amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 10 Janvier 2025

Edith BLASCO

Neurones en contact avec le liquide cérébrospinal : des neuromodulateurs de l'activité motrice spinale chez les mammifères

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Neurosciences

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

Laboratoire/Partenaires de recherche
UMR 7289
Institut de Neurosciences de la Timone

Composition du jury

Yasmine CANTAUT-BELARIF *ICM - Paris*	Rapportrice
Abdel EL MANIRA *Karolinska Institutet - Stockholm*	Rapporteur
Matilde CORDERO-ERAUSQUIN *INCI - Strasbourg*	Examinatrice
Elodie FINO *INMED - Marseille*	Examinatrice
Emmanuel BOURINET *IGF - Montpellier*	Président du jury
Nicolas WANAVERBECQ *INT - Marseille*	Directeur de thèse

NeuroSchool Aix+Marseille Université
int institut de neurosciences de la timone
cnrs

Affidavit

Je soussigné, Edith BLASCO, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Nicolas WANAVERBECQ 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 1er novembre 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.

Liste des publications et participation aux conférences

1- Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse

1) Crozat, Elysa, **Edith Blasco**, Jorge Ramirez-Franco, Priscille Riondel, Nina Jurčić, Riad Seddik, Caroline Michelle, Jérôme Trouslard, et Nicolas Wanaverbecq. 2024. « Spinal cerebrospinal fluid contacting neurons are a conserved sensory neuronal population along the mouse spinal cord ». *bioRxiv* 2024.10.10.617653. doi: 10.1101/2024.10.10.617653.

2) Gerstmann Katrin, Nina Jurčić, **Edith Blasco**, Severine Kunz, Felipe de Almeida Sassi, Nicolas Wanaverbecq, et Niccolò Zampieri. 2022. « The Role of Intraspinal Sensory Neurons in the Control of Quadrupedal Locomotion ». *Current Biology: CB* 32(11):2442-2453.e4. doi: 10.1016/j.cub.2022.04.019.

2- Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse

1) Congrès international des neurosciences européennes (FENS), Vienne, Autriche, 2024, Présentation poster

2) Colloque Motor Control : Motor Control Across Scales, Vienne, Autriche, 2024, Présentation poster

3) Colloque annuel du programme doctoral Neuroschool (NeuroDays), Marseille, France, 2023, Présentation orale

4) Colloque Motor Control : Spinal Circuits & Beyond, St Andrews, Ecosse, 2023, Présentation poster

5) Colloque Moelle épinière organisé par le « Club de la Moelle épinière et ses Pathologies », Marseille, France, 2023

6) Congrès annuel de la Société des neurosciences française (NeuroFrance), Lyon, France, 2023, Présentation poster

7) Conférence internationale de l'Institut de Neurosciences de la Timone pour le 10ème anniversaire de l'INT, 2022, Présentation poster

8) Colloque annuel de l'Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la santé, Marseille, France, 2022, Présentation poster

Résumé

La locomotion, essentielle à la survie des êtres vivants, répond à des besoins vitaux tels que l'exploration pour trouver un habitat, de la nourriture et des partenaires, ou échapper aux prédateurs. Elle est initiée par des commandes supraspinales et repose sur l'activité rythmique de réseaux neuronaux intra-spinaux, appelés Générateurs Central de Patron (CPG). L'activité des CPG est modulée par des centres supraspinaux, par des interneurones moteurs locaux et par des rétrocontrôles sensoriels périphériques, qui informent sur les mouvements, et permettent ainsi d'ajuster la trajectoire des membres tout en maintenant la posture.

Les neurones de contact du liquide cérébrospinal (Nc-LCS), forment une population neuronale unique, conservée chez tous les vertébrés et localisée autour du canal central de la moelle épinière. Ces cellules GABAergiques, possèdent une morphologie caractéristique et expriment sélectivement des canaux PKD2L1 (Polycystin Kidney Disease 2-like1), appartenant à la famille des récepteurs TRP (transient receptor potential). Ils sont dotés de propriétés chimio- et mécanosensibles et représenteraient une nouvelle population de neurones sensoriels intrinsèques au système nerveux central. Chez le poisson zèbre, ces neurones répondent à des signaux chimiques du LCS et à des stimuli mécaniques, tels que la torsion de la moelle épinière. Un ensemble de données anatomiques et fonctionnelles indiquent qu'ils sont insérés dans le réseau moteur spinal et qu'ils participent à la modulation de la nage et de la posture. En raison de similitudes anatomiques et fonctionnelles, ainsi que de leur position stratégique entre le LCS et le parenchyme, les Nc-LCS spinaux chez la souris, pourraient également avoir un rôle central dans la physiologie de la moelle épinière, en modulant notamment l'activité motrice. Des études récentes suggèrent en effet, que les Nc-LCS auraient un rôle dans la régulation de l'habileté motrice, mais à ce jour, le réseau neuronal dans lequel ils sont insérés n'a pas été caractérisé.

Mon projet de thèse visait à caractériser, chez la souris, les propriétés cellulaires des Nc-LCS, à démontrer leur connectivité anatomique et fonctionnelle dans le réseau moteur spinal et à identifier le phénotype de leurs partenaires postsynaptiques, afin de confirmer leur rôle potentiel dans la modulation du comportement moteur.

Grâce à des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp sur tranches de moelle épinière lombaire de souris, j'ai caractérisé les propriétés cellulaires et l'expression de conductances ioniques et de récepteurs synaptiques des Nc-LCS lombaires. En utilisant un ensemble de modèle de souris transgéniques, j'ai également analysé au niveau anatomique la connectivité des Nc-LCS, que j'ai ensuite cartographiée de manière fonctionnelle par une approche optogénétique. J'ai enfin mis en place la stratégie de RT-PCR sur cellule unique pour identifier le phénotype de leurs cibles postsynaptiques.

Mes résultats confirment que les Nc-LCS lombaires possèdent des propriétés de neurones sensoriels et démontrent pour la première fois chez la souris qu'ils établissent des connexions fonctionnelles avec des interneurones clés du réseau locomoteur spinal. Cette étude représente une avancée majeure dans la compréhension de la fonction physiologique des Nc-LCS lombaires chez les mammifères. Elle suggère que les Nc-LCS seraient des acteurs importants pour la modulation de l'activité motrice et notamment, de l'adaptation des mouvements fin, de l'ajustement de la trajectoire des membres et de la posture. Les enjeux majeurs sont à présent, d'identifier les signaux du LCS, en relation avec l'activité motrice, qui modulent les Nc-LCS et de caractériser les entrées synaptiques issues des retours sensoriels périphériques qui projettent sur les Nc-LCS.

Mots clés : Neurones en contact avec le liquide cérébrospinal - Moelle épinière - Locomotion - Electrophysiologie - PKD2L1

Abstract

Locomotion, essential to the survival of living beings, responds to vital needs such as exploration to find habitat, food and partners, or escape from predators. It is initiated by supraspinal commands and relies on the rhythmic activity of intraspinal neural networks called Central Pattern Generators (CPGs). The activity of the CPGs is modulated by supraspinal centers, local motor interneurons and peripheral sensory feedback, which provide information on movements, thus enabling adjustment of limb trajectory while maintaining posture.

Cerebrospinal fluid contacting neurons (CSF-cNs) form a unique neuronal population, conserved in all vertebrates and localized around the central canal of the spinal cord. These GABAergic cells have a characteristic morphology and selectively express PKD2L1 (Polycystin Kidney Disease 2-like1) channels, belonging to the TRP (transient receptor potential) receptor family. They have chemo- and mechanosensitive properties and represent a new population of sensory neurons intrinsic to the central nervous system (CNS). In zebrafish, these neurons respond to chemical signals from the CSF and to mechanical stimuli such as torsion of the spinal cord. Anatomical and functional data indicate that they are inserted into the spinal motor network and participate in the modulation of swimming behavior and posture. Due to anatomical and functional similarities, as well as their strategic position between the CSF and the parenchyma, spinal CSF-cNs in mice may also play a central role in spinal cord physiology, notably by modulating motor activity. Recent studies suggest that CSF-cNs may indeed play a role in the regulation of motor skills and posture, but to date the neural network in which they are inserted has not been characterized.

My thesis project aimed at characterizing the CSF-cN cellular properties in mice, demonstrate their anatomical and functional connectivity in the spinal motor network and identify the phenotype of their postsynaptic partners, to confirm their potential role in modulating motor behavior.

Using patch-clamp electrophysiological recordings in mouse lumbar spinal cord slices, I characterized the cellular properties and expression of ionic conductances and synaptic receptors of lumbar CSF-cNs. Further, by implementing a set of transgenic mouse models, I analyzed at the anatomical level CSF-cN connectivity, which I then functionally mapped using an optogenetic approach. Finally, I developed a single-cell RT-PCR strategy to identify the phenotype of their postsynaptic targets.

My results confirm that lumbar CSF-cNs possess properties of sensory neurons and demonstrate for the first time in mice that they establish functional connections with key interneurons of the spinal locomotor network. This study represents a breakthrough in our understanding of the physiological function of lumbar CSF-cNs in mammals. It suggests that CSF-cNs are players in the modulation of motor activity, in the adaptation of fine movements, adjustment of limb trajectory and posture. One of the major challenges now, is to identify which CSF signals in relation to motor activity, modulate CSF-cN activity and to characterize the synaptic inputs from peripheral sensory feedback loops, that project to CSF-cNs.

Key words: Cerebrospinal fluid contacting-neurons - Spinal cord - Locomotion - Electrophysiology - PKD2L1

Table des Matières

AFFIDAVIT ..... **V**

LISTE DES PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES ..... **VII**

RESUME ..... **VIII**

ABSTRACT ..... **IX**

TABLE DES MATIERES ..... **XI**

TABLE DES FIGURES ..... **XV**

LISTE DES ABREVIATIONS ..... **XVII**

I - INTRODUCTION **3**

A- RAPPELS SUR LE LIQUIDE CEREBROSPINAL ET LA MOELLE EPINIERE **3**

1- Le liquide cérébrospinal (LCS) 3

a) Généralités 3

b) Mécanisme de sécrétion du LCS par les Plexus Choroïdes 3

c) Composition du LCS 4

d) Circulation et absorption du LCS 4

e) Fonctions du LCS 5

2- La moelle épinière 6

a) Anatomie globale 6

b) La substance blanche 7

c) La substance grise 7

d) Le canal central : une région complexe, diversifiée et plastique 8

e) Fonctions de la moelle épinière 10

B- LES NEURONES DE CONTACT DU LIQUIDE CEREBROSPINAL : DES NEURONES SENSORIELS AU CENTRE DE LA ME **11**

1- Découverte des Nc-LCS 11

2- Localisation et distribution des Nc-LCS 11

3- Morphologie des Nc-LCS bulbo-spinaux 13

4- Marqueurs moléculaires des Nc-LCS 17

5- Origine et état de maturité des Nc-LCS 18

6- Propriétés intrinsèques 20

a) Mécanismes ioniques sous-jacents de l'excitabilité des Nc-LCS 20

b) Récepteurs synaptiques et neurotransmission 22

Expression de récepteurs ionotropiques *22*

Expression de récepteurs métabotropiques *22*

Une signalisation GABAergique particulière *23*

7- PKD2L1 : un récepteur sensoriel pour les Nc-LCS bulbo-spinaux 24

a) Les canaux « Transient Receptor Potential » (TRP) 24

b) Le canal Polycystin Kidney Disease 2- Like 1 (PKD2L1) 25

PKD12L1, un membre des canaux TRP Polycystine *25*

Expression et propriétés des canaux PKD2L1 ..... *25*

Modulation de PKD2L1 par le calcium *25*

Fonctions chémo- et mécanosensorielles du canal PKD2L1 ..... *26*

c) PKD2L1, une expression sélective dans les Nc-LCS 26

d) Rôle de PKD2L1 dans l'excitabilité des Nc-LCS 26

8- Partenaires synaptiques et projections axonales 27

a) Partenaires présynaptiques 27

b) Projections axonales et partenaires postsynaptiques 29

9- Fonctions des Nc-LCS ... 32
a) Le rôle des Nc-LCS dans la sécrétion de molécules bioactives ? ... 32
b) Les Nc-LCS, des neurones sensoriels ou intéroceptifs ... 33
Chémosensibilié des Nc-LCS ... 33
Mécanosensibilité des Nc-LCS ... 35
c) Le rôle des Nc-LCS dans la modulation de l'activité motrice ... 38
Chez le poisson-zèbre ... 38
Chez la souris ... 41
d) Le rôle des Nc-LCS comme acteurs de la niche spinale ? ... 42
e) Rôle des Nc-LCS dans l'immunité innée ... 43

C- LOCOMOTION ET POSTURE ... 45
1- La locomotion : le comportement moteur à la base du mouvement ... 45
a) La locomotion : définition fonctionnelle ... 45
b) La locomotion : définition mécanistique ... 45
c) Mise en place de la locomotion ... 46
2- De la volonté au mouvement : Implication des structures supraspinales ... 47
a) Contrôle de la posture ... 47
b) Contrôle de la locomotion ... 48
Sélection du comportement locomoteur : Rôle majeur des ganglions de la base ... 48
Initiation de la locomotion : La région locomotrice mésencéphalique (MLR) ... 49
3- De la volonté au mouvement : Implication de la moelle épinière ... 49
a) Les motoneurones spinaux ... 49
Muscles squelettiques et fibres musculaires ... 50
Les motoneurones somatiques : alpha et gamma ... 50
Motoneurones alpha ... 50
Motoneurones gamma ... 50
Organisation des motoneurones somatiques en colonnes motrices ... 51
b) La découverte du Générateur Central de Patron (CPG) locomoteur ... 51
Notion de demi-centres ... 52
Concepts de l'émergence du rythme locomoteur ... 52
c) Le CPG de la nage ... 52
La lamproie ... 53
Le Poisson-Zèbre ... 54
Interneurones V2a ... 54
Interneurones V0 ... 56
d) Le CPG de la marche ... 56
Localisation du CPG des membres postérieurs ... 56
Développement moléculaire et cellulaire du circuit locomoteur spinal ... 58
Le générateur du rythme locomoteur ... 59
Interneurones non-V2a Shox2^{+} ... 59
Interneurones Hb9 ... 60
Le générateur du patron locomoteur ... 61
Alternance fléchisseurs/extenseurs ... 61
Interneurones V1 ... 62
Interneurones V2b ... 63
Alternance gauche/droite et maintien de la posture ... 64
Interneurones V0 : V0v et V0d ... 64
Interneurones V2 : V2a ... 66
Interneurones dl6 : Dmrt3 et Wt1 ... 66
Synchronisation et symétrie des mouvements ... 68
Interneurones V3 ... 68
Contrôle des sorties motrices ... 69
V0c et V0g ... 69
4- Rôle des informations sensorielles dans la locomotion chez les vertébrés ... 72
a) La proprioception ... 72

