'excitabilité des neurones par divers mécanismes. Parmi eux, un déficit de recapture du K^+, largement décrit dans ma thèse, ainsi qu'un déficit de recapture de neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate, pourraient favoriser l'émergence de spasticité dans ces pathologies. Après un AVC il a été montré que les astrocytes réactifs présentent des dysfonctions dans la recapture du glutamate (van Putten et al., 2021) ainsi qu'un relargage excessif de glutamate par le biais des canaux SWELL1 (Yang et al., 2019), contribuant aux lésions cérébrales. Ces mécanismes pourraient persister au sein d'astrocytes éloignés de la zone nécrosée et induire de la spasticité, et pourraient également être présents dans d'autres pathologies associées à la spasticité.

Ces hypothèses restent à confirmer, car la littérature scientifique manque d'études visant à éclaircir le rôle des astrocytes dans la spasticité dans divers modèles pathologiques. Plus récemment, une étude a mis en lumière le potentiel effet protecteur des astrocytes dans les tremblements pathologiques via les récepteurs aux endocannabinoïdes (CB1) (Carlsen et al., 2021). Cette étude montre qu'au sein d'un réseau hyperexcitable, l'activation des récepteurs CB1 des astrocytes peut entraîner la libération de purines, inhibant ainsi la transmission synaptique excitatrice et réduisant les tremblements des pattes postérieurs chez la souris. Cette étude, combinée aux mécanismes bien connus des astrocytes réactifs, pourrait

contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses pour traiter la spasticité.

LIMITATIONS DES ÉTUDES

Comme dans l'ensemble des travaux scientifiques, il existe des limites quant à l'impact des résultats obtenus. Ces limites constituent des faiblesses inévitables, mais il est 'important d'en être conscient afin d'améliorer l'impact et la reproductibilité des résultats scientifiques sur le long terme.

Le premier point que j'aimerais aborder est l'âge des animaux utilisés au cours de ma thèse. La majorité des résultats de ma thèse proviennent d'expériences électrophysiologiques sur des tranches de moelle épinière. Il est important de noter que l'électrophysiologie de type patch-clamp dans la moelle épinière est très difficile (visibilité réduite, difficulté à maintenir les cellules en vie, et temps de dissection plus long que le cerveau). Nous avons donc opté pour réaliser des expériences sur des souris juvéniles. De plus, il est très difficile (voire impossible) d'enregistrer les motoneurones des segments lombaires après 1 mois face à l'étendue de l'arborisation dendritique de ces cellules pouvant atteindre $1mm^3$. L'hyperexcitabilité des motoneurones post-lésionnelle ayant été démontré uniquement chez les rongeurs nouveau-nés, nous avons décidé de rester dans ce paradigme pour étudier l'interaction neurone-astrocyte. Les réseaux spinaux étant encore relativement immatures, on peut se questionner sur la pertinence des résultats pour les souris adultes. Il serait donc intéressant de reproduire les résultats principaux chez les souris adultes afin de solidifier les données.

Le deuxième point concerne l'approche *ex vivo*. Bien que plusieurs approches *in vivo* aient été entreprises durant ma thèse, la majorité des mécanismes cellulaires trouvés au cours de celle-ci repose sur l'utilisation d'approche *ex vivo*. L'utilisation de tranches aiguës de moelle épinière présente de nombreux avantages, mais elle peut aussi introduire des biais. Il serait alors utile de confirmer certains résultats par des approches *in vivo*, notamment par imagerie bi-photonique. Cependant, l'imagerie bi-photonique de la moelle épinière médiane et ventrale apparait également très complexe pour des raisons techniques.

Enfin, nous avons mis en avant le maintien de l'homéostasie K^+ par les astrocytes à travers un seul acteur, les canaux Kir4.1. Je garde à l'esprit que cette approche est unilatérale

et qu'il existe d'autres acteurs impliqués dans le maintien de cette homéostasie. En réalisant des applications de K^+ au niveau astrocytaire en présence de Ba^{2+} (bloqueurs des canaux Kir4.1), j'ai pu remarquer qu'une grande composante de la recapture de K^+ subsiste, indiquant la présence d'autres mécanismes. L'utilisation d'approches computationnelles intégrant l'ensemble des acteurs de l'homéostasie K^+ serait une démarche complémentaire intéressante à explorer.

RÉFÉRENCES

1. Abdelhak, A., Foschi, M., Abu-Rumeileh, S., Yue, J.K., D'Anna, L., Huss, A., Oeckl, P., Ludolph, A.C., Kuhle, J., Petzold, A., et al. (2022). Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. Nat Rev Neurol *18*, 158–172. https://doi.org/10.1038/s41582-021-00616-3.

2. Abjean, L., Ben Haim, L., Riquelme-Perez, M., Gipchtein, P., Derbois, C., Palomares, M.-A., Petit, F., Hérard, A.-S., Gaillard, M.-C., Guillermier, M., et al. (2023). Reactive astrocytes promote proteostasis in Huntington's disease through the JAK2-STAT3 pathway. Brain *146*, 149–166. https://doi.org/10.1093/brain/awac068.

3. Achilles, K., Okabe, A., Ikeda, M., Shimizu-Okabe, C., Yamada, J., Fukuda, A., Luhmann, H.J., and Kilb, W. (2007). Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na+-dependent K+-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. J Neurosci *27*, 8616–8627. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5041-06.2007.

4. Acton, D., and Miles, G.B. (2015). Stimulation of Glia Reveals Modulation of Mammalian Spinal Motor Networks by Adenosine. PLoS One *10*, e0134488. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134488.

5. Agarwal, A., Wu, P.-H., Hughes, E.G., Fukaya, M., Tischfield, M.A., Langseth, A.J., Wirtz, D., and Bergles, D.E. (2017). Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. Neuron *93*, 587-605.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.034.

6. Aitken, P.G., and Somjen, G.G. (1986). The sources of extracellular potassium accumulation in the CA1 region of hippocampal slices. Brain Research *369*, 163–167. https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90524-X.

7. Al-Mosawie, A., Wilson, J.M., and Brownstone, R.M. (2007). Heterogeneity of V2-derived interneurons in the adult mouse spinal cord. European Journal of Neuroscience *26*, 3003–3015. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05907.x.

8. Albert, T., Ravaud, J.-F., and Tetrafigap group (2005). Rehabilitation of spinal cord injury in France: a nationwide multicentre study of incidence and regional disparities. Spinal Cord *43*, 357–365. https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101717.

9. Aley, P.K., Murray, H.J., Boyle, J.P., Pearson, H.A., and Peers, C. (2006). Hypoxia stimulates Ca2+ release from intracellular stores in astrocytes via cyclic ADP ribose-mediated activation of ryanodine receptors. Cell Calcium *39*, 95–100. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.09.009.

10. Allison, S.C., Abraham, L.D., and Petersen, C.L. (1996). Reliability of the Modified Ashworth Scale in the assessment of plantarflexor muscle spasticity in patients with traumatic brain injury. Int J Rehabil Res *19*, 67–78. https://doi.org/10.1097/00004356-199603000-00007.

11. Amzica, F., and Steriade, M. (2000). Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. J Neurosci *20*, 6648–6665. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-17-06648.2000.

12. Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. Neurosci Lett *565*, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030.

13. Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. Nature *532*, 195–200. https://doi.org/10.1038/nature17623.

14. Angel, R.W., and Hofmann, W.W. (1963). THE H REFLEX IN NORMAL, SPASTIC, AND RIGID SUBJECTS. Arch Neurol *9*, 591–596. https://doi.org/10.1001/archneur.1963.00460060021002.

15. Angelova, P.R., Kasymov, V., Christie, I., Sheikhbahaei, S., Turovsky, E., Marina, N., Korsak, A., Zwicker, J., Teschemacher, A.G., Ackland, G.L., et al. (2015). Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. Journal of Neuroscience *35*, 10460–10473. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0045-15.2015.

16. Anlauf, E., and Derouiche, A. (2013). Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. Front Endocrinol (Lausanne) *4*, 144. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144.

17. Antri, M., Barthe, J.-Y., Mouffle, C., and Orsal, D. (2005). Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine. Neurosci Lett *384*, 162–167. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.062.

18. Apodaca, G., Kiss, S., Ruiz, W., Meyers, S., Zeidel, M., and Birder, L. (2003). Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. Am J Physiol Renal Physiol *284*, F966-976. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00359.2002.

19. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci *22*, 208–215. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6.

20. Arnaiz, G.R. de L. (2007). Na+, K+-ATPase in the Brain: Structure and Function. In Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Membranes and Transport, A. Lajtha and M. E. A. Reith, eds. (Springer US), pp. 209–224. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30380-2_10.

21. Avoli, M., Drapeau, C., Perreault, P., Louvel, J., and Pumain, R. (1990). Epileptiform activity induced by low chloride medium in the CA1 subfield of the hippocampal slice. J Neurophysiol *64*, 1747–1757. https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.6.1747.

22. Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Jacob Filho, W., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. J Comp Neurol *513*, 532–541. https://doi.org/10.1002/cne.21974.

23. Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., and Weiner, H.L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Neuron *97*, 742–768. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021.

24. Bal, T., and McCormick, D.A. (1993). Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. J Physiol *468*, 669–691. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019794.

25. Ballanyi, K., Grafe, P., and ten Bruggencate, G. (1987). Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. J Physiol *382*, 159–174. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016361.

26. Barbay, T., Pecchi, E., Ducrocq, M., Rouach, N., Brocard, F., and Bos, R. Astrocytic Kir4.1 channels regulate locomotion by orchestrating neuronal rhythmicity in the spinal network. Glia *n/a*. https://doi.org/10.1002/glia.24337.

27. Barbeau, H., and Rossignol, S. (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. Brain Res *412*, 84–95. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91442-9.

28. Barbiellini Amidei, C., Salmaso, L., Bellio, S., and Saia, M. (2022). Epidemiology of traumatic spinal cord injury: a large population-based study. Spinal Cord *60*, 812–819. https://doi.org/10.1038/s41393-022-00795-w.

29. Bareyre, F.M., and Schwab, M.E. (2003). Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. Trends Neurosci *26*, 555–563. https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.004.

30. Barra, B., Conti, S., Perich, M.G., Zhuang, K., Schiavone, G., Fallegger, F., Galan, K., James, N.D., Barraud, Q., Delacombaz, M., et al. (2022). Epidural electrical stimulation of the cervical dorsal roots restores voluntary upper limb control in paralyzed monkeys. Nat Neurosci *25*, 924–934. https://doi.org/10.1038/s41593-022-01106-5.

31. Bartholdi, D., and Schwab, M.E. (1997). Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. Eur J Neurosci *9*, 1422–1438. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01497.x.

32. Bataveljic, D., Pivonkova, H., de Concini, V., Hébert, B., Ezan, P., Briault, S., Bemelmans, A.-P., Pichon, J., Menuet, A., and Rouach, N. (2024). Astroglial Kir4.1 potassium channel deficit drives neuronal hyperexcitability and behavioral defects in Fragile X syndrome mouse model. Nat Commun *15*, 3583. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47681-y.

33. Bavikatte, G., Subramanian, G., Ashford, S., Allison, R., and Hicklin, D. (2021). Early Identification, Intervention and Management of Post-stroke Spasticity: Expert Consensus Recommendations. J Cent Nerv Syst Dis *13*, 11795735211036576. https://doi.org/10.1177/11795735211036576.

34. Bayraktar, O.A., Bartels, T., Holmqvist, S., Kleshchevnikov, V., Martirosyan, A., Polioudakis, D., Ben Haim, L., Young, A.M.H., Batiuk, M.Y., Prakash, K., et al. (2020). Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. Nat Neurosci *23*, 500–509. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0602-1.

35. Bayraktar, O.A., Fuentealba, L.C., Alvarez-Buylla, A., and Rowitch, D.H. (2014). Astrocyte development and heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Biol *7*, a020362. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362.

36. Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. Nat Neurosci *19*, 182–189. https://doi.org/10.1038/nn.4201.

37. Beato, M., and Nistri, A. (1999). Interaction between disinhibited bursting and fictive locomotor patterns in the rat isolated spinal cord. J Neurophysiol *82*, 2029–2038. https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.5.2029.