Les neurones sensoriels propriocepteurs périphériques et leurs rôles *72*
Les fuseaux musculaires *73*
Les organes tendineux de Golgi *73*
b) Rôles des fuseaux musculaires et des organes tendineux de Golgi dans la locomotion 74
c) Autres propriocepteurs 75
d) Modulations sensorielles des sorties motrices en fonction du contexte 75
Afférences sensorielles musculaires : régulation de la transition de phase pendant le cycle du pas .. *76*
Afférences sensorielles musculaires : facilitation des processus de récupération post-lésionnels *76*
Afférences sensorielles cutanées *77*
e) Contrôle des signaux sensoriels 77

II - OBJECTIFS 81

III - MATERIEL ET METHODES 85

1- Expérimentation animale et éthique 85
2- Modèles expérimentaux 85
3- Préparation des tranches aigues de moelle épinière 85
4- Enregistrements électrophysiologiques 86
a) Solutions 87
b) Enregistrement des propriétés passives et des patrons de décharge des Nc-LCS et des interneurones 88
c) Caractérisation cellulaire des Nc-LCS lombaires 88
Caractérisation des canaux voltage-dépendants *88*
Caractérisation des récepteurs ionotropiques *88*
Modulation des canaux Ca_V par les protéines couplées aux protéines G *89*
d) Etude de la connectivité fonctionnelle des Nc-LCS par optogénétique 89
Connectivité présynaptique des Nc-LCS lombaires *90*
Connectivité postsynaptique des Nc-LCS lombaires *92*
e) Modulation de la transmission synaptique photo-évoquée par les RCPGs 92
Modulation des courants synaptiques par l'activation de RCPGs *92*
Effet pré-/postsynaptique de la modulation des RCPGs *92*
f) Caractérisation des partenaires postsynaptiques par Single-Cell RT-PCR 93
Récolte des ARN messagers des partenaires postsynaptiques *93*
RT-qPCR des ARNm *94*
Mesure de l'expression des transcrits par qPCR en SyberGreen *94*
5- Injections d'AAV 94
6- Histologie et imagerie confocale 95
a) Préparation des tissus pour l'imagerie confocale 95
b) Histologie et microscopie confocale 95
7- Analyses 95
Enregistrements en patch-clamp configuration cellule entière *95*
Single cell RT PCR *96*
8- Statistiques 96

IV - RESULTATS 99

A- CARACTERISATION DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES NC-LCS LOMBAIRES 99
1- Propriétés passives et patron de décharge 99
2- Les Nc-LCS lombaires expriment un ensemble de conductances ioniques voltage-dépendantes 100
a) Canaux Sodium voltage-dépendants (Na_V) 100
b) Canaux Calcium voltage-dépendants (Ca_V) 101
c) Canaux Potassium voltage-dépendants (K_V) 102
3- Les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs ionotropiques fonctionnels 103
a) Récepteurs glycinergiques et GABAergiques 103

b) Récepteurs glutamatergiques AMPA et Kainate 103
c) Récepteurs cholinergiques de type nicotinique 104
4- Modulation des Ca_v par les récepteurs métabotropiques 105
a) Récepteurs métabotropiques du GABA (R-$GABA_B$) 105
b) Récepteurs métabotropiques de l'acétylcholine (R-mACh) 106
B- CARACTERISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES PARTENAIRES SYNAPTIQUES DES NC-LCS 108
1- Caractérisation anatomique des partenaires pré- et postsynaptiques 108
2- Etude de la connectivité fonctionnelle pré/postsynaptique des Nc-LCS 109
a) Validation du modèle optogénétique et de l'approche CRACM 110
b) Analyse de la connectivité entre Nc-LCS 111
c) Les Nc-LCS forment des connexions fonctionnelles avec des interneurones lombaires spinaux ... 112
d) Propriétés des interneurones postsynaptiques aux Nc-LCS 115
3- Identification des partenaires postsynaptiques des Nc-LCS par single cell RT-PCR 116
4- Etude de la modulation de la neurotransmission par les RCPGs 119
a) Effet des RCPGs sur la connexion récurrente des Nc-LCS 120
Récepteurs métabotropiques du GABA (R-$GABA_B$) *120*
Récepteur muscarinique à l'ACh (R-mACh) *121*
Récepteur à la sérotonine (R-5HT) *123*
b) Effet des RCPGs sur la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires 123
R-$GABA_B$ *123*
R-mACh *124*
R-5-HT *125*

V - DISCUSSION 129

A- LES NC-LCS LOMBAIRES FONT PARTIE D'UNE POPULATION HOMOGENE DE NEURONES SENSORIELS 129
1- Les Nc-LCS, une population neuronale homogène le long du canal central 129
2- Propriétés électrophysiologiques intrinsèques et excitabilité 131
3- Les Nc-LCS possèdent des canaux sodiques, calciques et potassiques voltage-dépendants 132
4- Expression de récepteurs synaptiques essentiels à l'intégration des Nc-LCS au réseau locomoteur spinal 134
B- LES NC-LCS LOMBAIRES, DES NEURONES DE PROJECTION QUI PARTICIPENT A LA MODULATION D'IN MOTEURS . 136
1- Les Nc-LCS forment un réseau sensoriel récurrent au sein de la ME 136
2- Autres partenaires présynaptiques des Nc-LCS 139
3- Les Nc-LCS lombaires, des acteurs de la modulation du réseau moteur 140
C- CONSIDERATIONS TECHNIQUES 143
1- Préparation *in vitro* et limitations expérimentales 143
2- Optogénétique et analyse de la connectivité 143
3- Analyse du profil moléculaire par la RT-PCR sur cellule unique 144
4- Nc-LCS et approche de marche fictive 145
D- LE ROLE DES NC-LCS DANS LES FONCTIONS MOTRICES DANS LES MODELES AQUATIQUES ET MURINS 146
1- Rôle de la connexion récurrente des Nc-LCS dans l'activité motrice 146
2- Rôle sensoriel des Nc-LCS dans l'activité motrice 146
3- Les Nc-LCS sont intégrés au réseau moteur spinal 147

VI - CONCLUSION ET PERSPECTIVES 155

VII – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159

VII – Annexes 184

Table des Figures

Figure 1| Circulation, production et absorption du LCS 3
Figure 2| Morphologie de la moelle épinière 7
Figure 3| Les laminae de la matière grise, les afférences primaires et l'organisation somatotopique de la matière grise ventrale 8
Figure 4| Organisation du canal central de la moelle épinière 9
Figure 5| Les cellules épendymaires sont activées après une lésion de la moelle épinière 10
Figure 6| Les différents types de Nc-LCS du SNC 12
Figure 7| Répartition des Nc-LCS au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière 13
Figure 8| Morphologie des Nc-LCS chez différentes espèces de vertébrés 14
Figure 9| Les Nc-LCS : des cellules polarisées qui qui projettent une dendrite vers le CC 14
Figure 10| Des Nc-LCS distaux sont présents au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral 15
Figure 11| Les Nc-LCS présentent des structures ciliées sur le bud et/ou sur le soma 16
Figure 12|Les Nc-LCS projettent une dendrite vers le canal central et un « axone » vers le parenchyme 16
Figure 13| Les Nc-LCS expriment le canal PKD2L1 et sont GABAergiques 18
Figure 14| Développement des Nc-LCS spinaux 19
Figure 15| Les Nc-LCS expriment des marqueurs de maturité et d'immaturité à l'âge adulte 20
Figure 16| Les Nc-LCS présentent différents patrons de décharge 21
Figure 17| L'activation des R-$GABA_A$ induit des réponses dépolarisantes et hyperpolarisantes dans les Nc-LCS 24
Figure 18 |Les Nc-LCS présentent des activités synaptiques spontanées et une activité de courant unitaire 26
Figure 19| Les Nc-LCS sont GABAergiques et en contact avec des fibres GABAergiques, monoaminergiques et cholinergiques 28
Figure 20 |Les Nc-LCS forment un réseau ascendant de Nc-LCS interconnectés 29
Figure 21 |Projections axonales des Nc-LCS chez le poisson-zèbre et la lamproie 29
Figure 22 |Partenaires post-synaptiques des Nc-LCS chez le poisson-zèbre 30
Figure 23| Projections axonales des Nc-LCS chez les rongeurs 31
Figure 24| Partenaires post-synaptiques des Nc-LCS chez les rongeurs 32
Figure 25| Les Nc-LCS détectent l'acidification du milieu extracellulaire grâce à l'activation des canaux ASIC .. 33
Figure 26| L'alcalinisation augmente à la fois l'activité du canal PKD2L1 et l'excitabilité des Nc-LCS 34
Figure 27 |Un choc hypo-osmotique extracellulaire augmente fortement l'activité du canal PKD2L1 35
Figure 28 |Les Nc-LCS sont sensibles aux mouvements de fluides in vitro 35
Figure 29 |Les Nc-LCS sont sensibles aux stimuli mécaniques 36
Figure 30| La réponse sensorielle des Nc-LCS est altérée chez les mutants pour les cils mobiles 37
Figure 31| La réponse sensorielle des Nc-LCS à la courbure de la moelle épinière est altérée en l'absence de la fibre de Reissner 38
Figure 32| Modulation de la nage chez la larve de poisson-zèbre 38
Figure 33| Les Nc-LCS modulent la nage rapide et lente ainsi que la posture chez la larve de poisson-zèbre 39
Figure 34| Les Nc-LCS modulent la nage chez la lamproie 41
Figure 35| L'ablation ou l'inactivation des Nc-LCS perturbe la motricité fine et la locomotion chez la souris 42
Figure 36| Les Nc-LCS répondent à l'infection par *Streptococcus p*. et participent à la survie de l'hôte 44
Figure 37| Le cycle locomoteur de la patte arrière 46
Figure 38 |Mécanismes contrôlant le tonus postural 47
Figure 39 |Mécanismes contrôlant la locomotion via les ganglions de la base et la MLR 48
Figure 40| Préparation ex vivo de moelle épinière isolée de rongeur et enregistrement d'une activité de « locomotion fictive » 52
Figure 41|Représentation schématique du CPG chez la lamproie 53
Figure 42| L'ablation des interneurones V2a altère l'activité de nage chez la larve de poisson-zèbre 54
Figure 43| La diversité des interneurones V2a permet de contrôler la force des mouvements locomoteurs chez le poisson-zèbre adulte 55
Figure 44| Distribution des modules rythmogéniques du CPG locomoteur chez la souris 57
Figure 45 |Localisation du CPG locomoteur chez le rongeur nouveau-né 58
Figure 46 |Développement de la moelle épinière 59
Figure 47| L'élimination de vGluT2 dans les interneurones Shox2 et Hb9 diminue la fréquence de la locomotion fictive 60
Figure 48| Neurones présumés impliqués dans la genèse du rythme 61
Figure 49 |Les souris mutantes pour les interneurones V1 ont une fréquence de locomotion fictive ralentie... 62

Figure 50 |L'élimination des interneurones V1 et V2b altère la coordination des muscles fléchisseurs et extenseurs 63
Figure 51 |Neurones présumés impliqués dans l'alternance gauche-droite 64
Figure 52 |L'élimination des interneurones V0 altère l'alternance gauche-droite 65
Figure 53| L'élimination des interneurones V2a Chx10^{+} perturbe l'alternance gauche-droite 66
Figure 54 |L'élimination des interneurones dl6 perturbe l'alternance gauche-droite 67
Figure 55 |Neurones présumés responsables de l'alternance gauche-droite 68
Figure 56 |La suppression de la transmission synaptique des interneurones V3 induit un patron d'activité gauche-droit asymétrique 69
Figure 57 |Neurones présumés responsables de la synchronisation et de la symétrie des mouvements 69
Figure 58 |Les interneurones V0c modulent les sorties motrices de façon tâche-dépendante 70
Figure 59 |Neurones présumés responsables du contrôle des sorties motrices 71
Figure 60| Schéma bilan de l'organisation du réseau spinal locomoteur 71
Figure 61| Schéma des motoneurones, des fibres musculaires et des organes proprioceptifs 73
Figure 62 |Les retours des fuseaux musculaires sont essentiels pour la nage et les comportements moteurs fins 74
Figure 63 |Un organe proprioceptif intraspinal, sensible aux mouvements des vertèbres 75
Figure 64| Rôle des informations sensorielles des muscles de la patte dans la transition du cycle du pas 76
Figure 65|Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux sodiques voltage-dépendants TTX-sensibles 100
Figure 66|Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux calciques voltage-dépendants Cd^{2+}-sensibles 102
Figure 67|Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux potassiques voltage-dépendants TEA/4-AP-sensibles 103
Figure 68| Les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs ionotropiques R-Gly, R-$GABA_A$, R-Glu et R-nACh…104
Figure 69|Les récepteurs $GABA_B$ sont fonctionnels dans les Nc-LCS lombaires et inhibent les canaux Ca_V 106
Figure 70|Les récepteurs mACh sont fonctionnels dans les Nc-LCS lombaires et inhibent les canaux Ca_V 106
Figure 71| Schéma bilan des canaux et récepteurs exprimés par les Nc-LCS lombaires 107
Figure 72| Les Nc-LCS projettent vers des neurones GABAergiques et cholinergiques de la ME lombaire 109
Figure 73| Les canaux ChR2 sont fonctionnels dans les Nc-LCS de souris PKD2L1-ChR2 entre 3-6 semaines ... 110
Figure 74| Les Nc-LCS sont connectés entre eux et établissent des connexions récurrentes 112
Figure 75| Les Nc-LCS forment des contacts synaptiques fonctionnels avec des interneurones spinaux 114
Figure 76| Les Nc-LCS sont connectés avec des interneurones spinaux au niveau lombaire 114
Figure 77| Propriétés électrophysiologiques des interneurones postsynaptiques 115
Figure 78| Procédure de prélèvement des cellules d'intérêt pour l'analyse par RT-qPCR 117
Figure 79| Les Nc-LCS sont connectés avec des interneurones clés du réseau locomoteur spinal 118
Figure 80| Localisation et propriétés des interneurones spinaux connectés 119
Figure 81| L'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofène inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS 121
Figure 82| L'activation des récepteurs mACh par l'oxotrémorine-M inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS 122
Figure 83| L'activation des récepteurs 5-HT par la sérotonine inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS 123
Figure 84| L'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofène inhibe la neurotransmission de la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires 124
Figure 85| L'activation des récepteurs mACh par l'oxotrémorine-M inhibe la neurotransmission de la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires 125
Figure 86 |Connectivité et rôles supposés des Nc-LCS au niveau de la ME lombaire 149

Liste des abréviations

A

aCSF : Liquide cerebrospinal artificiel
Ach : Acétylcholine
ASIC : Acid Sensing Ionic Channels
AMPA : Acide amino-méthyl phosphorique
AHP : Post-hyperpolarisation

B

Bcl : Baclofène
BAPTA : Chélateur calcique

C

CC : Canal central
CC : Courant imposé
Cav : Canal calcique dépendant du voltage
ChR2 : ChannelRhodopsine-2
CRACM : ChannelRhodopsine-2 Assisted Circuit Mapping
CIN : Interneurone commissural
CnF : Noyau cunéiforme
CPG(s) : Générateur(s) central de patron

D

DCX : Doublecortine

F

FT : Facteur de transcription

G

GB : Globus Pallidus
Glu : Glutamate

I

I : Courant
IStep : Injection de courant
ICa : Courant calcique
IN(s) : Interneurone(s)
INaP : Courant sodique persistant

K

K_v : Canal potassique dépendant du voltage

L

LCS : Liquide cerebrospinal
LC : Locus coerelus

M

ME : Moelle épinière
MAP2 : Microtubule associated protein-2
MLR : Région locomotrice mésencéphalique
MN(s) : Motoneurone(s)
MRF : Formation réticulée médullaire

N

Nc-LCS : Neurones de contact du liquide cérébrospinal
NMDA : Acide N-methyl-D-aspartique
NMA : N-methyl-D,L-aspartate
NeuN : Neuronal Nucléique
Na_v : Canal sodique dépendant du voltage
NA : Noradrénaline

O

OxoM : Oxotrémorine-M

P

PKD2L1 : Polycystin kidney disease 2-like 1
PC : Plexus choroïdes
PA : Potentiel d'action
PBS : Tampon phosphate salin
PPN : Noyau pédonculopontin
PIR : Post inhibitory rebound

R

R-GABAA : Récepteur GABAergique
R-Gly : Récepteur glutamatergique
R-nAch : Récepteur cholinergique nicotinique
R-ATP-γ-S : Récepteur purinergique
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
R-GABAB : Récepteurs GABAB
R-mACh : Récepteur cholinergique muscarinique
R-mGlu : Récepteur glutamatergique muscarinique
RMP : Potentiel de repos membranaire
RN : Noyaux du Raphé

S

5-HT : Sérotonine
SNC : Système Nerveux Central

T

TEA : Tetraethylammonium
TRP : Transient Receptor Potential
TTX : Tétrodotoxine

V

VC : Potentiel imposé
Vm : Potentiel de maintien en CC
Vh : Potentiel de maintien en VC
VStep : Saut de potentiel

INTRODUCTION

I - INTRODUCTION

A- Rappels sur le liquide cérébrospinal et la moelle épinière

1- Le liquide cérébrospinal (LCS)

a) Généralités

Le liquide cérébrospinal (LCS) est une caractéristique du cerveau animal, qui a été conservée au cours de l'évolution (Brocklehurst, 1979). Il fournit aux cellules un environnement extracellulaire stable, indispensable à leur fonctionnement et à leur survie. En association avec le liquide interstitiel, il forme un réseau fluidique continu qui borde toutes les cellules du système nerveux central (SNC) le long de l'axe rostro-caudal.

Le LCS occupe le système ventriculaire, l'espace sous-arachnoïdien ainsi que le canal central (CC) du tronc cérébral et de la ME. Il circule le long du système ventriculaire, des ventricules latéraux via le *foramen* de Monro jusqu'au 3ème ventricule, puis au 4ème ventricule par l'aqueduc de Sylvius. A partir du 4ème ventricule, le LCS peut rejoindre le CC ou les espaces sous-arachnoïdiens. Le LCS est séparé du parenchyme par des cellules épendymaires qui tapissent la surface des ventricules et du CC, et par la pie-mère à la surface du SNC **(Figure 1)** (Brown et al., 2004 ; Strazielle et al., 2005).

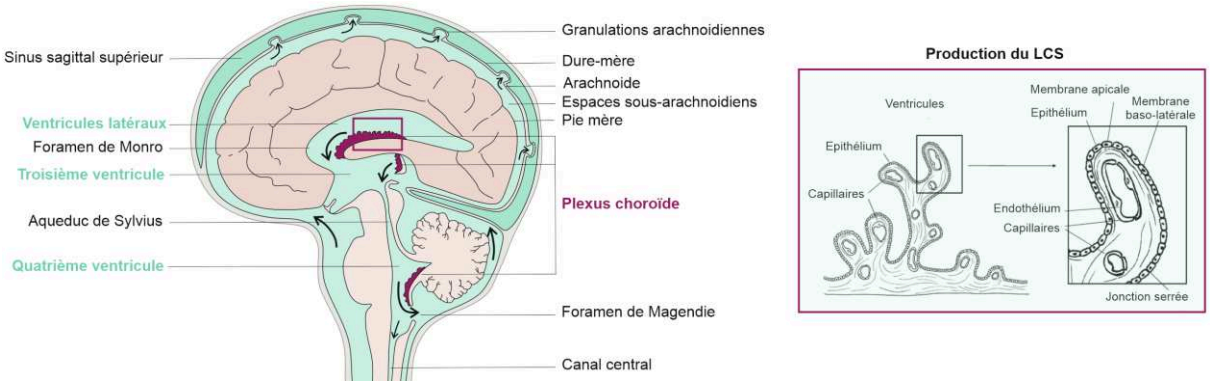


Figure 1| Circulation, production et absorption du LCS

Le LCS est produit majoritairement au niveau des plexus choroïdes (encadré pourpre), qui sont des structures ramifiées avec de nombreuses villosités dirigées vers la lumière des ventricules. Ces villosités sont tapissées de cellules épendymaires, connectées par des jonctions serrées. Le LCS circule au niveau des ventricules, des espaces arachnoïdiens et du CC du tronc cérébral et de la ME (flèches). Il est ensuite absorbé au niveau des espaces sous-arachnoïdiens par les granulations arachnoïdiennes (Adaptée de Brown et al., 2004 ; Oreskovic & Klarica, 2010).

Pour maintenir l'équilibre métabolique du SNC, le LCS est constamment renouvelé. Chez l'humain, il est remplacé quatre fois par jour, soit environ 600 mL au total (Sakka et al., 2011). Bien que relativement constante, la production de LCS varie au cours de la journée avec un pic après minuit (Nilsson et al., 1992). Elle dépend également de l'âge, avec une production d'environ 500 mL/jour chez les jeunes contre 250 mL/jour chez les personnes âgées (Reiber, 2003).

Chez la souris, un volume total de 40 µL est renouvelé 12 à 13 fois par jour (Simon & Iliff, 2016). Certains facteurs tels que l'anesthésie (isoflurane < kétamine/xylazine), l'âge ou la présence de protéines amyloïde β (Aβ) peuvent réduire la production de LCS. De façon surprenante, les souris femelles produisent environ 30 % de plus de LCS, que les mâles du même âge (Liu et al., 2020).

b) Mécanisme de sécrétion du LCS par les Plexus Choroïdes

La synthèse de LCS se fait principalement au niveau des plexus choroïdes, puisqu'ils sont responsables d'environ 75 % de sa production chez l'homme. Le LCS est sécrété par les cellules

épithéliales des plexus choroïdes (PC) au niveau des ventricules latéraux, du 3ème ventricule et du 4ème ventricule (Brown et al., 2004 ; Sakka et al., 2011). Les PC sont des structures ramifiées avec de nombreuses villosités qui projettent dans les ventricules. Ils sont composés d'une couche de cellules épithéliales ciliées, de tissus conjonctifs et de capillaires fenestrés **(Figure 1)**. Bien que le passage de petites molécules, d'ions et d'eau en provenance du sang soit facilité par la fenestration des capillaires, les cellules épithéliales, reliées par des jonctions serrées de type *Zonula Occludens*, forment une barrière étanche entre le sang et le LCS (Brightman & Reese, 1969).

La production de LCS par les plexus choroïdes se déroule en deux étapes. D'abord, une filtration passive du plasma (sous l'effet d'un gradient de pression), des capillaires fenestrés vers le milieu interstitiel choroïdien. Ensuite, un transport actif se fait depuis le milieu interstitiel vers la lumière des ventricules, grâce à l'expression polarisée de canaux ioniques, de transporteurs et de récepteurs protéiques, à la membrane apicale et basolatérale de l'épithélium choroïdien (Brown et al., 2004 ; Sakka et al., 2011). Ainsi la sécrétion de LCS repose sur le transport unidirectionnel d'ions du sang vers les ventricules, créant un gradient osmotique qui entraine un mouvement d'eau *via* les aquaporines-1 (AQP1) (Jessen et al., 2015).

Outre la fonction de barrière, les cellules épithéliales, présentent également des caractéristiques similaires à celles des cellules sécrétrices, avec une membrane apicale pourvue d'une structure en brosse, de nombreuses mitochondries, et d'un réticulum endoplasmique développé (Brown et al., 2004). Ainsi, en plus de produire le LCS, les PC peuvent également sécréter des polypeptides tels que la vasopressine et des facteurs de croissance (IGF II : Insulin-like growth factor II, TGFβ : Transforming growth factor) (Redzic & Segal, 2004).

c) Composition du LCS

Le LCS est un mélange d'eau, de protéines, d'ions, de neurotransmetteurs et de glucose. Sa composition est relativement proche de celle du plasma, bien que la concentration en protéines soit nettement plus faible dans le LCS (Reiber, 2003). Par ailleurs, le LCS n'est pas un simple produit de filtration plasmatique, mais résulte d'un transport ionique régulé. Dans le LCS, les concentrations en ions Na^+, Cl^- et Mg^{2+} sont plus élevées que celles du plasma, tandis que les celles de K^+ et Ca^{2+} sont plus faibles. Certaines concentrations ioniques, indépendantes des variations plasmatiques, sont étroitement régulées grâce à la sécrétion active du LCS par les PC (Bradbury & Sarna, 1977). La majorité des protéines présentes dans le LCS proviennent du plasma, et l'albumine représente jusqu'à 80 % des protéines totales. Le LCS contient également la transthyrétine, synthétisée à 90 % par les PC, qui transporte l'hormone thyroïdienne et le rétinol (Reiber, 2003). Cette protéine jouerait plusieurs rôles, notamment dans la régénération neuronale et la dégradation du peptide Aβ (Vieira & Saraiva, 2014). Des neurotransmetteurs et neuropeptides sont également présents. Le passage de ces protéines du plasma vers le LCS peut se faire soit par diffusion, en fonction du gradient de concentration, soit par transcytose *via* des récepteurs spécifiques (Redzic et al., 2005). De plus, pour maintenir l'homéostasie du SNC, le pH, l'osmolarité et la pression du LCS sont finement régulés pour assurer une stabilité constante (Brown et al., 2004 ; Oreskovic & Klarica, 2010).

d) Circulation et absorption du LCS

Le LCS circule de manière dynamique, depuis les sites de sécrétion jusqu'aux sites d'absorption. Il se déplace du système ventriculaire vers les espaces sous-arachnoïdiens (situés entre l'arachnoïde et la pie mère au niveau cérébral et spinal) ainsi que vers le CC du tronc cérébral et de la ME. Le flux de LCS semble dépendre de deux types de mouvements. Le

premier est unidirectionnel, alimenté par un gradient de pression hydrostatique, avec une pression élevée au niveau des plexus choroïdes et une pression plus faible au niveau des granulations arachnoïdiennes (Wichmann et al., 2021). Cependant, d'autres études suggèrent que le déplacement du LCS présente également une composante pulsatile. Le flux pulsatile serait bidirectionnel dans la ME (sens rostro-caudal), et multidirectionnel dans le cerveau. Cette pulsatilité serait liée aux pulsations cardiaques et aux variations de pression intrathoracique transmises au LCS via le système veineux (Klarica et al., 2019). Par ailleurs, les cils des cellules épendymaires participeraient également à la circulation du LCS (Banizs et al., 2005).

Le LCS est principalement absorbé dans les espaces sous-arachnoïdiens crâniens et spinaux. Il est réabsorbé dans la circulation sanguine par un gradient de pression qui se forme au niveau des villosités arachnoïdiennes. Ces villosités sont des protrusions de l'arachnoïde, recouvertes d'endothélium, qui créent des évaginations dans la lumière du sinus veineux. La résorption peut également se produire le long des nerfs crâniens et spinaux, dans les espaces sous-arachnoïdiens, d'où le LCS est ensuite drainé par le système lymphatique **(Figure 1)** (Sakka et al., 2011).

e) Fonctions du LCS

Le LCS remplit de nombreuses fonctions qui sont cruciales pour le bon fonctionnement du SNC. Tout d'abord, il joue un rôle protecteur en absorbant les chocs, limitant ainsi les dommages potentiels causés par le contact entre le cerveau et le crâne. De plus, il offre un support mécanique au cerveau. En réduisant son poids de plus de 30 %, il diminue ainsi la pression exercée sur la base du cerveau (Segal, 1993). Le LCS fournit également des nutriments et assure l'homéostasie du SNC, en maintenant notamment des concentrations ioniques extracellulaires stables (Bradbury & Sarna, 1977).