38. Beck, A., Lohr, C., Nett, W., and Deitmer, J.W. (2001). Bursting activity in leech Retzius neurons induced by low external chloride. Pflugers Arch *442*, 263–272. https://doi.org/10.1007/s004240100525.

39. Bedner, P., Dupper, A., Hüttmann, K., Müller, J., Herde, M.K., Dublin, P., Deshpande, T., Schramm, J., Häussler, U., Haas, C.A., et al. (2015). Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. Brain *138*, 1208–1222. https://doi.org/10.1093/brain/awv067.

40. Bellardita, C., Caggiano, V., Leiras, R., Caldeira, V., Fuchs, A., Bouvier, J., Löw, P., and Kiehn, O. (2017). Spatiotemporal correlation of spinal network dynamics underlying spasms in chronic spinalized mice. Elife *6*, e23011. https://doi.org/10.7554/eLife.23011.

41. Ben Haim, L., Ceyzériat, K., Carrillo-de Sauvage, M.A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., et al. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. J Neurosci *35*, 2817–2829. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015.

42. Benarroch, E.E. (2016). Astrocyte signaling and synaptic homeostasis: I: Membrane channels, transporters, and receptors in astrocytes. Neurology *87*, 324–330. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002875.

43. Bennett, M.V.L., and Zukin, R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. Neuron *41*, 495–511. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00043-1.

44. Benson, C.A., Olson, K.-L., Patwa, S., Kauer, S.D., King, J.F., Waxman, S.G., and Tan, A.M. (2024). Conditional Astrocyte Rac1KO Attenuates Hyperreflexia after Spinal Cord Injury. J. Neurosci. *44*. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1670-22.2023.

45. Berlowitz, D.J., Wadsworth, B., and Ross, J. (2016). Respiratory problems and management in people with spinal cord injury. Breathe (Sheff) *12*, 328–340. https://doi.org/10.1183/20734735.012616.

46. Bertrand, S., and Cazalets, J.-R. (1998). Postinhibitory Rebound During Locomotor-Like Activity in Neonatal Rat Motoneurons In Vitro. Journal of Neurophysiology *79*, 342–351. https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.342.

47. Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. Nature *391*, 281–285. https://doi.org/10.1038/34651.

48. Biering-Sørensen, F., Biering-Sørensen, T., Liu, N., Malmqvist, L., Wecht, J.M., and Krassioukov, A. (2018). Alterations in cardiac autonomic control in spinal cord injury. Auton Neurosci *209*, 4–18. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.02.004.

49. Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., and Uyeda, C.T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. Brain Res *43*, 429–435. https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90398-8.

50. Bohannon, R.W., and Smith, M.B. (1987). Upper extremity strength deficits in hemiplegic stroke patients: relationship between admission and discharge assessment and time since onset. Arch Phys Med Rehabil *68*, 155–157.

51. Bolton, S., Greenwood, K., Hamilton, N., and Butt, A.M. (2006). Regulation of the astrocyte resting membrane potential by cyclic AMP and protein kinase A. Glia *54*, 316–328. https://doi.org/10.1002/glia.20384.

52. Bos, R., Drouillas, B., Bouhadfane, M., Pecchi, E., Trouplin, V., Korogod, S.M., and Brocard, F. (2021). Trpm5 channels encode bistability of spinal motoneurons and ensure motor control of hindlimbs in mice. Nat Commun *12*, 6815. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27113-x.

53. Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., and Vinay, L. (2013). Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 348–353. https://doi.org/10.1073/pnas.1213680110.

54. Bouhadfane, M., Tazerart, S., Moqrich, A., Vinay, L., and Brocard, F. (2013). Sodium-mediated plateau potentials in lumbar motoneurons of neonatal rats. J Neurosci *33*, 15626–15641. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1483-13.2013.

55. Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., et al. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat Med *16*, 302–307. https://doi.org/10.1038/nm.2107.

56. Bouvier, J. (2014). Les neurones en marche - L'organisation des réseaux locomoteurs de la moelle épinière mise à jour par la génétique. Med Sci (Paris) *30*, 121–124. https://doi.org/10.1051/medsci/20143002002.

57. Bracci, E., Beato, M., and Nistri, A. (1998). Extracellular K+ Induces Locomotor-Like Patterns in the Rat Spinal Cord In Vitro: Comparison With NMDA or 5-HT Induced Activity. Journal of Neurophysiology *79*, 2643–2652. https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.5.2643.

58. Brandebura, A.N., Paumier, A., Onur, T.S., and Allen, N.J. (2023). Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurosci *24*, 23–39. https://doi.org/10.1038/s41583-022-00641-1.

59. Britz, O., Zhang, J., Grossmann, K.S., Dyck, J., Kim, J.C., Dymecki, S., Gosgnach, S., and Goulding, M. (2015). A genetically defined asymmetry underlies the inhibitory control of flexor-extensor locomotor movements. Elife *4*, e04718. https://doi.org/10.7554/eLife.04718.

60. Broadhead, M.J., and Miles, G.B. (2020). Bi-Directional Communication Between Neurons and Astrocytes Modulates Spinal Motor Circuits. Front. Cell. Neurosci. *14*, 30. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00030.

61. Brocard, C., Plantier, V., Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bouhadfane, M., Viallat-Lieutaud, A., Vinay, L., and Brocard, F. (2016). Cleavage of Na+ channels by calpain increases persistent Na+ current and promotes spasticity after spinal cord injury. Nat Med *22*, 404–411. https://doi.org/10.1038/nm.4061.

62. Brocard, F., and Dubuc, R. (2003). Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. J Neurophysiol *90*, 1714–1727. https://doi.org/10.1152/jn.00202.2003.

63. Brocard, F., Shevtsova, N.A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I.A., and Vinay, L. (2013). Activity-dependent changes in extracellular Ca2+ and K+ reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. Neuron *77*, 1047–1054. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.026.

64. Brocard, F., Tazerart, S., and Vinay, L. (2010). Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? Neuroscientist *16*, 139–155. https://doi.org/10.1177/1073858409346339.

65. Brocard, F., Verdier, D., Arsenault, I., Lund, J.P., and Kolta, A. (2006). Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. J Neurophysiol *96*, 2410–2424. https://doi.org/10.1152/jn.00352.2006.

66. Burda, J.E., Bernstein, A.M., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. Exp Neurol *275 Pt 3*, 305–315. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020.

67. Burke, A.L.J., Mathias, J.L., and Denson, L.A. (2015). Psychological functioning of people living with chronic pain: a meta-analytic review. Br J Clin Psychol *54*, 345–360. https://doi.org/10.1111/bjc.12078.

68. Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., and Zajac, F.E. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. J Physiol *234*, 723–748. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010369.

69. Burke, R.E., Levine, D.N., and Zajac, F.E. (1971). Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. Science *174*, 709–712. https://doi.org/10.1126/science.174.4010.709.

70. Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci *22*, 183–192. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002.

71. Butt, A.M., and Jennings, J. (1994). The astrocyte response to gamma-aminobutyric acid attenuates with age in the rat optic nerve. Proc Biol Sci *258*, 9–15. https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0134.

72. Butt, S.J.B., and Kiehn, O. (2003). Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals. Neuron *38*, 953–963. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00353-2.

73. Caggiano, V., Leiras, R., Goñi-Erro, H., Masini, D., Bellardita, C., Bouvier, J., Caldeira, V., Fisone, G., and Kiehn, O. (2018). Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. Nature *553*, 455–460. https://doi.org/10.1038/nature25448.

74. Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. J Neurosci *28*, 264–278. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.

75. Caldeira, V., Dougherty, K.J., Borgius, L., and Kiehn, O. (2017). Spinal Hb9::Cre-derived excitatory interneurons contribute to rhythm generation in the mouse. Sci Rep *7*, 41369. https://doi.org/10.1038/srep41369.

76. Cammer, W. (1990). Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. Journal of Neuroimmunology *26*, 173–178. https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90088-5.

77. Campbell, S.C., Muñoz-Ballester, C., Chaunsali, L., Mills, W.A., Yang, J.H., Sontheimer, H., and Robel, S. (2020). Potassium and glutamate transport is impaired in scar-forming tumor-associated astrocytes. Neurochem Int *133*, 104628. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104628.

78. Cangiano, L., and Grillner, S. (2003). Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey. J Neurophysiol *89*, 2931–2942. https://doi.org/10.1152/jn.01100.2002.

79. Capogrosso, M., Milekovic, T., Borton, D., Wagner, F., Moraud, E.M., Mignardot, J.-B., Buse, N., Gandar, J., Barraud, Q., Xing, D., et al. (2016). A brain-spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates. Nature *539*, 284–288. https://doi.org/10.1038/nature20118.

80. Carbo-Tano, M., Lapoix, M., Jia, X., Thouvenin, O., Pascucci, M., Auclair, F., Quan, F.B., Albadri, S., Aguda, V., Farouj, Y., et al. (2023). The mesencephalic locomotor region recruits V2a reticulospinal neurons to drive forward locomotion in larval zebrafish. Nat Neurosci *26*, 1775–1790. https://doi.org/10.1038/s41593-023-01418-0.

81. Cardenas, D.D., and Jensen, M.P. (2006). Treatments for chronic pain in persons with spinal cord injury: A survey study. J Spinal Cord Med *29*, 109–117. https://doi.org/10.1080/10790268.2006.11753864.

82. Carlsen, E.M.M., Falk, S., Skupio, U., Robin, L., Pagano Zottola, A.C., Marsicano, G., and Perrier, J.-F. (2021). Spinal astroglial cannabinoid receptors control pathological tremor. Nat Neurosci *24*, 658–666. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00818-4.

83. Cazalets, J.R., Borde, M., and Clarac, F. (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. J. Neurosci. *15*, 4943–4951. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-04943.1995.

84. Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M.-A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., et al. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Commun *6*, 104. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1.

85. Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Octeau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., et al. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. Neuron *95*, 531-549.e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029.

86. Chalif, J.I., Martínez-Silva, M. de L., Pagiazitis, J.G., Murray, A.J., and Mentis, G.Z. (2022). Control of mammalian locomotion by ventral spinocerebellar tract neurons. Cell *185*, 328-344.e26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.014.

87. Chevalier, M., Lory, P., Mironneau, C., Macrez, N., and Quignard, J.-F. (2006). T-type Cav3.3 calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations. European Journal of Neuroscience *23*, 2321–2329. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04761.x.

88. Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K.D., and Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. J Neurosci *30*, 15769–15777. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2078-10.2010.

89. Chever, O., Dossi, E., Pannasch, U., Derangeon, M., and Rouach, N. (2016). Astroglial networks promote neuronal coordination. Sci Signal *9*, ra6. https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066.

90. Cholet, N., Pellerin, L., Magistretti, P.J., and Hamel, E. (2002). Similar perisynaptic glial localization for the Na+,K+-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. Cereb Cortex *12*, 515–525. https://doi.org/10.1093/cercor/12.5.515.

91. Christensen, R.K., Delgado-Lezama, R., Russo, R.E., Lind, B.L., Alcocer, E.L., Rath, M.F., Fabbiani, G., Schmitt, N., Lauritzen, M., Petersen, A.V., et al. (2018). Spinal dorsal horn astrocytes release GABA in response to synaptic activation. J Physiol *596*, 4983–4994. https://doi.org/10.1113/JP276562.

92. Christie, I.N., Theparambil, S.M., Braga, A., Doronin, M., Hosford, P.S., Brazhe, A., Mascarenhas, A., Nizari, S., Hadjihambi, A., Wells, J.A., et al. (2023). Astrocytes produce nitric oxide via nitrite reduction in mitochondria to regulate cerebral blood flow during brain hypoxia. Cell Reports *42*. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113514.

93. Chvátal, A., and Verkhratsky, A. (2018). An Early History of Neuroglial Research: Personalities. Neuroglia *1*, 245–257. https://doi.org/10.3390/neuroglia1010016.

94. Clarac, F. (2008). Some historical reflections on the neural control of locomotion. Brain Res Rev *57*, 13–21. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.015.

95. Clarke, L.E., and Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat Rev Neurosci *14*, 311–321. https://doi.org/10.1038/nrn3484.

96. Cleary, C.M., Browning, J.L., Armbruster, M., Sobrinho, C.R., Strain, M.L., Jahanbani, S., Soto-Perez, J., Hawkins, V.E., Dulla, C.G., Olsen, M.L., et al. (2024). Kir4.1 channels contribute to astrocyte CO2/H+-sensitivity and the drive to breathe. Commun Biol *7*, 373. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06065-0.

97. Cohen, S.P., Vase, L., and Hooten, W.M. (2021). Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. The Lancet *397*, 2082–2097. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00393-7.

98. Coles, J.A., and Orkand, R.K. (1983). Modification of potassium movement through the retina of the drone (Apis mellifera male) by glial uptake. J Physiol *340*, 157–174. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014756.

99. Coles, J.A., Orkand, R.K., Yamate, C.L., and Tsacopoulos, M. (1986). Free concentrations of Na, K, and Cl in the retina of the honeybee drone: stimulus-induced redistribution and homeostasis. Ann N Y Acad Sci *481*, 303–317. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb27160.x.

100. Coles, J.A., and Tsacopoulos, M. (1979). Potassium activity in photoreceptors, glial cells and extracellular space in the drone retina: changes during photostimulation. J Physiol *290*, 525–549. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012788.

101. Condamine, S., Lavoie, R., Verdier, D., and Kolta, A. (2018). Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus. Glia *66*, 311–326. https://doi.org/10.1002/glia.23244.

102. Connor, J.R., and Berkowitz, E.M. (1985). A demonstration of glial filament distribution in astrocytes isolated from rat cerebral cortex. Neuroscience *16*, 33–44. https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90044-2.

103. Connors, B.W., Ransom, B.R., Kunis, D.M., and Gutnick, M.J. (1982). Activity-dependent K+ accumulation in the developing rat optic nerve. Science *216*, 1341–1343. https://doi.org/10.1126/science.7079771.

104. Conway, B.A., Hultborn, H., and Kiehn, O. (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. Exp Brain Res *68*, 643–656. https://doi.org/10.1007/BF00249807.

105. Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science *247*, 470–473. https://doi.org/10.1126/science.1967852.

106. Cowley, K.C., and Schmidt, B.J. (1997). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. J Neurophysiol *77*, 247–259. https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.1.247.

107. Crone, C., Johnsen, L.L., Biering-Sørensen, F., and Nielsen, J.B. (2003). Appearance of reciprocal facilitation of ankle extensors from ankle flexors in patients with stroke or spinal cord injury. Brain *126*, 495–507. https://doi.org/10.1093/brain/awg036.

108. Crone, C., Nielsen, J., Petersen, N., Ballegaard, M., and Hultborn, H. (1994). Disynaptic reciprocal inhibition of ankle extensors in spastic patients. Brain *117 (Pt 5)*, 1161–1168. https://doi.org/10.1093/brain/117.5.1161.

109. Crone, S.A., Quinlan, K.A., Zagoraiou, L., Droho, S., Restrepo, C.E., Lundfald, L., Endo, T., Setlak, J., Jessell, T.M., Kiehn, O., et al. (2008). Genetic Ablation of V2a Ipsilateral Interneurons Disrupts Left-Right Locomotor Coordination in Mammalian Spinal Cord. Neuron *60*, 70–83. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.009.

110. Cross, A.H., Gelfand, J.M., Thebault, S., Bennett, J.L., von Büdingen, H.C., Cameron, B., Carruthers, R., Edwards, K., Fallis, R., Gerstein, R., et al. (2024). Emerging Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Disease Activity and Progression in Multiple Sclerosis. JAMA Neurology *81*, 373–383. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2024.0017.

111. Cui, Y., Yang, Y., Ni, Z., Dong, Y., Cai, G., Foncelle, A., Ma, S., Sang, K., Tang, S., Li, Y., et al. (2018). Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. Nature *554*, 323–327. https://doi.org/10.1038/nature25752.

112. Cummins, T.R., Xia, Y., and Haddad, G.G. (1994). Functional properties of rat and human neocortical voltage-sensitive sodium currents. J Neurophysiol *71*, 1052–1064. https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.3.1052.

113. D'Ambrosio, R., Gordon, D.S., and Winn, H.R. (2002). Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. J Neurophysiol *87*, 87–102. https://doi.org/10.1152/jn.00240.2001.

114. D'Amelio, F., Eng, L.F., and Gibbs, M.A. (1990). Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. Glia *3*, 335–341. https://doi.org/10.1002/glia.440030504.

115. da Silva, C.A., Grover, C.J., Picardo, M.C.D., and Del Negro, C.A. (2023). Role of NaV1.6-mediated persistent sodium current and bursting-pacemaker properties in breathing rhythm generation. Cell Rep *42*, 113000. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113000.

116. de Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D.G., Lind, B.L., Carriero, G., Latagliata, E.C., Bindocci, E., Di Castro, M.A., Savtchouk, I., Vitali, I., et al. (2023). Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. Nature *622*, 120–129. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06502-w.

117. de Groat, W.C., and Yoshimura, N. (2006). Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. Prog Brain Res *152*, 59–84. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)52005-3.

118. Deemyad, T., Lüthi, J., and Spruston, N. (2018). Astrocytes integrate and drive action potential firing in inhibitory subnetworks. Nat Commun *9*, 4336. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06338-3.

119. Del Negro, C.A., Koshiya, N., Butera, R.J., and Smith, J.C. (2002). Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-bötzinger complex inspiratory neurons in vitro. J Neurophysiol *88*, 2242–2250. https://doi.org/10.1152/jn.00081.2002.

120. Delivet-Mongrain, H., Leblond, H., and Rossignol, S. (2008). Effects of localized intraspinal injections of a noradrenergic blocker on locomotion of high decerebrate cats. J Neurophysiol *100*, 907–921. https://doi.org/10.1152/jn.90454.2008.

121. Derouiche, A., and Frotscher, M. (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. Brain Res *552*, 346–350. https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90103-3.

122. Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca2+ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. Nat Neurosci *14*, 1276–1284. https://doi.org/10.1038/nn.2929.

123. Diaz-Castro, B., Bernstein, A.M., Coppola, G., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2021). Molecular and functional properties of cortical astrocytes during peripherally induced neuroinflammation. Cell Reports *36*, 109508. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109508.

124. Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., and Lux, H.D. (1980). Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. Exp Brain Res *40*, 432–439. https://doi.org/10.1007/BF00236151.

125. Dietzel, I., Heinemann, U., and Lux, H.D. (1989). Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. Glia *2*, 25–44. https://doi.org/10.1002/glia.440020104.

126. Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S., and McCarthy, K.D. (2007). Conditional Knock-Out of Kir4.1 Leads to Glial Membrane Depolarization, Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake, and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation. Journal of Neuroscience *27*, 11354–11365. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0723-07.2007.

127. Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., and Geczy, C.L. (2013). Functions of S100 proteins. Curr Mol Med *13*, 24–57.

128. Dougherty, K.J., and Kiehn, O. (2010). Functional organization of V2a-related locomotor circuits in the rodent spinal cord. Annals of the New York Academy of Sciences *1198*, 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05502.x.

129. Dougherty, K.J., Zagoraiou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., Jessell, T.M., and Kiehn, O. (2013). Locomotor Rhythm Generation Linked to the Output of Spinal Shox2 Excitatory Interneurons. Neuron *80*, 920–933. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.015.

130. Doupnik, C.A., Davidson, N., and Lester, H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. Current Opinion in Neurobiology *5*, 268–277. https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80038-7.

131. Drouillas, B., Brocard, C., Zanella, S., Bos, R., and Brocard, F. (2023). Persistent Nav1.1 and Nav1.6 currents drive spinal locomotor functions through nonlinear dynamics. Cell Rep *42*, 113085. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113085.

132. Du, Y., Kiyoshi, C.M., Wang, Q., Wang, W., Ma, B., Alford, C.C., Zhong, S., Wan, Q., Chen, H., Lloyd, E.E., et al. (2016). Genetic Deletion of TREK-1 or TWIK-1/TREK-1 Potassium Channels does not Alter the Basic Electrophysiological Properties of Mature Hippocampal Astrocytes In Situ. Front Cell Neurosci *10*, 13. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00013.

133. Dubuc, R., Brocard, F., Antri, M., Fénelon, K., Gariépy, J.-F., Smetana, R., Ménard, A., Le Ray, D., Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., et al. (2008). Initiation of locomotion in lampreys. Brain Res Rev *57*, 172–182. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.016.

134. Eide, A.L., Glover, J., Kjaerulff, O., and Kiehn, O. (1999). Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord. J Comp Neurol *403*, 332–345.

135. Elbasiouny, S.M., Moroz, D., Bakr, M.M., and Mushahwar, V.K. (2010). Management of spasticity after spinal cord injury: current techniques and future directions. Neurorehabil Neural Repair *24*, 23–33. https://doi.org/10.1177/1545968309343213.

136. Elliott, S.L. (2006). Problems of sexual function after spinal cord injury. Prog Brain Res *152*, 387–399. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)52026-0.

137. Endo, F., Kasai, A., Soto, J.S., Yu, X., Qu, Z., Hashimoto, H., Gradinaru, V., Kawaguchi, R., and Khakh, B.S. (2022). Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. Science *378*, eadc9020. https://doi.org/10.1126/science.adc9020.

138. Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res *28*, 351–354. https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90668-8.

139. Erulkar, S.D., and Weight, F.F. (1977). Extracellular potassium and trasmitter release at the giant synapse of squid. J Physiol *266*, 209–218. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011764.

140. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J.P., Petzold, G.C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., et al. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci *24*, 312–325. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4.

141. Feldman, J.L., and Grillner, S. (1983). Control of vertebrate respiration and locomotion: a brief account. Physiologist *26*, 310–316.

142. Fiacco, T.A., Agulhon, C., Taves, S.R., Petravicz, J., Casper, K.B., Dong, X., Chen, J., and McCarthy, K.D. (2007). Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. Neuron *54*, 611–626. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.032.

143. Finnerup, N.B., Johannesen, I.L., Fuglsang-Frederiksen, A., Bach, F.W., and Jensen, T.S. (2003). Sensory function in spinal cord injury patients with and without central pain. Brain *126*, 57–70. https://doi.org/10.1093/brain/awg007.

144. Finnerup, N.B., Haroutounian, S., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpaa, M., Jensen, T.S., Kamerman, P.R., McNicol, E., Moore, A., et al. (2018). Neuropathic pain clinical trials: factors associated with decreases in estimated drug efficacy. Pain *159*, 2339–2346. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001340.

145. Floeter, M.K., and Lev-Tov, A. (1993). Excitation of lumbar motoneurons by the medial longitudinal fasciculus in the in vitro brain stem spinal cord preparation of the neonatal rat. J Neurophysiol *70*, 2241–2250. https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.6.2241.

146. Foo, L.C., and Dougherty, J.D. (2013). Aldh1L1 is expressed by postnatal neural stem cells in vivo. Glia *61*, 1533–1541. https://doi.org/10.1002/glia.22539.

147. Förstl, J., Galvan, M., and ten Bruggencate, G. (1982). Extracellular K+ concentration during electrical stimulation of rat isolated sympathetic ganglia, vagus and optic nerves. Neuroscience *7*, 3221–3229. https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90244-5.

148. Freeman, M.R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. Science *330*, 774–778. https://doi.org/10.1126/science.1190928.

149. Galvan, M., Ten Bruggencate, G., and Senekowitsch, R. (1979). The effects of neuronal stimulation and ouabain upon extracellular K+ and Ca2+ levels in rat isolated sympathetic ganglia. Brain Research *160*, 544–548. https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)91084-9.

150. García-López, P., García-Marín, V., and Freire, M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. Prog Neurobiol *83*, 110–130. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.002.

151. Gardner-Medwin, A.R. (1981). The Role of Cells in the Dispersal of Brain Extracellular Potassium. In Ion-Selective Microelectrodes and Their Use in Excitable Tissues, E. Syková, P. Hník, and L. Vyklický, eds. (Springer US), pp. 339–343. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9224-2_40.

152. Gardner-Medwin, A.R., and Nicholson, C. (1983). Changes of extracellular potassium activity induced by electric current through brain tissue in the rat. J Physiol *335*, 375–392. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014540.

153. Giannaki, M., Schrödl-Häußel, M., Khakipoor, S., Kirsch, M., and Roussa, E. (2021). STAT3-dependent regulation of the electrogenic Na+/HCO3− cotransporter 1 (NBCe1) functional expression in cortical astrocytes. Journal of Cellular Physiology *236*, 2036–2050. https://doi.org/10.1002/jcp.29990.