Une autre fonction majeure du LCS est le drainage des déchets métaboliques du SNC. En raison de leur sensibilité à l'environnement et de leur production élevée de métabolites, les neurones nécessitent une élimination rapide et efficace de ces déchets. Parmi ces sous-produits issus de l'activité cellulaire, on trouve des protéines comme l'amyloïde β (Aβ), qui accumulées dans l'espace interstitiel cérébral, peuvent perturber la transmission synaptique, modifier la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et causer des lésions neuronales irréversibles (Kuchibhotla et al., 2008 ; Sen Gupta et al., 2009). Dans le SNC, c'est le système glymphatique qui est responsable de l'élimination de ces sous-produits métaboliques, avec la circulation du liquide interstitiel et du LCS (Hablitz & Nedergaard, 2021).

Chez la souris, la circulation du LCS peut être suivie *in vivo* par imagerie biphotonique à l'aide de traceurs fluorescents. Les travaux de Xie et collaborateurs montrent que chez les souris endormies, la circulation du LCS et le volume interstitiel cortical sont augmentés (60 %), comparés aux souris éveillées, facilitant ainsi les échanges entre le LCS et le liquide interstitiel. De plus, ils observent que l'élimination de la protéine Aβ est deux fois plus rapide chez les souris endormies, soulignant le rôle essentiel du LCS dans l'évacuation des déchets métaboliques (Xie et al., 2013 ; Boespflug & Iliff, 2018).

Le LCS semble également jouer un rôle dans divers aspects du comportement animal. Par exemple, des études sur des moutons ont montré que l'injection de LCS d'un donneur à jeun, dans le troisième ventricule d'un receveur, qu'il soit rassasié ou à jeun, entraine une augmentation de la prise alimentaire. Ces résultats suggèrent que la composition du LCS varie en fonction des réserves énergétiques (Heinrich Martin et al., 1973). Une autre expérience montre que des chats, ayant reçu du LCS de chèvres privées de sommeil pendant 72 heures, tombent dans un profond sommeil pendant 12 à 24 heures (Pappenheimer et al., 1967). Ainsi,

en assurant un *continuum* le long de l'axe rostro-caudal, le LCS il est aujourd'hui considéré comme une voie de transmission volumique, facilitant le transport de molécules actives ou de nutriments sur de longues distances (Agnati et al., 2010). Récemment, des études *in vitro* sur des tranches de cerveau et des cultures neuronales, ont démontré que le LCS humain contient effectivement des neuromodulateurs capables d'influencer l'activité neuronale (Bjorefeldt et al., 2018).

Par ailleurs, le LCS serait impliqué dans le neurodéveloppement, grâce au transport de molécules sécrétées au niveau des plexus choroïde, tels que des facteurs de croissance et des morphogènes, nécessaires à la migration des neuroblastes, à la prolifération et la neurogenèse des cellules progénitrices en contact avec le LCS (Redzic et al., 2005 ; Orts-Del'Immagine & Wyart, 2017). La circulation du LCS jouerait également un rôle dans la morphogenèse aux stades embryonnaire et adulte, puisque son l'altération conduit à une courbure anormale de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre (Grimes et al., 2016 ; Sternberg et al., 2018).

2- La moelle épinière

La ME est la partie la plus caudale du SNC. Elle s'étend depuis la base du crane (tronc cérébral) jusqu'à la région lombaire. Protégée par la colonne vertébrale, elle-même composée de 33 vertèbres articulées, la ME est entourée par cinq groupes de vertèbres : 7 vertèbres cervicales, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrées et 4 coccygiennes. La flexibilité de la colonne vertébrale jusqu'au *sacrum*, est assurée par les disques intervertébraux (composés de ligaments circulaires concentriques avec un noyau liquide sous pression en leur centre) qui absorbent les chocs, ainsi que des ligaments, des capsules et des tendons qui relient les vertèbres entre elles et contribuent à la stabilité et aux mouvements (Gruener & Biller, 2008).

a) Anatomie globale

La ME est logée dans le canal vertébral, au centre de la colonne vertébrale. Chez l'humain, elle comprend 31 segments nerveux, organisés de manière rostro-caudale en cinq segments : cervicaux (8), thoraciques (12), lombaires (5), sacrés (5) et coccygien (1), avec les parties cervicales et lombaires présentant un élargissement caractéristique. Il est à noter que le nombre de segments peut varier selon les espèces. Chaque segment est associé à une paire de nerfs rachidiens (un à droite et un à gauche). Ces nerfs comprennent des racines nerveuses dorsales sensorielles, qui pénètrent dans la ME (afférences) avec les corps cellulaires contenus dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG), et des racines ventrales motrices (efférences), qui en émergent. Chaque segment spinal est relié à une paire de nerfs innervant différentes zones cutanées et groupes musculaires, formé des unités fonctionnelles appelées métamères. Les segments cervicaux innervent les muscles responsables de la respiration, des mouvements de la tête, du cou et des bras. Les segments thoraciques contrôlent les muscles des doigts, du thorax, du dos et de la paroi abdominale. Quant aux segments lombaires et sacrés, ils sont impliqués dans la locomotion, la miction, ainsi que les fonctions intestinales et reproductrices **(Figure 2)** (Gruener & Biller, 2008).

Sur une coupe transversale, la ME est composée de deux substances distinctes. La substance blanche, située en périphérie, est constituée de fibres axonales myélinisées ascendantes (sensorielles) et descendantes (motrices), qui relient le cerveau, la ME et la périphérie. En son centre, se trouve la substance grise, reconnaissable à sa forme en papillon, qui abrite les corps cellulaires et le CC, à l'intérieur duquel circule le LCS. Autour de la ME, se trouve les méninges, trois membranes qui la protègent : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-

mère. Un réseau étendu de vaisseaux sanguins fournit en permanence oxygène et nutriments à la ME **(Figure 2)** (Gruener & Biller, 2008 ; Guertin, 2013).

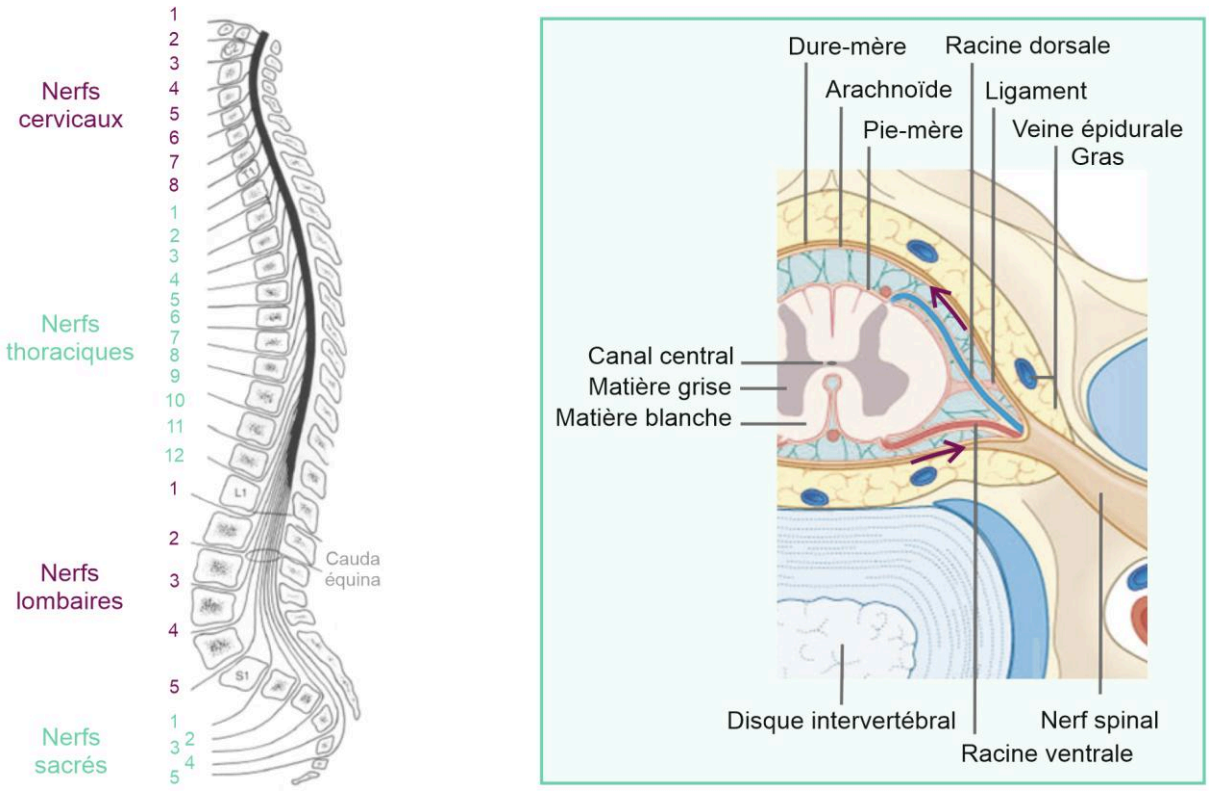


Figure 2| **Morphologie de la moelle épinière**

(A) Localisation de la ME humaine (en noir) et la localisation des divers nerfs spinaux. La majorité des segments spinaux (cervical, thoracique, lombaire et sacré) sont localisés plus haut que les vertèbres correspondantes. **(B)** Schéma illustrant une coupe coronale de la colonne vertébrale, avec au centre, la ME, composée de la matière blanche (extérieur) et de la matière grise (intérieur). Celle-ci est entourée par trois membranes : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Les fibres sensorielles (axones dont les corps cellulaires sont localisés dans les DRG (ganglions des racines dorsales) entrent dans la ME par les racines dorsales (en bleu), alors que les axones des motoneurones la quittent par les racines ventrales (en rouge). Adapté de Jankowska, 2013 et Gruener & Biller, 2008.

b) La substance blanche

La substance blanche, située à la périphérie, contient des axones afférents et efférents organisés en faisceaux. Les voies afférentes sont principalement regroupées dans la région dorsale et périphérique, tandis que les voies efférentes sont situées en position ventro-médiane. Les voies nerveuses ascendantes transmettent des informations sensorielles de la périphérie vers les centres supraspinaux. Ces informations sont essentiellement des sensations du toucher (température, douleur), de pression, de vibration et de proprioception. Les voies descendantes, quant à elles, transmettent des commandes motrices depuis les centres supraspinaux vers les muscles. Elles sont divisées en plusieurs catégories. La voie pyramidale (ou corticospinale) est impliquée dans les mouvements fins, et prend majoritairement naissance dans le cortex moteur primaire ainsi que dans le cortex moteur secondaire et somatosensoriel (ainsi que dans quelques noyaux du tronc cérébral). La voie extrapyramidale, qui part du tronc cérébral, contrôle les mouvements involontaires et automatiques, comme la posture et la locomotion (Gruener & Biller, 2008 ; Guertin, 2013).

c) La substance grise

La substance grise, située au centre de la ME autour du CC, est composée de neurones de diverses tailles, morphologies et densités. Sur des coupes transversales de ME de chat, Bror Rexed a identifié en 1954, des couches appelées *laminae*, avec des cytoarchitectures différentes. Il a ainsi divisé la substance grise en 10 régions : les neuf premières (I à IX) allant

de la région dorsale à la région ventrale, et la dixième (X) entourant le CC. Des études menées sur des rongeurs (Molander et al., 1984), des primates, et chez l'Homme (Sengul, 2013) ont montré que cette organisation en couches, est globalement similaire chez tous les mammifères.

La substance grise peut également être divisée en trois régions fonctionnelles : la corne dorsale, la région intermédiaire, et la corne ventrale. La corne dorsale est impliquée dans la transmission de l'information sensorielle de la périphérie vers les centres supraspinaux. Les récepteurs sensoriels (nocicepteurs, thermorécepteurs, mécanorécepteurs) détectent les stimuli et les transmettent via les afférences sensorielles aux *laminae* I à VI de la corne dorsale. La corne ventrale est essentielle pour l'exécution et la génération des comportements moteurs. Elle contient des motoneurones organisés en groupes selon une carte somatotopique. Dans la ME lombaire, les interneurones ventraux forment un réseau appelé générateur central de patron (CPG : Central Pattern Generator), qui orchestre l'activation rythmique des différents groupes de motoneurones et des muscles qu'ils innervent, permettant ainsi l'alternance dans l'activité des muscles fléchisseurs et extenseurs, ainsi que des muscles des membres gauches et droits. La région intermédiaire de la ME, qui reçoit des informations des neurones proprioceptifs, extéroceptifs et corticospinaux, pourrait jouer un rôle crucial dans l'intégration des informations sensorielles et des commandes motrices descendantes, afin d'affiner la production d'une activité motrice coordonnée **(Figure 3)** (Nógrádi & Vrbová, 2006 ; Osseward & Pfaff, 2019).