154. Gillard, P.J., Sucharew, H., Kleindorfer, D., Belagaje, S., Varon, S., Alwell, K., Moomaw, C.J., Woo, D., Khatri, P., Flaherty, M.L., et al. (2015). The negative impact of spasticity on the health-related quality of life of stroke survivors: a longitudinal cohort study. Health Qual Life Outcomes *13*, 159. https://doi.org/10.1186/s12955-015-0340-3.

155. Giovannoni, F., and Quintana, F.J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. Trends Immunol *41*, 805–819. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007.

156. Golestani, A., Shobeiri, P., Sadeghi-Naini, M., Jazayeri, S.B., Maroufi, S.F., Ghodsi, Z., Dabbagh Ohadi, M.A., Mohammadi, E., Rahimi-Movaghar, V., and Ghodsi, S.M. (2022). Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Developing Countries from 2009 to 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. Neuroepidemiology *56*, 219–239. https://doi.org/10.1159/000524867.

157. Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. Nature *425*, 917–925. https://doi.org/10.1038/nature02033.

158. González-Arias, C., Sánchez-Ruiz, A., Esparza, J., Sánchez-Puelles, C., Arancibia, L., Ramírez-Franco, J., Gobbo, D., Kirchhoff, F., and Perea, G. (2023). Dysfunctional serotonergic neuron-astrocyte signaling in depressive-like states. Mol Psychiatry *28*, 3856–3873. https://doi.org/10.1038/s41380-023-02269-8.

159. Gorassini, M.A., Knash, M.E., Harvey, P.J., Bennett, D.J., and Yang, J.F. (2004). Role of motoneurons in the generation of muscle spasms after spinal cord injury. Brain *127*, 2247–2258. https://doi.org/10.1093/brain/awh243.

160. Gosgnach, S., Lanuza, G.M., Butt, S.J.B., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E.M., Kiehn, O., and Goulding, M. (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. Nature *440*, 215–219. https://doi.org/10.1038/nature04545.

161. Goulding, M., Lanuza, G., Sapir, T., and Narayan, S. (2002). The formation of sensorimotor circuits. Curr Opin Neurobiol *12*, 508–515. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00371-9.

162. Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes Control Breathing Through pH-dependent Release of ATP. Science *329*, 571–575. https://doi.org/10.1126/science.1190721.

163. Grillner, S., Cangiano, L., Hu, G.-Y., Thompson, R., Hill, R., and Wallén, P. (2000). The intrinsic function of a motor system — from ion channels to networks and behavior1. Brain Research *886*, 224–236. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03088-2.

164. Grillner, S., Hongo, T., and Lundberg, A. (1967). The effect of DOPA on the spinal cord. 7. Reflex activation of static gamma-motoneurones from the flexor reflex afferents. Acta Physiol Scand *70*, 403–411. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1967.tb03638.x.

165. Grillner, S., and El Manira, A. (2020). Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion. Physiol Rev *100*, 271–320. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2019.

166. Grillner, S., and Wallén, P. (1984). How Does The Lamprey Central Nervous System Make The Lamprey Swim? Journal of Experimental Biology *112*, 337–357. https://doi.org/10.1242/jeb.112.1.337.

167. Grillner, S., and Wallén, P. (2002). Cellular bases of a vertebrate locomotor system – steering, intersegmental and segmental co-ordination and sensory control. Brain Research Reviews *40*, 92–106. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00193-5.

168. Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., and Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. Nat Neurosci *2*, 139–143. https://doi.org/10.1038/5692.

169. Guillemaud, O., Ceyzériat, K., Saint-Georges, T., Cambon, K., Petit, F., Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Guillermier, M., Bernier, S., Hérard, A.-S., et al. (2020). Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol Aging *90*, 135–146. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.010.

170. Gutnick, M.J., Heinemann, U., and Lux, H.D. (1979). Stimulus induced and seizure related changes in extracellular potassium concentration in cat thalamus (VPL). Electroencephalogr Clin Neurophysiol *47*, 329–344. https://doi.org/10.1016/0013-4694(79)90284-0.

171. Guttenplan, K.A., Stafford, B.K., El-Danaf, R.N., Adler, D.I., Münch, A.E., Weigel, M.K., Huberman, A.D., and Liddelow, S.A. (2020). Neurotoxic reactive astrocytes drive neuronal death following retinal injury. Cell Rep *31*, 107776. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107776.

172. Haim, L.B., Schirmer, L., Zulji, A., Sabeur, K., Tiret, B., Ribon, M., Chang, S., Lamers, W.H., BoillEée, S., Chaumeil, M.M., et al. (2021). Evidence for glutamine synthetase function in mouse spinal cord oligodendrocytes. Glia *69*, 2812–2827. https://doi.org/10.1002/glia.24071.

173. Haj-Yasein, N.N., Vindedal, G.F., Eilert-Olsen, M., Gundersen, G.A., Skare, Ø., Laake, P., Klungland, A., Thorén, A.E., Burkhardt, J.M., Ottersen, O.P., et al. (2011). Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 17815–17820. https://doi.org/10.1073/pnas.1110655108.

174. Hajek, I., Subbarao, K.V., and Hertz, L. (1996). Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na+, K+-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. Neurochem Int *28*, 335–342. https://doi.org/10.1016/0197-0186(95)00081-x.

175. Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.-Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. Neuron *61*, 213–219. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.024.

176. Halassa, M.M., and Haydon, P.G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. Annu Rev Physiol *72*, 335–355. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843.

177. Harris-Warrick, R. (2013). Locomotor Pattern Generation in the Rodent Spinal Cord. In Encyclopedia of Computational Neuroscience, D. Jaeger and R. Jung, eds. (Springer), pp. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6_48-1.

178. Harris-Warrick, R.M., Pecchi, E., Drouillas, B., Brocard, F., and Bos, R. (2023). A size principle for bistability in mouse spinal motoneurons. bioRxiv, 2023.09.29.559784. https://doi.org/10.1101/2023.09.29.559784.

179. Haustein, M.D., Kracun, S., Lu, X.-H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., Xu, J., Yang, X.W., O'Dell, T.J., Marvin, J.S., et al. (2014). Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. Neuron *82*, 413–429. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.041.

180. Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis *28*, 154–164. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.003.

181. Heinemann, S.H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. Nature *356*, 441–443. https://doi.org/10.1038/356441a0.

182. Heinemann, U., and Lux, H.D. (1975). Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. Brain Res *93*, 63–76. https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90286-3.

183. Heinemann, U., and Lux, H.D. (1977). Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. Brain Res *120*, 231–249. https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90903-9.

184. Heinemann, U., Schaible, H.G., and Schmidt, R.F. (1990). Changes in extracellular potassium concentration in cat spinal cord in response to innocuous and noxious stimulation of legs with healthy and inflamed knee joints. Exp Brain Res *79*, 283–292. https://doi.org/10.1007/BF00608237.

185. Henke, A.M., Billington, Z.J., and Gater, D.R. (2022). Autonomic Dysfunction and Management after Spinal Cord Injury: A Narrative Review. J Pers Med *12*, 1110. https://doi.org/10.3390/jpm12071110.

186. Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature *463*, 232–236. https://doi.org/10.1038/nature08673.

187. Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. Glia *62*, 1377–1391. https://doi.org/10.1002/glia.22683.

188. Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. J Neurosci *28*, 7231–7243. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008.

189. Hertz, L. (1965). Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. Nature *206*, 1091–1094. https://doi.org/10.1038/2061091a0.

190. Hertz, L. (1986). Potassium transport in astrocytes and neurons in primary cultures. Ann N Y Acad Sci *481*, 318–333. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb27161.x.

191. Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., and Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. Am J Physiol Cell Physiol *281*, C922-931. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.C922.

192. Hinckley, C.A., Hartley, R., Wu, L., Todd, A., and Ziskind-Conhaim, L. (2005). Locomotor-like rhythms in a genetically distinct cluster of interneurons in the mammalian spinal cord. J Neurophysiol *93*, 1439–1449. https://doi.org/10.1152/jn.00647.2004.

193. Hinckley, C.A., and Ziskind-Conhaim, L. (2006). Electrical coupling between locomotor-related excitatory interneurons in the mammalian spinal cord. J Neurosci *26*, 8477–8483. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0395-06.2006.

194. Hochman, D.W., D'Ambrosio, R., Janigro, D., and Schwartzkroin, P.A. (1999). Extracellular chloride and the maintenance of spontaneous epileptiform activity in rat hippocampal slices. J Neurophysiol *81*, 49–59. https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.1.49.

195. Holmes, G.M., and Blanke, E.N. (2019). Gastrointestinal dysfunction after spinal cord injury. Experimental Neurology *320*, 113009. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113009.

196. Holthoff, K., and Witte, O.W. (1996). Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. J Neurosci *16*, 2740–2749. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02740.1996.

197. Hubbard, J.M., Böhm, U.L., Prendergast, A., Tseng, P.-E.B., Newman, M., Stokes, C., and Wyart, C. (2016). Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. Curr Biol *26*, 2841–2853. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.026.

198. Hultborn, H., Jankowska, E., Lindström, S., and Roberts, W. (1971). Neuronal pathway of the recurrent facilitation of motoneurones. J Physiol *218*, 495–514. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009630.

199. Jack, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., and Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol *9*, 119–128. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70299-6.

200. Jaisa-Aad, M., Muñoz-Castro, C., and Serrano-Pozo, A. (2024). Update on modifiable risk factors for Alzheimer's disease and related dementias. Curr Opin Neurol *37*, 166–181. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001243.

201. Jankowska, E., Jukes, M.G., Lund, S., and Lundberg, A. (1967). The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurones of flexors and extensors. Acta Physiol Scand *70*, 369–388. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1967.tb03636.x.

202. Jankowska, E., Jukes, M.G., Lund, S., and Lundberg, A. (1967). The effect of DOPA on the spinal cord. 6. Half-centre organization of interneurones transmitting effects from the flexor reflex afferents. Acta Physiol Scand *70*, 389–402. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1967.tb03637.x.

203. Jankowska, E. (2008). Spinal interneuronal networks in the cat; elementary components. Brain Res Rev *57*, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.022.

204. Järlestedt, K., Rousset, C.I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Ståhlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., and Pekny, M. (2010). Attenuation of Reactive Gliosis Does Not Affect Infarct Volume in

Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Mice. PLoS One *5*, e10397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010397.

205. Jean-Xavier, C., Mentis, G.Z., O'Donovan, M.J., Cattaert, D., and Vinay, L. (2007). Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 11477–11482. https://doi.org/10.1073/pnas.0704832104.

206. Jiang, R., Diaz-Castro, B., Looger, L.L., and Khakh, B.S. (2016). Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. Journal of Neuroscience *36*, 3453–3470. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3693-15.2016.

207. Kadala, A., Verdier, D., Morquette, P., and Kolta, A. (2015). Ion Homeostasis in Rhythmogenesis: The Interplay Between Neurons and Astroglia. Physiology (Bethesda) *30*, 371–388. https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2014.

208. Kanemaru, K., Sekiya, H., Xu, M., Satoh, K., Kitajima, N., Yoshida, K., Okubo, Y., Sasaki, T., Moritoh, S., Hasuwa, H., et al. (2014). In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. Cell Rep *8*, 311–318. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.056.

209. Kapell, H., Fazio, L., Dyckow, J., Schwarz, S., Cruz-Herranz, A., Mayer, C., Campos, J., D'Este, E., Möbius, W., Cordano, C., et al. (2023). Neuron-oligodendrocyte potassium shuttling at nodes of Ranvier protects against inflammatory demyelination. J Clin Invest *133*, e164223. https://doi.org/10.1172/JCI164223.

210. Karwoski, C.J., Lu, H.-K., and Newman, E.A. (1989). Spatial Buffering of Light-Evoked Potassium Increases by Retinal Müller (Glial) Cells. Science *244*, 578–580.

211. Katzman, R. (1976). Maintenance of a constant brain extracellular potassium. Fed Proc *35*, 1244–1247.

212. Kaur, C., Sivakumar, V., and Foulds, W.S. (2006). Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci *47*, 1126–1141. https://doi.org/10.1167/iovs.05-0518.

213. Kelley, K.W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G.E., Tolman, M., Miller, J.G., Tsai, H.-H., Chang, S.M., Molofsky, A.V., Yang, Y., et al. (2018). Kir4.1-Dependent Astrocyte-Fast Motor Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. Neuron *98*, 306-319.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.010.

214. Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat Neurosci *18*, 942–952. https://doi.org/10.1038/nn.4043.

215. Kiehn, O., Johnson, B.R., and Raastad, M. (1996). Plateau properties in mammalian spinal interneurons during transmitter-induced locomotor activity. Neuroscience *75*, 263–273. https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00250-3.

216. Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. Annu Rev Neurosci *29*, 279–306. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910.

217. Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. Nat Rev Neurosci *17*, 224–238. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.9.

218. Kimelberg, H.K. (2004). The problem of astrocyte identity. Neurochemistry International *45*, 191–202. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015.

219. Kinboshi, M., Ikeda, A., and Ohno, Y. (2020). Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. Front. Neurol. *11*. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658.

220. Kjaerulff, O., Barajon, I., and Kiehn, O. (1994). Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity in vitro. J Physiol *478 (Pt 2)*, 265–273. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020248.

221. Klusman, I., and Schwab, M.E. (1997). Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. Brain Res *762*, 173–184. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00381-8.

222. Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R.W., Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2002). Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. Glia *39*, 292–303. https://doi.org/10.1002/glia.10112.

223. Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., and Newman, E.A. (2000). Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. J. Neurosci. *20*, 5733–5740. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-15-05733.2000.

224. Kogika, M.M., and de Morais, H.A. (2017). A Quick Reference on Hyperkalemia. Vet Clin North Am Small Anim Pract *47*, 223–228. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.10.009.

225. Kreuter, M., Taft, C., Siösteen, A., and Biering-Sørensen, F. (2011). Women's sexual functioning and sex life after spinal cord injury. Spinal Cord *49*, 154–160. https://doi.org/10.1038/sc.2010.51.

226. Kronschläger, M.T., Siegert, A.S.M., Resch, F.J., Rajendran, P.S., Khakh, B.S., and Sandkühler, J. (2021). Lamina-specific properties of spinal astrocytes. Glia *69*, 1749–1766. https://doi.org/10.1002/glia.23990.

227. Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., and Vandenberg, C.A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. Pharmacol Rev *57*, 509–526. https://doi.org/10.1124/pr.57.4.11.

228. Kucheryavykh, Y.V., Kucheryavykh, L.Y., Nichols, C.G., Maldonado, H.M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S.N., and Eaton, M.J. (2007). Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. Glia *55*, 274–281. https://doi.org/10.1002/glia.20455.

229. Kuchibhotla, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2009). Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. Science *323*, 1211–1215. https://doi.org/10.1126/science.1169096.

230. Kudo, N., and 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. https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90072-3.

231. Kuffler, S.W. (1967). Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. Proc R Soc Lond B Biol Sci *168*, 1–21. https://doi.org/10.1098/rspb.1967.0047.

232. Kurek, J.B., Bennett, T.M., Bower, J.J., Muldoon, C.M., and Austin, L. (1998). Leukaemia inhibitory factor (LIF) production in a mouse model of spinal trauma. Neuroscience Letters *249*, 1–4. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00360-7.

233. Kurki, S.N., Uvarov, P., Pospelov, A.S., Trontti, K., Hübner, A.K., Srinivasan, R., Watanabe, M., Hovatta, I., Hübner, C.A., Kaila, K., et al. (2023). Expression patterns of NKCC1 in neurons and non-neuronal cells during cortico-hippocampal development. Cereb Cortex *33*, 5906–5923. https://doi.org/10.1093/cercor/bhac470.

234. Lance, J.W. (1980). The control of muscle tone, reflexes, and movement. Neurology *30*, 1303–1303. https://doi.org/10.1212/WNL.30.12.1303.

235. Lanuza, G.M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T.M., and Goulding, M. (2004). Genetic Identification of Spinal Interneurons that Coordinate Left-Right Locomotor Activity Necessary for Walking Movements. Neuron *42*, 375–386. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00249-1.

236. Larsen, B.R., Assentoft, M., Cotrina, M.L., Hua, S.Z., Nedergaard, M., Kaila, K., Voipio, J., and MacAulay, N. (2014). Contributions of the Na+/K+-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K+ clearance and volume responses. Glia *62*, 608–622. https://doi.org/10.1002/glia.22629.

237. Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.L., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Kinet, J.P. (2002). TRPM4 is a Ca2+-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. Cell *109*, 397–407. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00719-5.

238. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrandy, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., and Melki, J. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat Genet *16*, 265–269. https://doi.org/10.1038/ng0797-265.

239. Leroy, F., Lamotte d'Incamps, B., Imhoff-Manuel, R.D., and Zytnicki, D. (2014). Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Elife *3*, e04046. https://doi.org/10.7554/eLife.04046.

240. Li, Y., Lucas-Osma, A.M., Black, S., Bandet, M.V., Stephens, M.J., Vavrek, R., Sanelli, L., Fenrich, K.K., Di Narzo, A.F., Dracheva, S., et al. (2017). Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury. Nat Med *23*, 733–741. https://doi.org/10.1038/nm.4331.

241. Li, Z., and Hatton, G.I. (1996). Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca2+ medium: Na+ influx, cytosolic Ca2+ and gap junctions. J Physiol *496 (Pt 2)*, 379–394. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021692.

242. Li, Z., and Hatton, G.I. (2000). Histamine Suppresses Non-NMDA Excitatory Synaptic Currents in Rat Supraoptic Nucleus Neurons. Journal of Neurophysiology *83*, 2616–2625. https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.2616.

243. Lia, A., Sansevero, G., Chiavegato, A., Sbrissa, M., Pendin, D., Mariotti, L., Pozzan, T., Berardi, N., Carmignoto, G., Fasolato, C., et al. (2023). Rescue of astrocyte activity by the calcium sensor STIM1 restores long-term synaptic plasticity in female mice modelling Alzheimer's disease. Nat Commun *14*, 1590. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37240-2.

244. Liddell, E.G.T., and Sherrington, C.S. (1997). Recruitment and some other features of reflex inhibition. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character *97*, 488–518. https://doi.org/10.1098/rspb.1925.0016.

245. Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature *541*, 481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029.

246. Liedtke, W., Edelmann, W., Chiu, F.C., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1998). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. Am J Pathol *152*, 251–259.

247. Linnerbauer, M., Wheeler, M.A., and Quintana, F.J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. Neuron *108*, 608–622. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012.

248. Liu, Q., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., and Nedergaard, M. (2004). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 3172–3177. https://doi.org/10.1073/pnas.0306731101.

249. Liu, Y., Hong, W., Gong, P., Qi, G., Wang, X., Kang, S., Tang, H., and Qin, S. Specific knockout of Sox2 in astrocytes reduces reactive astrocyte formation and promotes recovery after early postnatal traumatic brain injury in mouse cortex. Glia *n/a*. https://doi.org/10.1002/glia.24298.

250. Looser, Z.J., Faik, Z., Ravotto, L., Zanker, H.S., Jung, R.B., Werner, H.B., Ruhwedel, T., Möbius, W., Bergles, D.E., Barros, L.F., et al. (2024). Oligodendrocyte–axon metabolic coupling is mediated by extracellular K+ and maintains axonal health. Nat Neurosci *27*, 433–448. https://doi.org/10.1038/s41593-023-01558-3.

251. Lorier, A.R., Huxtable, A.G., Robinson, D.M., Lipski, J., Housley, G.D., and Funk, G.D. (2007). P2Y1 receptor modulation of the pre-Bötzinger complex inspiratory rhythm generating network in vitro. J Neurosci *27*, 993–1005. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3948-06.2007.

252. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., and Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 6307–6311. https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307.

253. Ludwin, S.K., Kosek, J.C., and Eng, L.F. (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. Journal of Comparative Neurology *165*, 197–207. https://doi.org/10.1002/cne.901650206.

254. Ludwin, S.K., Rao, V.T., Moore, C.S., and Antel, J.P. (2016). Astrocytes in multiple sclerosis. Mult Scler *22*, 1114–1124. https://doi.org/10.1177/1352458516643396.

255. Lundfald, L., Restrepo, C.E., Butt, S.J.B., Peng, C.-Y., Droho, S., Endo, T., Zeilhofer, H.U., Sharma, K., and Kiehn, O. (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. Eur J Neurosci *26*, 2989–3002. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05906.x.

256. Lunn, M.R., and Wang, C.H. (2008). Spinal muscular atrophy. Lancet *371*, 2120–2133. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6.

257. Lynch, A.C., Antony, A., Dobbs, B.R., and Frizelle, F.A. (2001). Bowel dysfunction following spinal cord injury. Spinal Cord *39*, 193–203. https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101119.

258. Lyon, K.A., and Allen, N.J. (2021). From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior. Front Neural Circuits *15*, 786293. https://doi.org/10.3389/fncir.2021.786293.

259. Ma, B., Xu, G., Wang, W., Enyeart, J.J., and Zhou, M. (2014). Dual patch voltage clamp study of low membrane resistance astrocytes in situ. Mol Brain *7*, 18. https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-18.

260. MacVicar, B.A., Feighan, D., Brown, A., and Ransom, B. (2002). Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: role for K(+) uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes. Glia *37*, 114–123. https://doi.org/10.1002/glia.10023.

261. Manuel, M., and Zytnicki, D. (2011). ALPHA, BETA AND GAMMA MOTONEURONS: FUNCTIONAL DIVERSITY IN THE MOTOR SYSTEM'S FINAL PATHWAY. J. Integr. Neurosci. *10*, 243–276. https://doi.org/10.1142/S0219635211002786.

262. Marcantoni, M., Fuchs, A., Löw, P., Bartsch, D., Kiehn, O., and Bellardita, C. (2020). Early delivery and prolonged treatment with nimodipine prevents the development of spasticity after spinal cord injury in mice. Sci Transl Med *12*, eaay0167. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0167.

263. Marchetti, C., Beato, M., and Nistri, A. (2001). Evidence for increased extracellular K(+) as an important mechanism for dorsal root induced alternating rhythmic activity in the neonatal rat spinal cord in vitro. Neurosci Lett *304*, 77–80. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01777-3.

264. Marder, E., and Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. Curr Biol *11*, R986-996. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00581-4.

265. Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V.N., Mathis, M.W., and Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. Nat Neurosci *21*, 1281–1289. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y.

266. Mathis, S., Beauvais, D., Duval, F., Solé, G., and Le Masson, G. (2024). The various forms of hereditary motor neuron disorders and their historical descriptions. J Neurol *271*, 3978–3990. https://doi.org/10.1007/s00415-024-12462-6.

267. Mayo, L., Trauger, S.A., Blain, M., Nadeau, M., Patel, B., Alvarez, J.I., Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Kivisäkk, P., Kallas, K., et al. (2014). Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. Nat Med *20*, 1147–1156. https://doi.org/10.1038/nm.3681.

268. McClenahan, S.J., Kent, C.N., Kharade, S.V., Isaeva, E., Williams, J.C., Han, C., Terker, A., Gresham, R., Lazarenko, R.M., Days, E.L., et al. (2022). VU6036720: The First Potent and Selective In Vitro Inhibitor of Heteromeric Kir4.1/5.1 Inward Rectifier Potassium Channels. Mol Pharmacol *101*, 357–370. https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000464.

269. McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., and Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. J Neurosci *11*, 3398–3411. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-11-03398.1991.

270. Mcphedran, A.M., Wuerker, R.B., and Henneman, E. (1965). PROPERTIES OF MOTOR UNITS IN A HOMOGENEOUS RED MUSCLE (SOLEUS) OF THE CAT. J Neurophysiol *28*, 71–84. https://doi.org/10.1152/jn.1965.28.1.71.

271. Meeks, J.P., and Mennerick, S. (2007). Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. J Neurophysiol *97*, 3460–3472. https://doi.org/10.1152/jn.01288.2006.

272. Menet, V., Prieto, M., Privat, A., and Giménez y Ribotta, M. (2003). Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 8999–9004. https://doi.org/10.1073/pnas.1533187100.

273. Mishima, T., and Hirase, H. (2010). In vivo intracellular recording suggests that gray matter astrocytes in mature cerebral cortex and hippocampus are electrophysiologically homogeneous. J Neurosci *30*, 3093–3100. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5065-09.2010.