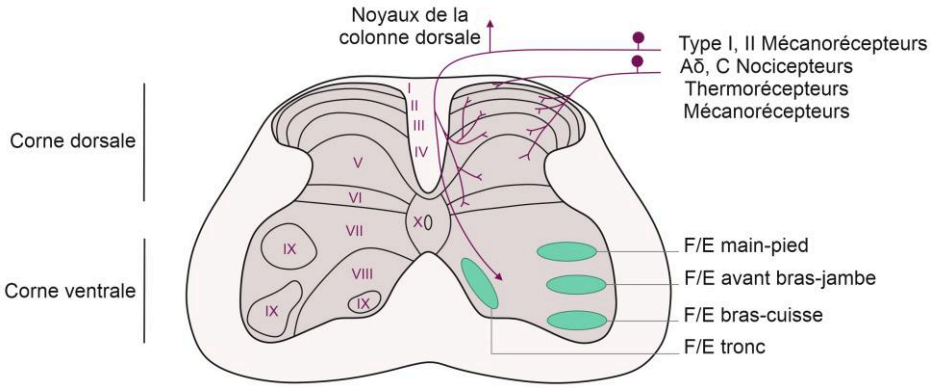


Figure 3 | Les *laminae* de la matière grise, les afférences primaires et l'organisation somatotopique de la matière grise ventrale

(Gauche) Organisation de la matière grise de la ME, en 10 régions, appelées *laminae*. **(Droite)** Les *laminae* de la corne dorsale reçoivent les informations sensorielles provenant de la périphérie grâce à des récepteurs sensoriel (nocicepteurs, thermorécepteurs, mécanorécepteurs), alors que la corne ventrale, qui reçoit majoritairement des informations des centres supraspinaux, est impliquée dans la génération et l'exécution des comportements moteurs. Elle contient entre autres des motoneurones organisés en groupes (vert), innervant des muscles fléchisseurs et extenseurs (F/E) de membres particuliers.

d) Le canal central : une région complexe, diversifiée et plastique

Au centre de la ME se trouve le CC qui contient le liquide cérébrospinal (LCS). C'est une structure tubulaire tapissée d'un épithélium, formé par une couche de cellules épendymaires. Ce canal, présent au niveau du tronc cérébral et de la ME est une région particulièrement hétérogène. Il est constitué d'un épithélium épendymaire pseudo-stratifié, de tanycytes, qui établissent un lien entre les capillaires sanguins et le LCS grâce à leurs longs prolongements, des cellules de la glie radiaire, des cellules souches, et des progéniteurs (Seitz et al., 1981 ; Bruni & Reddy, 1987 ; Hugnot, 2012). On trouve également une population neuronale particulière, objet de mon travail de thèse, qui est localisée autour du CC, soit dans la zone sous-épendymaire, soit dans cette même couche épendymaire (intra-épendymaire). Ces neurones, appelés neurones de contact du liquide cérébrospinal (Nc-LCS), étendent une dendrite vers la lumière du CC, qui se termine par une protrusion en contact direct avec le LCS. En raison de leur emplacement stratégique entre le LCS et le parenchyme, il a été suggéré

que ces neurones pourraient jouer un rôle d'intérocepteur dans la ME (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989). Autour du CC, on trouve également des neurones, des cellules gliales, des vaisseaux sanguins et des péricytes. Ces derniers entourent les vaisseaux sanguins, et forment une partie active de la barrière hémato-encéphalique **(Figure 4A et 4B)** (Bernstock et al., 2014 ; Hugnot, 2012 ; Marichal et al., 2017).

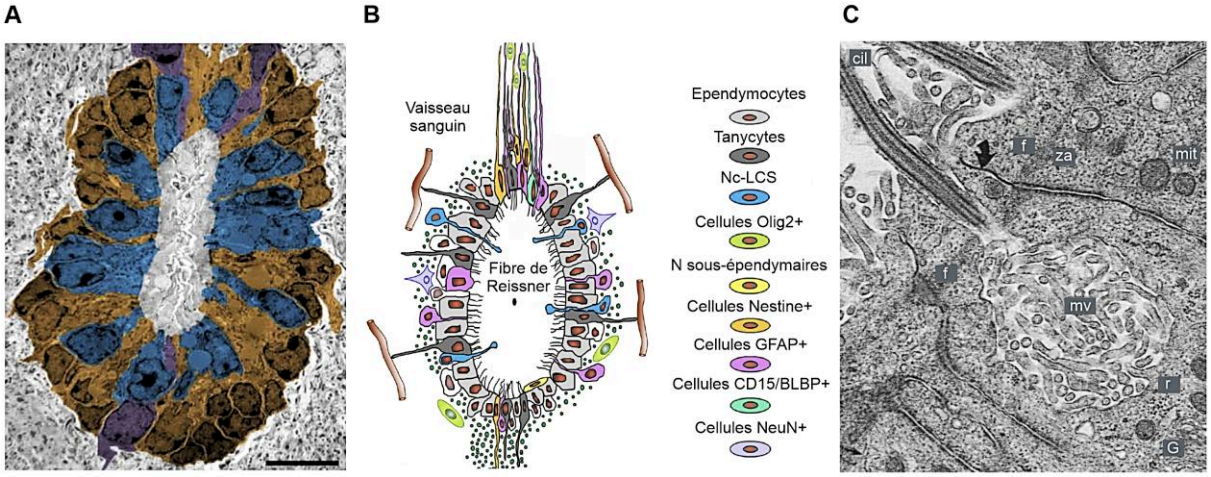


Figure 4| Organisation du canal central de la moelle épinière

(A) Microscopie électronique à transmission (MET) couplée à un marquage immunohistochimique sur une tranche coronale de ME de souris FoxJ1-CreER (FoxJ1 : facteur de transcription régulant l'expression des cils mobiles dans les cellules). Les pseudocouleurs permettent de différencier les tanycytes (en jaune), les cellules épendymaires (en bleu) et les neurones au contact du LCS (en violet) autour du CC (Barre d'échelle : 10 µm ; Meletis et al., 2008). **(B)** Représentation schématique des différents types cellulaires présents autour du CC de la ME (Hugnot, 2011). **(C)** Microscopie électronique à transmission (MET) de la partie apicale d'une cellule épendymaire, montrant la présence de mitochondries (mit), d'appareils de Golgi (G), de ribosomes (r), de filaments (f), de microvillosités (mv) et d'un cil (cil). Les cellules sont attachées entre elles par des jonctions adhérentes de types *zonula adherens* (za) (Bruni & Reddy, 1987).

De manière générale, que ce soit au niveau des cavités intraventriculaires cérébrales ou du CC bulbo-spinal, le LCS est séparé du reste du parenchyme par un épithélium cubique unistratifié. Cet épithélium est composé de cellules épendymaires reliées entre elles par des jonctions communicantes (jonction GAP) et des jonctions adhérentes de type *Zonula adherens*. Il forme ainsi une barrière entre le liquide interstitiel et le LCS, bien que certains échanges soient possibles par l'absence de jonction serrées (Bruni & Reddy, 1987 ; Abbott, 2004). Les cellules épendymaires possèdent également des cils mobiles, en contact avec le LCS (Privat, 1977) qui participent à la circulation de ce-dernier **(Figure 4C)** (Banizs et al., 2005). Les cils sont de petits appendices (0,25 µm de diamètre) situés à la surface apicale des cellules, constitués de faisceaux parallèles de microtubules d'α-tubuline acétylée (α-Tub. Ac.), ancrés à la cellule au niveau du corps basal (Piperno & Fuller, 1985). Les cils mobiles ont notamment été impliqués dans la migration cellulaire, la reproduction sexuelle, le mouvement des fluides ou le développement cérébral (Ringers et al., 2020).

La couche épendymaire du CC de la ME est particulièrement connue pour son rôle dans le développement embryonnaire et sa fonction de niche (Hugnot, 2012). Ainsi, le CC de la ME constituerait, en plus de la zone sous-ventriculaire et de la zone sous-granulaire, une niche de cellules souches du SNC (Hugnot, 2012). En plus des cellules souches, une niche est composée de progéniteurs (neuronaux et d'oligodendrocytes), de cellules endothéliales, astrogliales et épendymaires. Elle forme un microenvironnement capable d'intégrer des facteurs intrinsèques et extrinsèques, et de réguler ainsi la quiescence, l'activation, l'auto-renouvellement et la survie des cellules souches (Bernstock et al., 2014).

La découverte de cellules souches multipotentes au niveau du CC et dans le parenchyme de la ME de mammifères adultes remonte à la fin des années 1990. Ces cellules, isolées *in vitro* chez le rat et la souris, peuvent former des neurosphères, capables d'auto-

renouvellement, de multiplication et de différenciation en plusieurs types cellulaires. Bien que la plupart des cellules épendymaires soient quiescentes en conditions physiologiques, une certaine prolifération a été observée aux extrémités dorsales et ventrales du CC. Ces cellules épendymaires, avec une morphologie de glie radiaire, étendent leurs processus vers la substance blanche. De plus, certaines d'entre elles sont positives pour la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), la nestine, le CD15, et la protéine de liaison aux lipides du cerveau (BLBP), des marqueurs de cellules souches. De nombreuses cellules présentes au niveau du CC expriment également Sox2^{+}(Shy-related high mobility group box transcription factor 2), un marqueur de cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler, caractéristique des cellules quiescentes. Les péricytes ont aussi été identifiés comme une source importante d'astrocytes, ce qui leur confère des propriétés semblables à celles des cellules souches. Ces astrocytes contribuent majoritairement à l'astrogliose en cas de lésion (Hugnot, 2012 ; Bernstock et al., 2014).

Certaines études suggèrent que l'épendyme des mammifères pourrait conserver des propriétés similaires à celles observées chez les vertébrés inférieurs, favorisant ainsi des mécanismes de réparation. Chez la souris et le rat, les cellules épendymaires de la région du CC réagissent à une lésion par une prolifération endogène limitée, en se différenciant principalement en cellules gliales impliquées dans la formation de la cicatrice. Ces mécanismes de réparation endogène postnatale pourraient être liés à la présence de cellules progénitrices semblables à celles de l'embryon (Meletis et al., 2008 ; Mothe & Tator, 2005). C'est pour cette raison, que la région du CC est considérée comme une structure plastique **(Figure 5A et 5B)**.

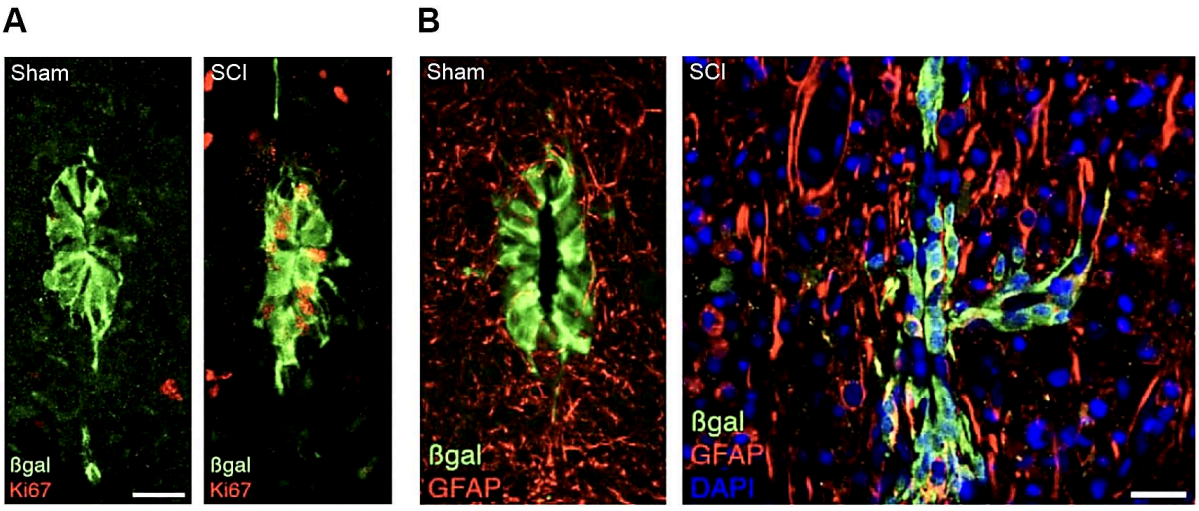


Figure 5| Les cellules épendymaires sont activées après une lésion de la moelle épinière

(A) Microscopies confocales sur des tranches coronales de ME, après immunomarquage βgal^{+} (en vert), marqueur des cellules épendymaires et des cellules Ki67^{+} (en rouge), marqueur des cellules en prolifération autour du CC chez une souris Sham (à gauche) ou chez une souris avec une lésion de la ME (SCI, à droite). **(B)** Immunomarquage des cellules βgal^{+} (en vert) et GFAP^{+} (astrocytes, en rouge), sur des tranches coronales de souris Sham (à gauche) et SCI (à droite, échelle : 25 µm) (Meletis et al., 2008).

e) Fonctions de la moelle épinière

La ME, est une structure organisée et complexe jouant un rôle central dans le système nerveux, puisqu'elle permet un lien sensoriel et moteur entre le cerveau et la périphérie. Elle transmet les informations de la périphérie vers le cerveau tout en recevant des commandes des centres supraspinaux. En outre, la ME a la capacité d'intégrer et de modifier ces signaux, grâce à un réseau de neurones qui travaillent en synergie avec le reste du SNC. Cette complexité permet à la ME de contrôler trois fonctions majeures : les fonctions sensorielles (douleur, température, toucher et proprioception), autonomes (composantes sympathiques

et parasympathiques) et motrices (réflexes et locomotion). Certains de ces points seront développés dans l'Introduction, Section I C.

B- Les Neurones de contact du liquide cérébrospinal : des neurones sensoriels au centre de la moelle épinière

1- Découverte des Nc-LCS

En 1871, grâce à l'imprégnation argentique, Landolt observe des cellules particulières dans la rétine de différents amphibiens. Ces cellules sont des neurones bipolaires dont la dendrite traverse la rétine et se termine par une structure élargie appelée « Landolt's club ». Les cellules bipolaires rétiniennes de Landolt sont ainsi les premiers neurones identifiés comme étant en contact avec le liquide cérébrospinal (LCS) (Vigh et al., 1983).

En 1921 et 1922, Kolmer (Kolmer, 1921) et Agduhr (Agduhr, 1922) décrivent des neurones similaires situés au niveau du troisième ventricule et du CC de nombreux vertébrés. Ce n'est qu'en 1969 que Vigh et collaborateurs introduisent le terme de « Neurones de contact du liquide cérébrospinal » (Nc-LCS), pour désigner l'ensemble des neurones du SNC en contact avec le LCS via leur dendrite, soma ou axone et proposent la notion de système neuronal (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989). L'appellation « cellules de Kolmer et Agduhr » (KA cells) a ensuite été introduite par Dale pour différencier les cellules en contact avec le LCS, des cellules épendymaires ciliées chez les quadrupèdes (Dale et al., 1987).