274. Miyake, T., and Kitamura, T. (1992). Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells. Brain Research *586*, 53–60. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91370-T.

275. Molofsky, A.V., and Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. Glia *63*, 1320–1329. https://doi.org/10.1002/glia.22836.

276. Montalant, A., Kiehn, O., and Perrier, J.-F. (2024). Dopamine and noradrenaline activate spinal astrocyte endfeet via D1-like receptors. Eur J Neurosci *59*, 1278–1295. https://doi.org/10.1111/ejn.16205.

277. Montford, J.R., and Linas, S. (2017). How Dangerous Is Hyperkalemia? J Am Soc Nephrol *28*, 3155–3165. https://doi.org/10.1681/ASN.2016121344.

278. Mori, S., Matsui, T., Kuze, B., Asanome, M., Nakajima, K., and Matsuyama, K. (1998). Cerebellar-induced locomotion: reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanism in cats. Ann N Y Acad Sci *860*, 94–105. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09041.x.

279. Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Féthière, J., Philippe, A.G., Robitaille, R., and Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. Nat Neurosci *18*, 844–854. https://doi.org/10.1038/nn.4013.

280. Mu, Y., Bennett, D.V., Rubinov, M., Narayan, S., Yang, C.-T., Tanimoto, M., Mensh, B.D., Looger, L.L., and Ahrens, M.B. (2019). Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. Cell *178*, 27-43.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.050.

281. Muir, G.D., and Whishaw, I.Q. (1999). Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. Behav Brain Res *103*, 45–53. https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00018-2.

282. Mukherjee, A., and Chakravarty, A. (2010). Spasticity mechanisms - for the clinician. Front Neurol *1*, 149. https://doi.org/10.3389/fneur.2010.00149.

283. Nascimento, F., Broadhead, M.J., Tetringa, E., Tsape, E., Zagoraiou, L., and Miles, G.B. (2020). Synaptic mechanisms underlying modulation of locomotor-related motoneuron output by premotor cholinergic interneurons. eLife *9*, e54170. https://doi.org/10.7554/eLife.54170.

284. Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. Neuron *57*, 883–893. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.029.

285. Navarrete, M., and Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. Neuron *68*, 113–126. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.043.

286. Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., and Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. PLoS Biol *10*, e1001259. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259.

287. Neusch, C., Papadopoulos, N., Müller, M., Maletzki, I., Winter, S.M., Hirrlinger, J., Handschuh, M., Bähr, M., Richter, D.W., Kirchhoff, F., et al. (2006). Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K+ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K+ regulation. J Neurophysiol *95*, 1843–1852. https://doi.org/10.1152/jn.00996.2005.

288. Newman, E.A. (1993). Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. J Neurosci *13*, 3333–3345. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03333.1993.

289. Newman, E.A. (1986). High Potassium Conductance in Astrocyte Endfeet. Science *233*, 453–454.

290. Nichols, C.G., and Lopatin, A.N. (1997). INWARD RECTIFIER POTASSIUM CHANNELS. Annual Review of Physiology *59*, 171–191. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.171.

291. Nielsen, J., Petersen, N., Ballegaard, M., Biering-Sørensen, F., and Kiehn, O. (1993). H-reflexes are less depressed following muscle stretch in spastic spinal cord injured patients than in healthy subjects. Exp Brain Res *97*, 173–176. https://doi.org/10.1007/BF00228827.

292. Nishimaru, H., Restrepo, C.E., and Kiehn, O. (2006). Activity of Renshaw cells during locomotor-like rhythmic activity in the isolated spinal cord of neonatal mice. J Neurosci *26*, 5320–5328. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5127-05.2006.

293. Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., and Itohara, S. (2002). Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 4037–4042. https://doi.org/10.1073/pnas.052020999.

294. Noga, B., Kettler, J., and Jordan, L. (1988). Locomotion produced in mesencephalic cats by injections of putative transmitter substances and antagonists into the medial reticular formation and the pontomedullary locomotor strip. J Neurosci *8*, 2074–2086. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-06-02074.1988.

295. Noga, B.R., Turkson, R.P., Xie, S., Taberner, A., Pinzon, A., and Hentall, I.D. (2017). Monoamine Release in the Cat Lumbar Spinal Cord during Fictive Locomotion Evoked by the Mesencephalic Locomotor Region. Front Neural Circuits *11*, 59. https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00059.

296. Norenberg, M.D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. Brain Research *161*, 303–310. https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4.

297. Novakovic, M.M., Korshunov, K.S., Grant, R.A., Martin, M.E., Valencia, H.A., Budinger, G.R.S., Radulovic, J., and Prakriya, M. (2023). Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orai1 calcium channels. Nat Commun *14*, 5500. https://doi.org/10.1038/s41467-023-40968-6.

298. Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol *814*, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3.

299. Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. Trends Neurosci *29*, 547–553. https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004.

300. Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. Neuroscience *113*, 221–233. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00041-6.

301. Ohno, Y., Hibino, H., Lossin, C., Inanobe, A., and Kurachi, Y. (2007). Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin reuptake inhibitors. Brain Research *1178*, 44–51. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.018.

302. Ollivier, M., Soto, J.S., Linker, K.E., Moye, S.L., Jami-Alahmadi, Y., Jones, A.E., Divakaruni, A.S., Kawaguchi, R., Wohlschlegel, J.A., and Khakh, B.S. (2024). Crym-positive striatal astrocytes gate perseverative behaviour. Nature *627*, 358–366. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07138-0.

303. Olsen, M.L., Campbell, S.C., McFerrin, M.B., Floyd, C.L., and Sontheimer, H. (2010). Spinal cord injury causes a wide-spread, persistent loss of Kir4.1 and glutamate transporter 1: benefit of 17 -oestradiol treatment. Brain *133*, 1013–1025. https://doi.org/10.1093/brain/awq049.

304. Olsen, M.L., Campbell, S.L., and Sontheimer, H. (2007). Differential Distribution of Kir4.1 in Spinal Cord Astrocytes Suggests Regional Differences in K^+ Homeostasis. Journal of Neurophysiology *98*, 786–793. https://doi.org/10.1152/jn.00340.2007.

305. Olsen, M.L., Higashimori, H., Campbell, S.L., Hablitz, J.J., and Sontheimer, H. (2006). Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. Glia *53*, 516–528. https://doi.org/10.1002/glia.20312.

306. Onimaru, H., Arata, A., and Homma, I. (1995). Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. Exp Brain Res *106*, 57–68. https://doi.org/10.1007/BF00241356.

307. Oppermann, M., Mizel, D., Kim, S.M., Chen, L., Faulhaber-Walter, R., Huang, Y., Li, C., Deng, C., Briggs, J., Schnermann, J., et al. (2007). Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter. J Am Soc Nephrol *18*, 440–448. https://doi.org/10.1681/ASN.2006091070.

308. Oram, R.A., McDonald, T.J., and Vaidya, B. (2013). Investigating hypokalaemia. BMJ *347*, f5137. https://doi.org/10.1136/bmj.f5137.

309. Orkand, R.K., Nicholls, J.G., and Kuffler, S.W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. J Neurophysiol *29*, 788–806. https://doi.org/10.1152/jn.1966.29.4.788.

310. Osborn, L.M., Kamphuis, W., Wadman, W.J., and Hol, E.M. (2016). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Prog Neurobiol *144*, 121–141. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001.

311. Pace, R.W., Mackay, D.D., Feldman, J.L., and Del Negro, C.A. (2007). Role of persistent sodium current in mouse preBötzinger Complex neurons and respiratory rhythm generation. J Physiol *580*, 485–496. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124602.

312. Palmer, B.F. (2015). Regulation of Potassium Homeostasis. Clin J Am Soc Nephrol *10*, 1050–1060. https://doi.org/10.2215/CJN.08580813.

313. Panatier, A., and Robitaille, R. (2016). Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. Neuroscience *323*, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.063.

314. Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. Cell *125*, 775–784. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.051.

315. Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. Cell *146*, 785–798. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022.

316. Partida, E., Mironets, E., Hou, S., and Tom, V.J. (2016). Cardiovascular dysfunction following spinal cord injury. Neural Regen Res *11*, 189–194. https://doi.org/10.4103/1673-5374.177707.

317. Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science *310*, 113–116. https://doi.org/10.1126/science.1116916.

318. Peers, C., Kang, P., Boyle, J.P., Porter, K.E., Pearson, H.A., Smith, I.F., and Kemp, P.J. (2006). Hypoxic regulation of Ca2+ signalling in astrocytes and endothelial cells. Novartis Found Symp *272*, 119–127; discussion 127-140.

319. Pekny, M., Wilhelmsson, U., Tatlisumak, T., and Pekna, M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? Neurosci Lett *689*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021.

320. Peña, F., Parkis, M.A., Tryba, A.K., and Ramirez, J.-M. (2004). Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. Neuron *43*, 105–117. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.023.

321. Perea, G., and Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. Cell Calcium *38*, 375–382. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.015.

322. Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. Science *317*, 1083–1086. https://doi.org/10.1126/science.1144640.

323. Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci *32*, 421–431. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001.

324. Perret, C., and Cabelguen, J.-M. (1980). Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. Brain Research *187*, 333–352. https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90207-3.

325. Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M.C., Salvatore, L., and Tucker, S.J. (2001). Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. J Physiol *532*, 359–367. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0359f.x.

326. Plantier, V., Sanchez-Brualla, I., Dingu, N., Brocard, C., Liabeuf, S., Gackière, F., and Brocard, F. (2019). Calpain fosters the hyperexcitability of motoneurons after spinal cord injury and leads to spasticity. Elife *8*, e51404. https://doi.org/10.7554/eLife.51404.

327. Platz, T., Eickhof, C., Nuyens, G., and Vuadens, P. (2005). Clinical scales for the assessment of spasticity, associated phenomena, and function: a systematic review of the literature. Disabil Rehabil *27*, 7–18. https://doi.org/10.1080/09638280400014634.

328. Poliak, S., and Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. Nat Rev Neurosci *4*, 968–980. https://doi.org/10.1038/nrn1253.

329. Pratt, C.A., and Jordan, L.M. (1987). Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells as contributors to the spinal mechanisms of fictive locomotion. J Neurophysiol *57*, 56–71. https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.56.

330. Rajani, V., Zhang, Y., Jalubula, V., Rancic, V., SheikhBahaei, S., Zwicker, J.D., Pagliardini, S., Dickson, C.T., Ballanyi, K., Kasparov, S., et al. (2018). Release of ATP by pre-Bötzinger complex astrocytes contributes to the hypoxic ventilatory response via a Ca2+ -dependent P2Y1 receptor mechanism. J Physiol *596*, 3245–3269. https://doi.org/10.1113/JP274727.

331. Ransdell, J.L., Nair, S.S., and Schulz, D.J. (2013). Neurons within the Same Network Independently Achieve Conserved Output by Differentially Balancing Variable Conductance Magnitudes. J Neurosci *33*, 9950–9956. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1095-13.2013.

332. Ransom, B.R., Carlini, W.G., and Connors, B.W. (1986). Brain extracellular space: developmental studies in rat optic nerve. Ann N Y Acad Sci *481*, 87–105. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb27141.x.

333. Ransom, C.B., Ransom, B.R., and Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K+ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na+ pumps. J Physiol *522 Pt 3*, 427–442. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00427.x.

334. Ransom, C.B., and Sontheimer, H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K+ currents in rat spinal cord astrocytes. Journal of Neurophysiology *73*, 333–346. https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.1.333.

335. Rasband, M.N. (2004). It's "juxta" potassium channel! J Neurosci Res *76*, 749–757. https://doi.org/10.1002/jnr.20073.

336. Redfern, P.A. (1970). Neuromuscular transmission in new-born rats. J Physiol *209*, 701–709.

337. Reeves, A.M.B., Shigetomi, E., and Khakh, B.S. (2011). Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. J Neurosci *31*, 9353–9358. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0127-11.2011.

338. Regan, M.R., Huang, Y.H., Kim, Y.S., Dykes-Hoberg, M.I., Jin, L., Watkins, A.M., Bergles, D.E., and Rothstein, J.D. (2007). Variations in Promoter Activity Reveal a Differential Expression and Physiology of Glutamate Transporters by Glia in the Developing and Mature CNS. J Neurosci *27*, 6607–6619. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0790-07.2007.

339. Reichenbach, A., Henke, A., Eberhardt, W., Reichelt, W., and Dettmer, D. (1992). K+ ion regulation in retina. Can J Physiol Pharmacol *70 Suppl*, S239-247. https://doi.org/10.1139/y92-267.

340. Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. Neuroscience *67*, 977–991. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00615-c.

341. Robinson, S.R. (2001). Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience Research *66*, 972–980. https://doi.org/10.1002/jnr.10057.

342. Rojas, A., Cui, N., Su, J., Yang, L., Muhumuza, J.-P., and Jiang, C. (2007). Protein kinase C dependent inhibition of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channel. Biochim Biophys Acta *1768*, 2030–2042. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.04.008.

343. Rojas, A., Su, J., Yang, L., Lee, M., Cui, N., Zhang, X., Fountain, D., and Jiang, C. (2008). Modulation of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channel by multiple neurotransmitters via Galphaq-coupled receptors. J Cell Physiol *214*, 84–95. https://doi.org/10.1002/jcp.21169.

344. Rose, C.R., and Ransom, B.R. (1997). Regulation of intracellular sodium in cultured rat hippocampal neurones. The Journal of Physiology *499*, 573–587. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021951.

345. Roseberry, T.K., Lee, A.M., Lalive, A.L., Wilbrecht, L., Bonci, A., and Kreitzer, A.C. (2016). Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. Cell *164*, 526–537. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.037.

346. Rossi, D.J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature *403*, 316–321. https://doi.org/10.1038/35002090.

347. Rossignol, S., Dubuc, R., and Gossard, J.-P. (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. Physiol Rev *86*, 89–154. https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2005.

348. Rubin, J.E., Hayes, J.A., Mendenhall, J.L., and Del Negro, C.A. (2009). Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 2939–2944. https://doi.org/10.1073/pnas.0808776106.

349. Ryczko, D., Charrier, V., Ijspeert, A., and Cabelguen, J.-M. (2010). Segmental Oscillators in Axial Motor Circuits of the Salamander: Distribution and Bursting Mechanisms. Journal of Neurophysiology *104*, 2677–2692. https://doi.org/10.1152/jn.00479.2010.

350. Santello, M., Bezzi, P., and Volterra, A. (2011). TNFα controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. Neuron *69*, 988–1001. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.003.

351. Savtchouk, I., and Volterra, A. (2018). Gliotransmission: Beyond Black-and-White. J Neurosci *38*, 14–25. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017.

352. Schilero, G.J., Bauman, W.A., and Radulovic, M. (2018). Traumatic Spinal Cord Injury: Pulmonary Physiologic Principles and Management. Clin Chest Med *39*, 411–425. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.02.002.

353. Schirmer, L., Möbius, W., Zhao, C., Cruz-Herranz, A., Ben Haim, L., Cordano, C., Shiow, L.R., Kelley, K.W., Sadowski, B., Timmons, G., et al. (2018). Oligodendrocyte-encoded Kir4.1 function is required for axonal integrity. Elife *7*, e36428. https://doi.org/10.7554/eLife.36428.

354. Schlue, W.R., and Wuttke, W. (1983). Potassium activity in leech neuropile glial cells changes with external potassium concentration. Brain Res *270*, 368–372. https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90616-9.

355. Schmitt, L.-I., David, C., Steffen, R., Hezel, S., Roos, A., Schara-Schmidt, U., Kleinschnitz, C., Leo, M., and Hagenacker, T. (2023). Spinal astrocyte dysfunction drives motor neuron loss in late-onset spinal muscular atrophy. Acta Neuropathol *145*, 611–635. https://doi.org/10.1007/s00401-023-02554-4.

356. Schneider, S.P., and Fyffe, R.E. (1992). Involvement of GABA and glycine in recurrent inhibition of spinal motoneurons. J Neurophysiol *68*, 397–406. https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.2.397.

357. Schulz, K., Sydekum, E., Krueppel, R., Engelbrecht, C.J., Schlegel, F., Schröter, A., Rudin, M., and Helmchen, F. (2012). Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex. Nat Methods *9*, 597–602. https://doi.org/10.1038/nmeth.2013.

358. Seifert, G., Hüttmann, K., Binder, D.K., Hartmann, C., Wyczynski, A., Neusch, C., and Steinhäuser, C. (2009). Analysis of Astroglial K+ Channel Expression in the Developing Hippocampus Reveals a Predominant Role of the Kir4.1 Subunit. J. Neurosci. *29*, 7474–7488. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3790-08.2009.

359. Semyanov, A., Henneberger, C., and Agarwal, A. (2020). Making sense of astrocytic calcium signals - from acquisition to interpretation. Nat Rev Neurosci *21*, 551–564. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0361-8.

360. Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. J Neurosci *26*, 5370–5382. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006.

361. Shah, D., Gsell, W., Wahis, J., Luckett, E.S., Jamoulle, T., Vermaercke, B., Preman, P., Moechars, D., Hendrickx, V., Jaspers, T., et al. (2022). Astrocyte calcium dysfunction causes early network hyperactivity in Alzheimer's disease. Cell Rep *40*, 111280. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111280.

362. Shah, D., Gsell, W., Wahis, J., Luckett, E.S., Jamoulle, T., Vermaercke, B., Preman, P., Moechars, D., Hendrickx, V., Jaspers, T., et al. (2022). Astrocyte calcium dysfunction causes early network hyperactivity in Alzheimer's disease. Cell Rep *40*, 111280. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111280.

363. Sheikhbahaei, S., Turovsky, E.A., Hosford, P.S., Hadjihambi, A., Theparambil, S.M., Liu, B., Marina, N., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., Smith, J.C., et al. (2018). Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity. Nat Commun *9*, 370. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02723-6.

364. Shevtsova, N.A., Ha, N.T., Rybak, I.A., and Dougherty, K.J. (2020). Neural Interactions in Developing Rhythmogenic Spinal Networks: Insights From Computational Modeling. Front Neural Circuits *14*, 614615. https://doi.org/10.3389/fncir.2020.614615.

365. Shigetomi, E., Patel, S., and Khakh, B.S. (2016). Probing the complexities of astrocyte calcium signaling. Trends Cell Biol *26*, 300–312. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.003.

366. Shik, M.L., Severin, F.V., and Orlovskiĭ, G.N. (1966). [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. Biofizika *11*, 659–666.

367. Sienski, G., Narayan, P., Bonner, J.M., Kory, N., Boland, S., Arczewska, A.A., Ralvenius, W.T., Akay, L., Lockshin, E., He, L., et al. (2021). APOE4 disrupts intracellular lipid homeostasis in human iPSC-derived glia. Sci Transl Med *13*, eaaz4564. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz4564.

368. Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci *5*, 146–156. https://doi.org/10.1038/nrn1326.

369. Smith, I.F., Boyle, J.P., Kang, P., Rome, S., Pearson, H.A., and Peers, C. (2005). Hypoxic regulation of Ca2+ signaling in cultured rat astrocytes. Glia *49*, 153–157. https://doi.org/10.1002/glia.20083.

370. Søe, R., Andreasen, M., and Klaerke, D.A. (2009). Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by extracellular cations. Biochim Biophys Acta *1788*, 1706–1713. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.07.002.

371. Sofroniew, M.V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. Trends Immunol *41*, 758–770. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004.

372. Sohn, Y., Yoo, K.-Y., Park, O.K., Kwon, S.-H., Lee, C.H., Choi, J.H., Hwang, I.K., Seo, J.Y., Cho, J.H., and Won, M.-H. (2011). Na+/HCO3- cotransporter immunoreactivity changes in neurons and expresses in astrocytes in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia/reperfusion. Neurochem Res *36*, 2459–2469. https://doi.org/10.1007/s11064-011-0572-5.

373. Somjen, G.G. (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. Annu Rev Physiol *41*, 159–177. https://doi.org/10.1146/annurev.ph.41.030179.001111.

374. Somjen, G.G., and Müller, M. (2000). Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. Brain Res *885*, 102–110. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02948-6.

375. Somjen, G.G. (2002). Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. Neuroscientist *8*, 254–267. https://doi.org/10.1177/1073858402008003011.

376. Song, J., Ampatzis, K., Björnfors, E.R., and El Manira, A. (2016). Motor neurons control locomotor circuit function retrogradely via gap junctions. Nature *529*, 399–402. https://doi.org/10.1038/nature16497.

377. Song, J., Pallucchi, I., Ausborn, J., Ampatzis, K., Bertuzzi, M., Fontanel, P., Picton, L.D., and El Manira, A. (2020). Multiple Rhythm-Generating Circuits Act in Tandem with Pacemaker Properties to Control the Start and Speed of Locomotion. Neuron *105*, 1048-1061.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.12.030.

378. Srinivasan, R., Lu, T.-Y., Chai, H., Xu, J., Huang, B.S., Golshani, P., Coppola, G., and Khakh, B.S. (2016). New Transgenic Mouse Lines for Selectively Targeting Astrocytes and Studying Calcium Signals in Astrocyte Processes In Situ and In Vivo. Neuron *92*, 1181–1195. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.030.

379. Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G., and Bogerts, B. (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. BMC Neuroscience *8*, 2. https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-2.

380. Stepien, A.E., and Arber, S. (2008). Probing the locomotor conundrum: descending the “V” interneuron ladder. Neuron *60*, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.030.

381. Sternberg, J.R., Severi, K.E., Fidelin, K., Gomez, J., Ihara, H., Alcheikh, Y., Hubbard, J.M., Kawakami, K., Suster, M., and Wyart, C. (2016). Optimization of a Neurotoxin to Investigate the Contribution of Excitatory Interneurons to Speed Modulation In Vivo. Curr Biol *26*, 2319–2328. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.037.

382. Stevenson, R., Samokhina, E., Mangat, A., Rossetti, I., Purushotham, S.S., Malladi, C.S., Morley, J.W., and Buskila, Y. (2023). Astrocytic K+ clearance during disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. Glia *71*, 2456–2472. https://doi.org/10.1002/glia.24435.

383. Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. Front Cell Neurosci *8*, 293. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293.

384. Stokke, M.F., Nissen, U.V., Glover, J.C., and Kiehn, O. (2002). Projection patterns of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of the neonatal rat. J Comp Neurol *446*, 349–359. https://doi.org/10.1002/cne.10211.

385. Stonehouse, A.H., Pringle, J.H., Norman, R.I., Stanfield, P.R., Conley, E.C., and Brammar, W.J. (1999). Characterisation of Kir2.0 proteins in the rat cerebellum and hippocampus by polyclonal antibodies. Histochem Cell Biol *112*, 457–465. https://doi.org/10.1007/s004180050429.

386. Su, G., Haworth, R.A., Dempsey, R.J., and Sun, D. (2000). Regulation of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter in primary astrocytes by dibutyryl cAMP and high [K(+)](o). Am J Physiol Cell Physiol *279*, C1710-1721. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.6.C1710.

387. Su, H., Alroy, G., Kirson, E.D., and Yaari, Y. (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci *21*, 4173–4182. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04173.2001.

388. Sugiura, S., Lahav, R., Han, J., Kou, S.Y., Banner, L.R., de Pablo, F., and Patterson, P.H. (2000). Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. Eur J Neurosci *12*, 457–466. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00922.x.

389. Sun, W., McConnell, E., Pare, J.-F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y., and Nedergaard, M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. Science *339*, 197–200. https://doi.org/10.1126/science.1226740.

390. Svensson, E., Jeffreys, H., and Li, W.-C. (2017). The modulation of two motor behaviors by persistent sodium currents in Xenopus laevis tadpoles. J Neurophysiol *118*, 121–130. https://doi.org/10.1152/jn.00755.2016.

391. Takumi, T., Ishii, T., Horio, Y., Morishige, K.-I., Takahashi, N., Yamada, M., Yamashita, T., Kiyama, H., Sohmiya, K., Nakanishi, S., et al. (1995). A Novel ATP-dependent Inward Rectifier Potassium Channel Expressed Predominantly in Glial Cells *. Journal of Biological Chemistry *270*, 16339–16346. https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16339.

392. Talpalar, A.E., Bouvier, J., Borgius, L., Fortin, G., Pierani, A., and Kiehn, O. (2013). Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation. Nature *500*, 85–88. https://doi.org/10.1038/nature12286.