Après l'avènement de la microscopie électronique dans les années 1930, les recherches se sont intensifiées chez de nombreuses espèces et les Nc-LCS ont été observés chez plus de 200 vertébrés (Vígh et al., 2004). De par leur localisation, Vigh et collaborateurs ont suggéré dès 1987 qu'ils pourraient jouer un rôle d'intérocepteur, un système sensoriel intrinsèque au SNC, qui lui permettrait de « sentir » son propre état physiologique (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989).

Bien que ces neurones soient largement conservés chez de nombreux vertébrés, leur rôle chez les mammifères reste encore peu connu, et les fonctions proposées sont principalement basées sur des études morpho-phénotypiques.

2- Localisation et distribution des Nc-LCS

Les Nc-LCS sont définis comme l'ensemble des neurones du SNC qui interagissent avec le LCS *via* leur dendrite, leur soma ou leur axone (Jalalvand et al., 2018 ; Vígh et al., 2004 ; Vigh & Vigh-Teichmann, 1998). Cette définition englobe automatiquement une population hétérogène, notamment en termes de localisation : intra-SNC, intra-structurelle et intra-régionale.

Les Nc-LCS sont présents dans diverses régions cérébrales, telles que l'hypothalamus, les organes *circum* ventriculaires, les aires photoréceptrices, le télencéphale (Vigh & Vigh-Teichmann, 1998 ; Jalalvand et al., 2018 ; Vígh et al., 2004), ainsi que le long du CC du tronc cérébral et de la ME **(Figure 6)** (Vígh et al., 2004).

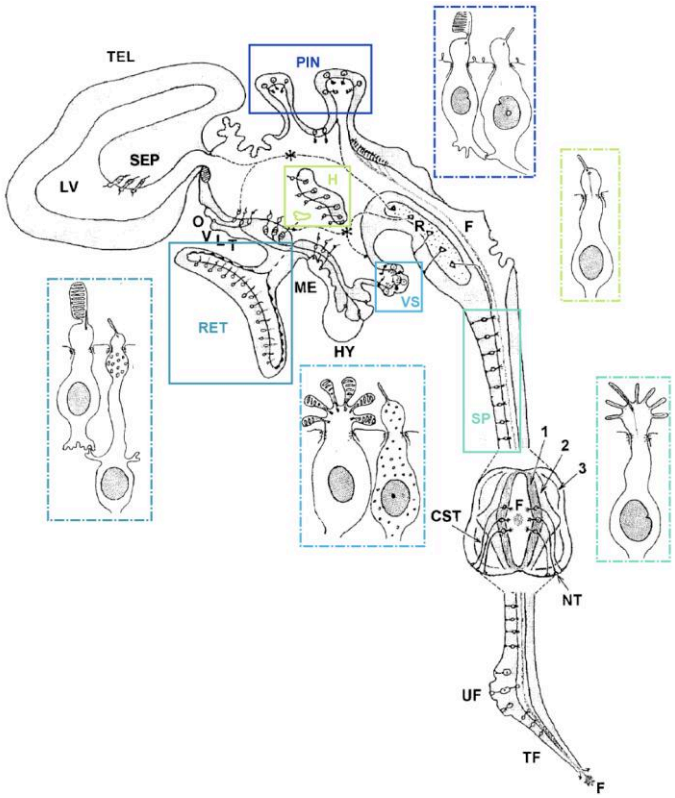


Figure 6| Les différents types de Nc-LCS du SNC

Représentation schématique de la localisation et de la morphologie des cellules au contact du LCS dans le SNC. Ces cellules ont notamment été observées au niveau de la rétine (RET), de l'hypothalamus (H), de la glande pinéale (PIN), du sac vasculaire (VS) et au niveau de la médulla et de la moelle épinière (SP). C : cellule coronet ; CST : Trajet centro-superficiel ; F : Fibre de Reissner ; Hy : Hypophyse ; LC : cellules de Landolt ; LV : Ventricule latéral ; ME : Eminence médiane ; NT : Terminaisons neuro-hormonales ; OVLT : Organe vasculaire de la lame terminale ; R : Noyau du Raphé ; SEP : Aire septale ; SCO : Organe sous-commissural ; TEL : Télencéphale ; TF : Filum terminal ; UF : Urophyse ; Astérisques : Nc-LCR intra-ventriculaires (Adapté de Vigh et al., 1998).

Les Nc-LCS du tronc cérébral et de la ME (bulbo-spinaux) sont présents tout le long de l'axe rostro-caudal autour du CC et sont caractérisés par l'expression sélective du sous-type polycystine des canaux « Transient Receptor Potential » (TRP), aussi appelé Polycystine Kidney Disease 2- Like 1 channel (PKD2L1 ; voir ci-dessous). Toutefois, leur distribution varie en fonction des segments et des espèces étudiées. Chez le rat, les Nc-LCS sont plus nombreux au niveau thoracique qu'au niveau cervical et sont même totalement absents dans le tronc cérébral (Shimosegawa et al., 1986). En revanche, chez la souris (Orts-Del'Immagine et al., 2014) et le poisson zèbre (Djenoune et al., 2014), les Nc-LCS sont présents tout au long de l'axe, avec une densité croissante du tronc cérébral vers les régions caudales de la ME **(Figure 7A)**.

La répartition des Nc-LCS varie également autour du CC le long de l'axe rostro-caudal. Chez la souris, les Nc-LCS du tronc cérébral ont une distribution principalement latérale, qui tend vers une organisation dorso-ventrale au niveau cervical **(Figure 7B)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014, 2017). Chez le poisson zèbre, il existe deux populations de Nc-LCS : une ventrale et une dorsale (Djenoune et al., 2014). Et enfin chez la lamproie, les Nc-LCS présentent une organisation majoritairement latérale, bien que certains soient éloignés du CC (Jalalvand et al., 2014).

La population de Nc-LCS bulbo-spinaux peut également montrer des variations au cours du développement. À la naissance, la formation du CC n'est pas encore achevée. Des changements, tels que la fermeture de la couche de cellules épendymaires aux pôles ventral et dorsal, peuvent encore survenir au cours des premières semaines postnatales. Pendant le développement, le nombre de Nc-LCS est divisé par trois et ces neurones passent d'une

localisation intra-épendymaire à une position sous-épendymaire (Kutna et al., 2013). Ces résultats sont corroborés par une étude d'Orts Del Immagine et collaborateurs, qui montre également que chez la souris, les Nc-LCS bulbo-spinaux s'éloignent progressivement du CC avec l'âge, à l'exception des Nc-LCS ventraux **(Figure 7B)** (Orts-Del'Immagine et al., 2017).

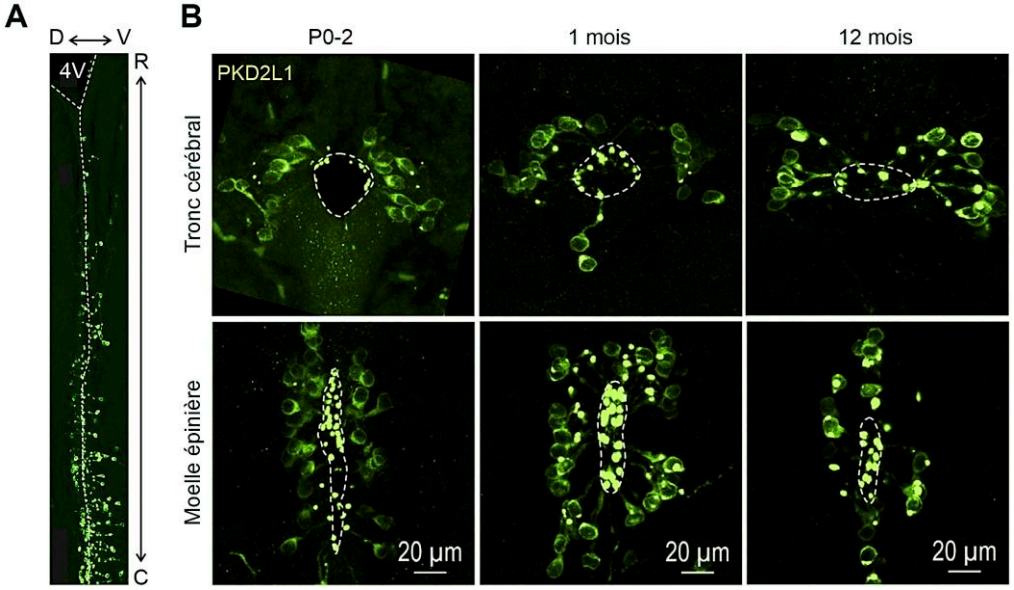


Figure 7| Répartition des Nc-LCS au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière

(A) Microscopie confocale d'une coupe sagittale de la région du tronc cérébral, montrant l'organisation des cellules PKD2L1$^+$ (vert) le long du CC (pointillés blancs), suivant l'axe rostro-caudal, du quatrième ventricule (4V) jusqu'au tronc cérébral inférieur (orientation dorso-ventrale : D-V, rostro-caudale (R-C) (Adaptée de Orts-Del'Immagine et al., 2014). **(B)** Coupes coronales de tronc cérébral et de ME, montrant la répartition des cellules PKD2L1$^+$ autour du CC, de souris à différents âges (orientation : partie dorsale vers le haut) (Adaptée de Orts-Del'Immagine et al., 2017).

Malgré leur hétérogénéité en termes de localisation et de distribution, les Nc-LCS conservent des caractéristiques communes. Dans la suite de l'introduction, je me concentrerai uniquement sur les caractéristiques des Nc-LCS bulbo-spinaux.

3- Morphologie des Nc-LCS bulbo-spinaux

Le terme Nc-LCS, désigne l'ensemble des neurones du SNC qui entrent un contact avec le LCS par le biais de leur dendrite, leur soma ou leur axone (Vigh & Vigh-Teichmann, 1998). Cette définition implique également des différences morphologiques intra- et inter-espèces.

Bien que les Nc-LCS présentent certaines particularités, ces cellules partagent néanmoins des caractéristiques morphologiques communes, telles que la bipolarité et l'extension d'une dendrite vers la lumière du CC, ce qui en fait une population neuronale relativement conservée chez les vertébrés (Djenoune et al., 2014 ; Vígh et al., 2004). En effet, les Nc-LCS bulbo-spinaux sont décrits comme des neurones bipolaires, avec un soma situé dans la couche épendymaire. Ces neurones projettent une dendrite vers la lumière du CC, qui se termine par une protrusion au contact du LCS, appelée bud. Ils possèdent également un prolongement axonal qui part du soma pour s'étendre dans le parenchyme.

Le corps cellulaire de ces neurones est plus ou moins enchâssé dans la couche de cellule épendymaire, qui sépare le LCS du reste du parenchyme. On distingue ainsi les Nc-LCS intra-épendymaires, sous-épendymaires et distaux, en fonction de la localisation de leur soma (Orts-Del'Immagine et al., 2012, 2014 ; Kutna et al., 2013). La forme et la taille des Nc-LCS peuvent varier au sein d'une même espèce ou entre différentes espèces, allant d'une forme ronde de 10 µm (Barber et al., 1982 ; Djenoune et al., 2017 ; LaMotte, 1987 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014) à une forme ovale ou polygonale de 13 à 28 µm **(Figure 8)** (Shimosegawa et al., 1986 ; Dale et al., 1987).

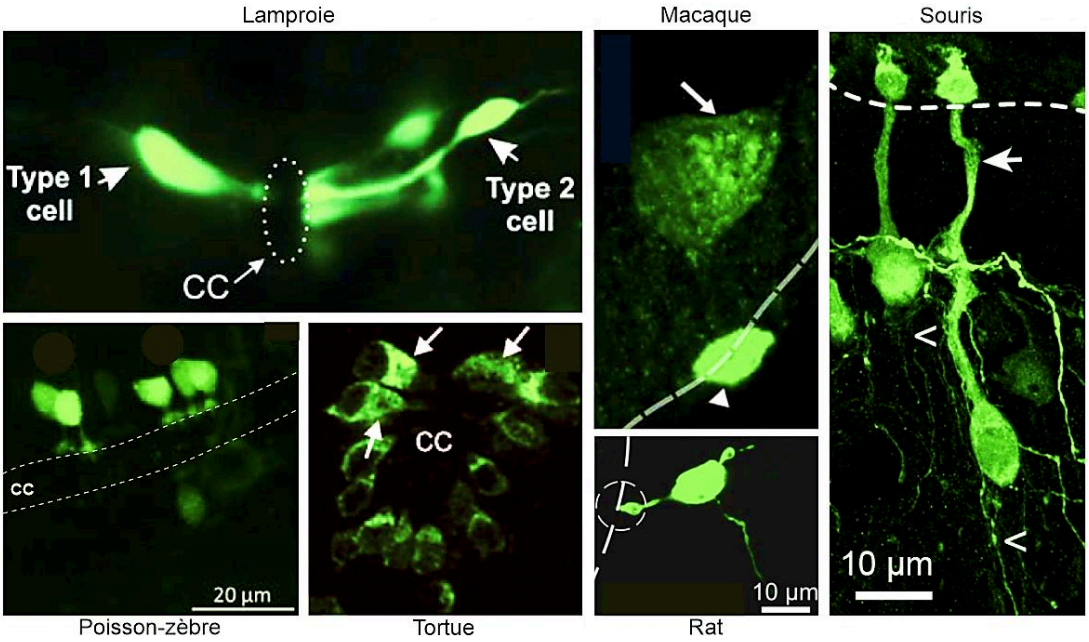


Figure 8| Morphologie des Nc-LCS chez différentes espèces de vertébrés

Microscopies confocales de Nc-LCS chez différentes espèces. Les Nc-LCS chez la lamproie, le poisson-zèbre, la tortue, le macaque, le rat et la souris présentent des caractéristiques morphologiques communes, avec un soma de petite taille, une dendrite projetant vers la lumière du CC (pointillés blancs) une protrusion au contact du LCS (lamproie : Jalavand et al., 2014 ; poisson-zèbre : Stil & Drapeau, 2016 ; tortue : Reali et al., 2011 ; macaque : Djenoune et al., 2014 ; rat : Marichal et al., 2009 ; souris : Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Les Nc-LCS étendent un prolongement depuis le soma vers le CC. En raison de son immunoréactivité positive contre la « microtubule associated protein-2 » (MAP2), un marqueur dendritique, cette structure a été identifiée comme étant une dendrite dans le tronc cérébral de souris (Orts-Del'Immagine et al., 2014) **(Figure 9)**. Le diamètre de la dendrite varie entre 1,4 et 2,9 µm (Shimosegawa et al., 1986). Sa longueur chez la souris peut toutefois différer en fonction de la localisation des Nc-LCS le long de l'axe bulbo-spinal et autour du CC. Dans des régions plus rostrales, les dendrites des Nc-LCS ventraux deviennent plus courtes, tandis que celles des Nc-LCS dorsolatéraux s'allongent (Orts-Del'Immagine et al., 2014). Cette hétérogénéité est également observée chez le poisson-zèbre (Djenoune et al., 2017).