393. Tanemoto, M., Kittaka, N., Inanobe, A., and Kurachi, Y. (2000). In vivo formation of a proton-sensitive K+ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. J Physiol *525 Pt 3*, 587–592. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00587.x.

394. Tang, X., Taniguchi, K., and Kofuji, P. (2009). HETEROGENEITY OF KIR4.1 CHANNEL EXPRESSION IN GLIA REVEALED BY MOUSE TRANSGENESIS. Glia *57*, 1706–1715. https://doi.org/10.1002/glia.20882.

395. Tasker, J.G., Oliet, S.H.R., Bains, J.S., Brown, C.H., and Stern, J.E. (2012). Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. J Neuroendocrinol *24*, 566–576. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x.

396. Tazerart, S., Viemari, J.-C., Darbon, P., Vinay, L., and Brocard, F. (2007). Contribution of persistent sodium current to locomotor pattern generation in neonatal rats. J Neurophysiol *98*, 613–628. https://doi.org/10.1152/jn.00316.2007.

397. Tazerart, S., Vinay, L., and Brocard, F. (2008). The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. J Neurosci *28*, 8577–8589. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1437-08.2008.

398. Toft-Hansen, H., Füchtbauer, L., and Owens, T. (2011). Inhibition of reactive astrocytosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease. Glia *59*, 166–176. https://doi.org/10.1002/glia.21088.

399. Tong, H., and McDearmid, J.R. (2012). Pacemaker and plateau potentials shape output of a developing locomotor network. Curr Biol *22*, 2285–2293. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.025.

400. Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Haustein, M.D., Anderson, M.A., Mody, I., Olsen, M.L., Sofroniew, M.V., et al. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. Nat Neurosci *17*, 694–703. https://doi.org/10.1038/nn.3691.

401. Tresch, M.C., and Kiehn, O. (2000). Motor coordination without action potentials in the mammalian spinal cord. Nat Neurosci *3*, 593–599. https://doi.org/10.1038/75768.

402. Tsuruyama, K., Hsiao, C.-F., and Chandler, S.H. (2013). Participation of a persistent sodium current and calcium-activated nonspecific cationic current to burst generation in trigeminal principal sensory neurons. J Neurophysiol *110*, 1903–1914. https://doi.org/10.1152/jn.00410.2013.

403. Tucker, S.J., Imbrici, P., Salvatore, L., D'Adamo, M.C., and Pessia, M. (2000). pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia. J Biol Chem *275*, 16404–16407. https://doi.org/10.1074/jbc.C000127200.

404. Uchiyama, M., Nakao, A., Kurita, Y., Fukushi, I., Takeda, K., Numata, T., Tran, H.N., Sawamura, S., Ebert, M., Kurokawa, T., et al. (2020). O2-Dependent Protein Internalization Underlies Astrocytic Sensing of Acute Hypoxia by Restricting Multimodal TRPA1 Channel Responses. Curr Biol *30*, 3378-3396.e7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.047.

405. Ullrich, N.D., Voets, T., Prenen, J., Vennekens, R., Talavera, K., Droogmans, G., and Nilius, B. (2005). Comparison of functional properties of the Ca2+-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. Cell Calcium *37*, 267–278. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.11.001.

406. Uyeda, C.T., Eng, L.F., and Bignami, A. (1972). Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. Brain Res *37*, 81–89. https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90347-2.

407. van der Salm, A., Veltink, P.H., Hermens, H.J., IJzerman, M.J., and Nene, A.V. (2005). Development of a New Method for Objective Assessment of Spasticity Using Full Range Passive Movements. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation *86*, 1991–1997. https://doi.org/10.1016/j.apmr.2005.04.023.

408. van Putten, M.J.A.M., Fahlke, C., Kafitz, K.W., Hofmeijer, J., and Rose, C.R. (2021). Dysregulation of Astrocyte Ion Homeostasis and Its Relevance for Stroke-Induced Brain Damage. Int J Mol Sci *22*, 5679. https://doi.org/10.3390/ijms22115679.

409. Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. Brain Struct Funct *222*, 2017–2029. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5.

410. Ventura, R., and Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. J Neurosci *19*, 6897–6906. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06897.1999.

411. Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. Physiol Rev *98*, 151.

412. Verkhratsky, A., Zorec, R., and Parpura, V. (2017). Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. Brain Pathol *27*, 629–644. https://doi.org/10.1111/bpa.12537.

413. Verneuil, J., Brocard, C., Trouplin, V., Villard, L., Peyronnet-Roux, J., and Brocard, F. (2020). The M-current works in tandem with the persistent sodium current to set the speed of locomotion. PLoS Biol *18*, e3000738. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000738.

414. Viala, D., and Buser, P. (1969). The effects of DOPA and 5-HTP on rhythmic efferent discharges in hind limb nerves in the rabbit. Brain Research *12*, 437–443. https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90011-0.

415. Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J.C., Pearlstein, E., and Pflieger, J.F. (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. Brain Res Brain Res Rev *40*, 118–129. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00195-9.

416. Vitte, J., Fassier, C., Tiziano, F.D., Dalard, C., Soave, S., Roblot, N., Brahe, C., Saugier-Veber, P., Bonnefont, J.P., and Melki, J. (2007). Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. Am J Pathol *171*, 1269–1280. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070399.

417. Voskuhl, R.R., Peterson, R.S., Song, B., Ao, Y., Morales, L.B.J., Tiwari-Woodruff, S., and Sofroniew, M.V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune

inflammation of the CNS. J Neurosci *29*, 11511–11522. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009.

418. Wahis, J., Baudon, A., Althammer, F., Kerspern, D., Goyon, S., Hagiwara, D., Lefevre, A., Barteczko, L., Boury-Jamot, B., Bellanger, B., et al. (2021). Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. Nat Neurosci *24*, 529–541. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00800-0.

419. Wallén, P., Grafe, P., and Grillner, S. (1984). Phasic variations of extracellular potassium during fictive swimming in the lamprey spinal cord in vitro. Acta Physiol Scand *120*, 457–463. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1984.tb07406.x.

420. Walz, W., and Lang, M.K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. Neurosci Lett *257*, 127–130. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00813-1.

421. Walz, W., and MacVicar, B. (1988). Electrophysiological properties of glial cells: comparison of brain slices with primary cultures. Brain Res *443*, 321–324. https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91626-5.

422. Wang, Q., Kong, Y., Wu, D.-Y., Liu, J.-H., Jie, W., You, Q.-L., Huang, L., Hu, J., Chu, H.-D., Gao, F., et al. (2021). Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. Nat Commun *12*, 3321. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23843-0.

423. Wang, T., Sun, Y., and Dettmer, U. (2023). Astrocytes in Parkinson's Disease: From Role to Possible Intervention. Cells *12*, 2336. https://doi.org/10.3390/cells12192336.

424. Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. J Neurosci *33*, 12870–12886. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013.

425. West, C.R., Alyahya, A., Laher, I., and Krassioukov, A. (2013). Peripheral vascular function in spinal cord injury: a systematic review. Spinal Cord *51*, 10–19. https://doi.org/10.1038/sc.2012.136.

426. Wheeler, M.A., Clark, I.C., Tjon, E.C., Li, Z., Zandee, S.E.J., Couturier, C.P., Watson, B.R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., et al. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. Nature *578*, 593–599. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0.

427. Wilson, J.M., Hartley, R., Maxwell, D.J., Todd, A.J., Lieberam, I., Kaltschmidt, J.A., Yoshida, Y., Jessell, T.M., and Brownstone, R.M. (2005). Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. J Neurosci *25*, 5710–5719. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0274-05.2005.

428. Windle, W.F., and Chambers, W.W. (1950). Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. J Comp Neurol *93*, 241–257. https://doi.org/10.1002/cne.900930206.

429. Windle, W.F., Clemente, C.D., and Chambers, W.W. (1952). Inhibition of formation of a glial barrier as a means of permitting a peripheral nerve to grow into the brain. J Comp Neurol *96*, 359–369. https://doi.org/10.1002/cne.900960207.

430. Witts, E.C., Panetta, K.M., and Miles, G.B. (2012). Glial-derived adenosine modulates spinal motor networks in mice. J Neurophysiol *107*, 1925–1934. https://doi.org/10.1152/jn.00513.2011.

431. Wyart, C. (2017). Locomotion: Control from the Periphery? Curr Biol *27*, R152–R153. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.001.

432. Wyart, C., and Carbo-Tano, M. (2023). Design of mechanosensory feedback during undulatory locomotion to enhance speed and stability. Curr Opin Neurobiol *83*, 102777. https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102777.

433. Wyndaele, M., and Wyndaele, J.-J. (2006). Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? Spinal Cord *44*, 523–529. https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101893.

434. Xin, W., Schuebel, K.E., Jair, K.-W., Cimbro, R., De Biase, L.M., Goldman, D., and Bonci, A. (2019). Ventral midbrain astrocytes display unique physiological features and sensitivity to dopamine D2 receptor signaling. Neuropsychopharmacology *44*, 344–355. https://doi.org/10.1038/s41386-018-0151-4.

435. Xiong, Z.-Q., and Stringer, J.L. (2000). Regulation of extracellular pH in the developing hippocampus. Developmental Brain Research *122*, 113–117. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00057-2.

436. Xu, H., Cui, N., Yang, Z., Qu, Z., and Jiang, C. (2000). Modulation of Kir4.1 and Kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. J Physiol *524*, 725–735. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00725.x.

437. Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H.J., and Fukuda, A. (2004). Cl- uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. J Physiol *557*, 829–841. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062471.

438. Yang, J., Vitery, M.D.C., Chen, J., Osei-Owusu, J., Chu, J., and Qiu, Z. (2019). Glutamate-Releasing SWELL1 Channel in Astrocytes Modulates Synaptic Transmission and Promotes Brain Damage in Stroke. Neuron *102*, 813-827.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.029.

439. Yang, J., Vitery, M.D.C., Chen, J., Osei-Owusu, J., Chu, J., and Qiu, Z. (2019). Glutamate-Releasing SWELL1 Channel in Astrocytes Modulates Synaptic Transmission and Promotes Brain Damage in Stroke. Neuron *102*, 813-827.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.029.

440. Yang, Y., Vidensky, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., Frankl, M., and Rothstein, J.D. (2011). Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. Glia *59*, 200–207. https://doi.org/10.1002/glia.21089.

441. Yang, Z., Xu, H., Cui, N., Qu, Z., Chanchevalap, S., Shen, W., and Jiang, C. (2000). Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO2 and pH. J Gen Physiol *116*, 33–45. https://doi.org/10.1085/jgp.116.1.33.

442. Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J.F., Brownstone, R.M., Jessell, T.M., and Miles, G.B. (2009). A cluster of cholinergic pre-motor interneurons modulates mouse locomotor activity. Neuron *64*, 645–662. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017.

443. Zakel, J., Chae, J., and Wilson, R.D. (2024). Innovations in Stroke Recovery and Rehabilitation: Poststroke Pain. Phys Med Rehabil Clin N Am *35*, 445–462. https://doi.org/10.1016/j.pmr.2023.06.027.

444. Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. J Neurosci *32*, 6391–6410. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

445. Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. J Neurosci *34*, 11929–11947. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.

446. Zhang, Y., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Caneda, C., Plaza, C.A., Blumenthal, P.D., Vogel, H., Steinberg, G.K., Edwards, M.S.B., Li, G., et al. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. Neuron *89*, 37–53. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013.

447. Zhang, Y., Narayan, S., Geiman, E., Lanuza, G.M., Velasquez, T., Shanks, B., Akay, T., Dyck, J., Pearson, K., Gosgnach, S., et al. (2008). V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. Neuron *60*, 84–96. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.027.

448. Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., and Zhang, L. (2019). The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. BioMed Research International *2019*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2019/9605265.

449. Zhong, G., Masino, M.A., and Harris-Warrick, R.M. (2007). Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. J Neurosci *27*, 4507–4518. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0124-07.2007.

450. Zhong, G., Shevtsova, N.A., Rybak, I.A., and Harris-Warrick, R.M. (2012). Neuronal activity in the isolated mouse spinal cord during spontaneous deletions in fictive locomotion: insights into locomotor central pattern generator organization. J Physiol *590*, 4735–4759. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240895.

451. Zhou, M., Schools, G.P., and Kimelberg, H.K. (2006). Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. J Neurophysiol *95*, 134–143. https://doi.org/10.1152/jn.00570.2005.