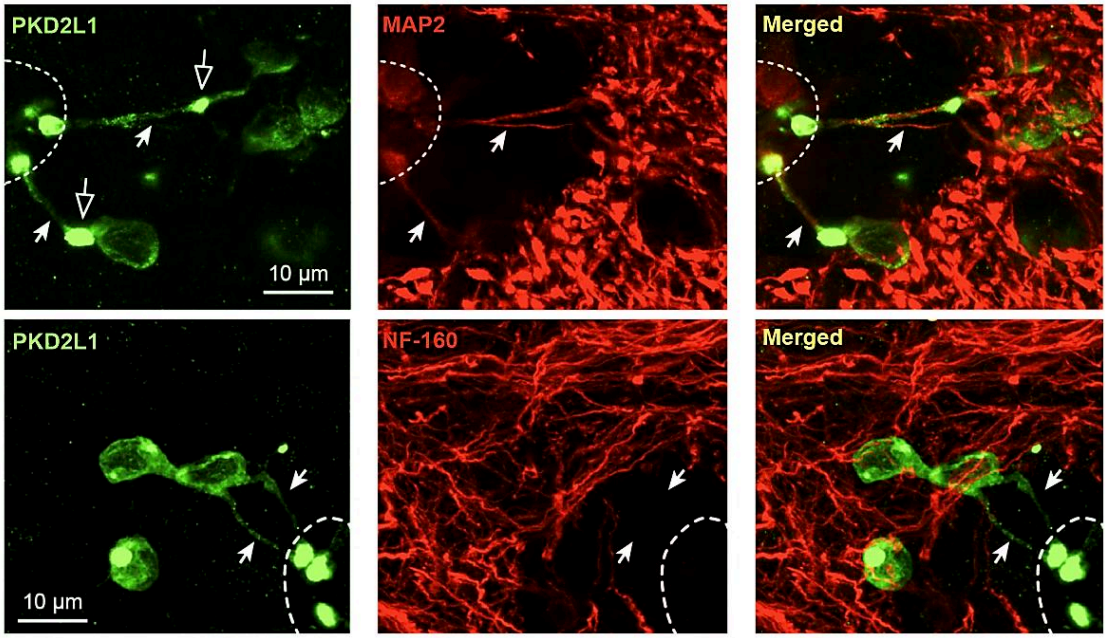


Figure 9| Les Nc-LCS : des cellules polarisées qui qui projettent une dendrite vers le CC

Microscopies confocales de coupes coronales de tronc cérébral de souris. L'immunomarquage permet de visualiser les Nc-LCS (PKD2L1^{+}, en vert), et leurs dendrites (MAP2+ et NF-160-, flèche, en rouge) autour du CC (ligne pointillée) (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Chez la lamproie, la ME contient deux types cellulaires en contact avec le LCS. Ces deux types projettent une dendrite vers le CC, qui se termine par une protrusion. Toutefois, les cellules de type 1, possèdent une dendrite courte et épaisse, tandis que celles de type 2, ont une dendrite longue et fine, avec un soma plus petit et plus éloigné du CC et ne génèrent pas de potentiels d'action (Jalalvand et al., 2014). De manière similaire, on distingue deux populations de Nc-LCS chez le poisson zèbre, principalement en raison de différences morphologiques : les Nc-LCS dorsaux ont une forme ronde, tandis que les ventraux, sont plus allongés (Djenoune et al., 2017). Chez la souris, une étude récente a mis en évidence la présence de neurones bulbo-spinaux distaux PKD2L1$^+$ (dPKD2L1$^+$) situés ventro-médialement. Le soma de ces cellules dPKD2L1$^+$ se trouve au-delà des 50 µm, avec une distance moyenne de 163 µm et jusqu'à 500 µm du CC. Ces neurones envoient une dendrite vers le CC, confirmé par une immunoréactivité positive au marqueur dendritique MAP2 et leurs axones se regroupent pour former un faisceau de fibres longitudinal ventro-médian. Pendant le développement, on observe un pic de cellules dPKD2L1$^+$ à P0, suivi d'une diminution après 3 mois. Les auteurs montrent également que la distance des cellules dPKD2L1$^+$ par rapport au CC augmente avec le temps, et qu'elle est plus prononcée dans les régions rostrales **(Figure 11)**. À l'âge adulte, ces cellules dPKD2L1$^+$ sont GABAergiques, suggérant que les cellules dPKD2L1$^+$ pourraient constituer une sous-population de Nc-LCS ayant migré depuis le CC vers la région ventrale de la ME (Jurčić et al., 2021).

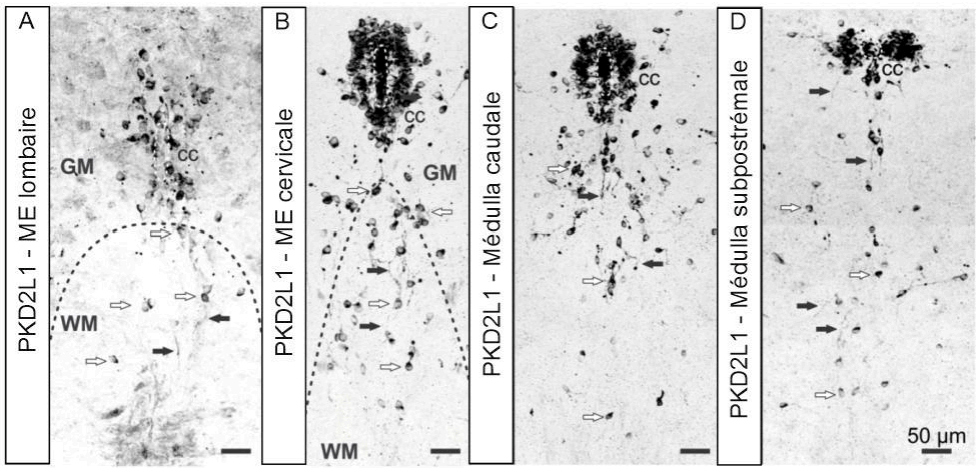


Figure 10| **Des Nc-LCS distaux sont présents au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral chez la souris**

(A-D) Projections de coupes coronales sériées et immunomarquage, montrant la distribution des cellules PKD2L1$^+$, autour du CC et dans la région ventrale (flèches) de différentes régions : ME lombaire, cervicale, médulla caudale et sub-postrémale (Jurčić et al., 2021).

Au niveau du CC, la dendrite se termine par une structure arrondie appelée bud, mesurant entre 1,4 et 5 µm de diamètre (Barber et al., 1982 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014 ; Shimosegawa et al., 1986). L'étude de leur ultrastructure en microscopie électronique à transmission, a révélé la présence de grandes vésicules granulaires, de mitochondries et d'un réticulum endoplasmique très développé (Vigh et al., 1983 ; Fujita et al., 2012), suggérant une fonction sécrétrice **(Figure 10A)**. Chez toutes les espèces, le bud présente des microvillosités baignant dans le LCS, qui sont plus longues et plus épaisses que les cils mobiles des cellules épendymaires. Le nombre et la nature de ces cils varient selon l'espèce étudiée. Des études immunohistochimiques chez la souris **(Figure 10B)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014) et chez la lamproie (Jalalvand et al., 2016), ont montré que le bud est immunoréactif pour le marqueur des microtubules des cils, l'α-tubuline acétylée. Chez la tortue (Vígh et al., 2004) et le poisson-zèbre (Djenoune et al., 2017), le bud des Nc-LCS est équipé d'un cil plus long, qui est également un cil mobile **(Figure 10C)**.

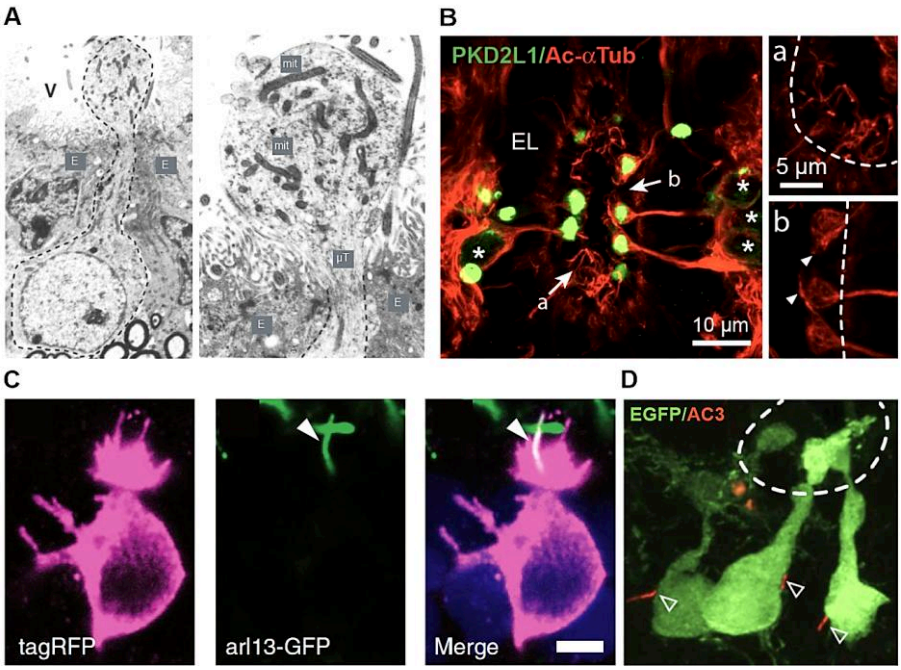


Figure 11| **Les Nc-LCS présentent des structures ciliées sur le bud et/ou sur le soma**

(A) Microscopie électronique à transmission (MET) d'un Nc-LCS au niveau du ventricule (V) de souris, entouré de cellules épendymaires (E). La dendrite contient des microtubules T (μT) et la protrusion de nombreuses mitochondries (mit) (Vigh et al., 1983). **(B)** Microscopie confocale d'une coupe coronale de médulla chez la souris, avec un immunomarquage permettant de visualiser les Nc-LCS PKD2L1^{+} (en vert) et des structures ciliées Ac-αTub^{+} (tubuline acétylée, en rouge). De nombreuses structures ciliées sont présentes autour du CC, notamment au niveau du bud des Nc-LCS (flèches et agrandissements a et b) (soma des Nc-LCS : astérisques, ligne pointillée : CC) (Orts-Del'Immagine et al., 2014). **(C)** Microscopie confocale d'une larve de poisson-zèbre transgénique Tg(pkd2l1:gal4, UAS:tagRFP-CAAX;cmcl2:GFP, bact:Arl13-GFP, montrant un Nc-LCS (PKD2L1^{+}, en magenta) avec des microvillosités et un cil primaire (Arl13-GFP^{+}, en vert), présents sur le bud (échelle : 3 mm) (Bohm et al., 2015). **(D)** Microscopie confocale d'une tranche coronale de médulla de souris, montrant la présence d'un cil primaire (AC3^{+}, en rouge, flèches) sur le soma de Nc-LCS GFP^{+} (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Enfin, des cils primaires, marqués spécifiquement par l'adénylate cyclase de type 3 (AC3) (Bishop et al., 2007), ont été observés sur le bud des Nc-LCS de l'hypothalamus (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989), chez le rat au niveau des Nc-LCS bulbo-spinaux (Stoeckel et al., 2003 ; Bishop et al., 2007 ; Marichal et al., 2009) et chez la larve de poisson-zèbre (Bohm et al., 2015). De façon surprenante, ces cils primaires, principalement impliqués dans les fonctions de chémoréception, mécanoréception et d'osmoréception, n'ont pas été retrouvés sur le bud des Nc-LCS chez la souris, mais sur le soma (Orts-Del'Immagine et al., 2014) **(Figure 10D)**. Ainsi, tout comme les cellules mécanoréceptrices qui possèdent des cils, les Nc-LCS pourraient être des cellules nerveuses sensorielles.

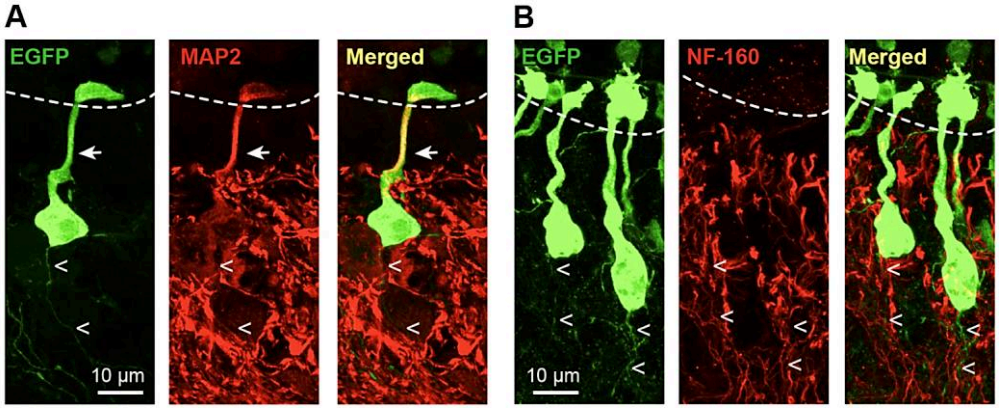


Figure 12|**Les Nc-LCS projettent une dendrite vers le canal central et un « axone » vers le parenchyme**

(A-B) Microscopies confocales de coupes sagittales de tronc cérébral de souris PKD2L1-EGFP. L'immunomarquage des Nc-LCS (GFP, en vert) couplé avec celui des dendrites (MAP2, en rouge ; A) et des axones (NF-160, en rouge ; B), montre que le prolongement épais MAP2^{+}, orienté vers le CC (ligne pointillée) est une dendrite, tandis que le fin prolongement partant vers le parenchyme n'exprime ni le marqueur dendritique MAP2, ni le marqueur axonal NF-160 (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Enfin, ces neurones émettent un prolongement axonal dans le parenchyme, dont les cibles restent largement inconnues à ce jour chez la souris. L'axone, qui émerge généralement du soma mais également de la dendrite (Shimosegawa et al., 1986), n'exprime pas le marqueur axonal NF-160, ni le marqueur dendritique MAP2 **(Figure 12)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014). C'est pourquoi cette structure est qualifiée « d'axon-like » (cf détails sur les projections, Introduction Section I B-8b).

4- Marqueurs moléculaires des Nc-LCS

Ces neurones bipolaires expriment spécifiquement un canal de la famille des polycystines « Polycystin kidney disease 2-like 1 » (PKD2L1), appartenant à la superfamille des canaux « Transient Receptor Potential » (TRP) (Chen et al., 1999 ; Orts-Del'Immagine et al., 2012, 2014 ; Djenoune & Wyart, 2017). L'expression de ce canal est extrêmement conservée chez différentes espèces, allant du poisson **(Figure 13C)** jusqu'aux primates. Dans la ME de souris, PKD2L1 est exprimé dans les Nc-LCS depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte **(Figure 13A)**, bien que des variations géo-développementales soient observées. Par exemple, à E14,5 PKD2L1 n'est présent qu'au niveau cervical ; il est ensuite détecté dans les Nc-LCS à tous les segments (Djenoune et al., 2014).

Jusqu'à présent, l'expression de PKD2L1 a été observée dans le soma et la dendrite des Nc-LCS de souris, avec une forte expression dans la protrusion en contact avec le LCS (Djenoune et al., 2014 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014). Chez le macaque, l'expression est plus élevée dans le bud, tandis qu'elle est plus faible dans le soma (Djenoune et al., 2014). Cependant, PKD2L1 n'a jamais été détecté dans l'axone (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Les Nc-LCS sont principalement caractérisés par leur nature GABAergique (acide γ-aminobutyrique), comme l'ont démontré de nombreuses études inter-espèces qui ont révélé l'expression de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) ou du transporteur vésiculaire du GABA (vGAT) **(Figure 13B et C)** (Djenoune et al., 2014 ; Jalalvand et al., 2014 ; Kutna et al., 2013 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014 ; Stoeckel et al., 2003). Outre leur phénotype GABAergique, il a été mis en évidence que les Nc-LCS pouvaient exprimer des monoamines (catécholamines et sérotonine) et neuropeptides (somatostatine, polypeptide intestinal vasoactif : VIP, enképhaline, urotensine 2-like), qui sont également exprimés par les Nc-LCS spinaux de différente espèces (Nagatsu et al., 1988 ; Djenoune & Wyart, 2017 ; Jalalvand et al., 2014 ; LaMotte, 1987 ; Shimosegawa et al., 1986), mais de manières différentes selon le type de Nc-LCS considéré. Par exemple, si la somatostatine est co-exprimée avec le GABA par les cellules de type 1, chez la lamproie (Jalalvand et al., 2014) et le poisson zèbre (Djenoune et al., 2014), ce n'est pas le cas dans la ME de souris (Petracca et al., 2016). Chez le poisson zèbre, Djenoune et collaborateurs ont montré que les deux types de Nc-LCS, issus de différentes origines développementales, se distinguent par leurs morphologies, leurs projections neuronales ainsi que par l'expression de molécules sécrétées. Par exemple, les Nc-LCS ventraux expriment transitoirement la sérotonine, tandis que les Nc-LCS dorsaux expriment la somatostatine paralogue *sst1.1* (Djenoune et al., 2017).

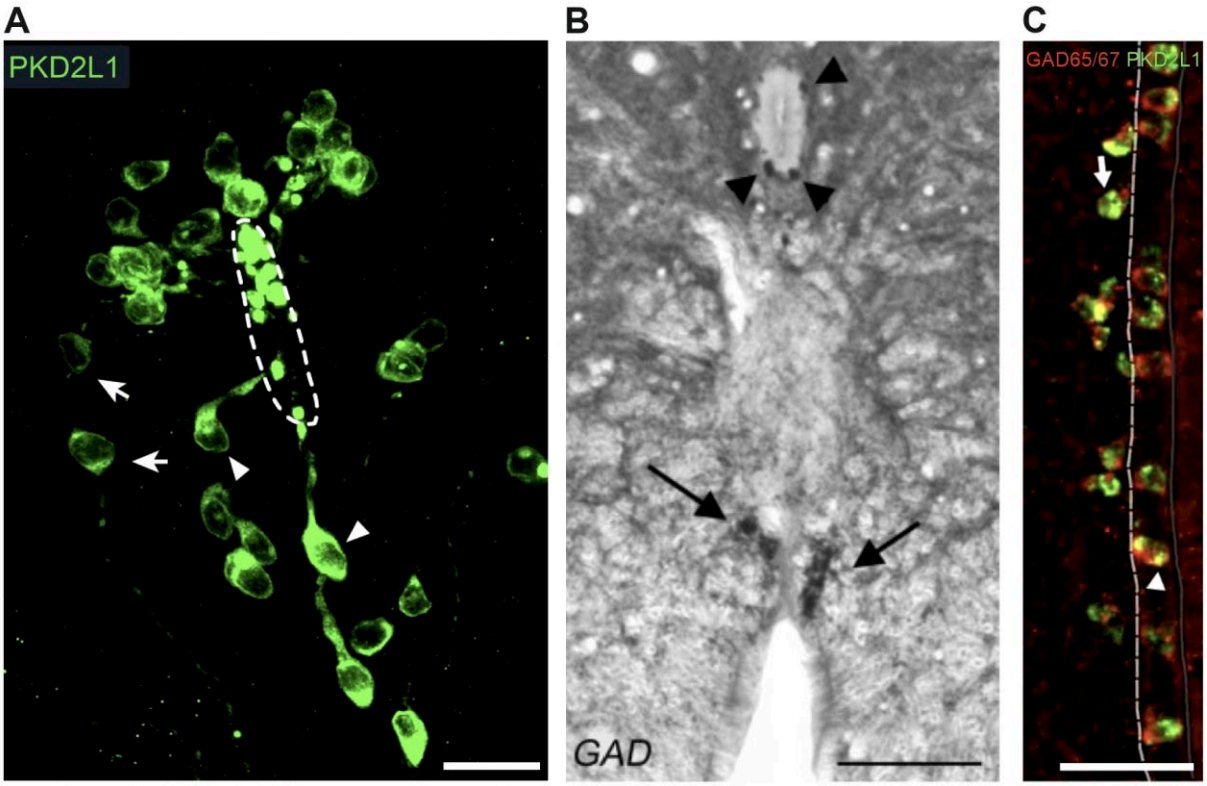


Figure 13| **Les Nc-LCS expriment le canal PKD2L1 et sont GABAergiques**

(A) Microscopie confocale d'une tranche coronale de tronc cérébral de souris, montrant une immunoréactivité positive au marqueur PKD2L1 (en vert) dans des cellules localisées autour du CC (ligne pointillée), dont la morphologie coïncide avec celle des Nc-LCS (Orts-Del'Immagine et al., 2014). **(B)** Microscopie optique d'une coupe coronale de ME lombaire chez le rat, montrant une immunoréactivité positive pour la GAD autour du CC (triangles) et de la fissure médiane ventrale (flèche ; échelle : 100 µm) (Stoeckel et al., 2003). **(C)** Microscopie confocale d'une coupe sagittale d'une ME de larve de poisson-zèbre, montrant une double immunoréactivité pour la GAD65/67 (en rouge) et pour PKD2L1 (en vert, hybridation fluorescente *in situ*) dans les Nc-LCS dorsaux et ventraux localisés au niveau du CC (ligne pointillée ; échelle : 30 µm) (Djenoune et al., 2014).

5- Origine et état de maturité des Nc-LCS

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les Nc-LCS bulbo-spinaux sont particuliers tant par leur morphologie caractéristique que par leur phénotype développemental.

L'origine développementale des Nc-LCS n'a pas encore été complètement élucidée. Toutefois, Petracca et collaborateurs ont mis en évidence que les Nc-LCS PKD2L1^{+} expriment les facteurs de transcription Gata2/3 et qu'ils seraient issus du même pool de progéniteurs que les interneurones V2b. L'apparition et la prolifération des Nc-LCS, ont été étudiées grâce à l'administration de BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) à des souris et rates gestantes (Petracca et al., 2016 ; Kutna et al., 2013). Il semblerait que les Nc-LCS spinaux chez la souris, soient formés tardivement par rapport aux autres neurones et possèderaient une double origine. La plupart des Nc-LCS apparaissent à E14, et continuent à être générés après E16,5, leur nombre restant stable jusqu'à la naissance. À ce stade du développement embryonnaire, la neurogenèse a cédée sa place à la gliogenèse, une période durant laquelle les progéniteurs s'engagent massivement dans la différenciation en astrocytes et oligodendrocytes (Petracca et al., 2016). De plus, deux sous-populations distinctes de Nc-LCS, issues de différents domaines de progéniteurs ventraux, ont été identifiées. La première, désignée par Nc-LCS', dérive de précurseurs exprimant Nkx6.1 et Pax6 dans les domaines p2 et pOL (partie dorsale), avec Pax6 jouant un rôle crucial dans leur développement. La seconde sous-population, Nc-LCS'', exprime Nkx2.2 et Foxa2 dans le domaine p3, près du plancher ventral **(Figure 14B)**. Ces deux populations se distinguent, non seulement par leurs origines développementales mais

aussi par leurs localisations autour du CC de la ME et par leurs caractéristiques électrophysiologiques. Les Nc-LCS' sont dans les région latérales du CC et présentent une décharge tonique, tandis que les Nc-LCS'' sont localisés ventralement et produisent un potentiel d'action unique **(Figure 14A)** (Petracca et al., 2016). Récemment, il a été montré que les Nc-LCS dérivent de progéniteurs ventraux exprimant le facteur de transcription Ascl1. Celui-ci, déclencherait une neurogenèse tardive dans la ME et contrôlerait la composition neuronale et non-neuronale du CC, en supprimant l'épendymogenèse chez l'embryon de souris. En effet, les embryons Ascl1 KO, n'expriment ni PKD2L1, ni les marqueurs post-mitotiques des Nc-LCS (βIII-tubuline, Gata2, sox2), suggérant que Ascl1 contrôlerait la différenciation des Nc-LCS chez la souris (Di Bella et al., 2019).

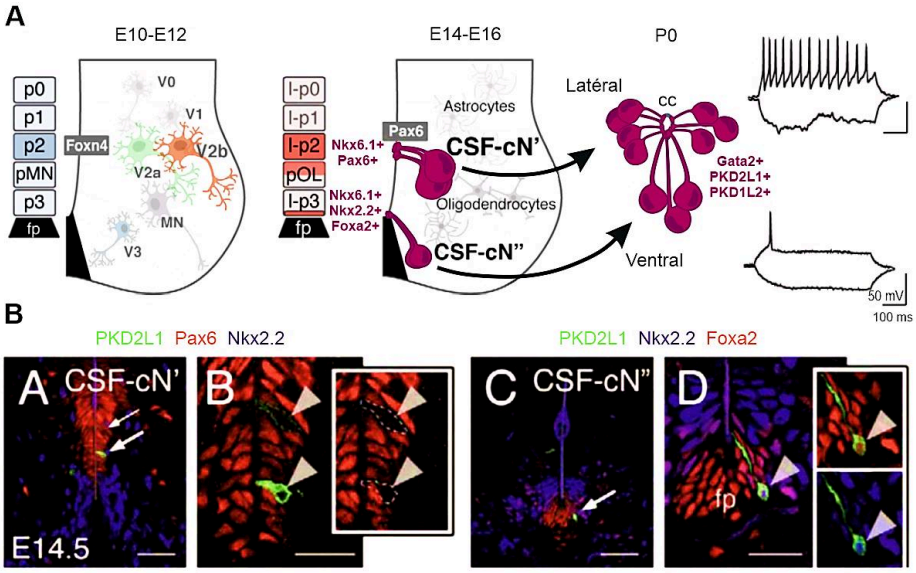


Figure 14| **Développement des Nc-LCS spinaux**

(A) Représentation schématique de la ME ventrale de souris, aux stades embryonnaires E10-E12, E14-E16 et l'organisation des Nc-LCS autour du CC à la naissance (P0). A E10-E12, les domaines de progéniteurs (p0, p1, P2, pMN et p3) donnent naissance aux motoneurones (MN) et aux interneurones V0, V1, V2 et V3. Le facteur de transcription Foxn4 est important pour la différenciation des interneurones V2b Gata2/3^{+}, qui a lieu en même temps que les astrocytes et les oligodendrocytes à E14-E16. Les Nc-LCS' dérivent des progéniteurs Nkx6.1^{+}/Pax6^{+} au niveau du domaine p2 et de la moitié dorsale du pOL, alors que les Nc-LCS'' proviennent des progéniteurs Nkx2.2^{+}/Foxa2^{+} dans p3, proche de la plaque du plancher (fp). A la naissance, les Nc-LCS' sont localisés dans les parties latérales du (CC) et ont une décharge tonique, tandis que les Nc-LCS'' sont ventraux et ont un patron de décharge avec un PA unique. **(B)** Microscopie confocale à E14,5, montrant 2 Nc-LCS PKD2L1^{+} (en vert, flèches ; A-B) dans des territoires où Pax6 est exprimé (en rouge). Les Nc-LCS'' PKD2L1^{+} (en vert, flèches ; C-D) expriment Nkx2.2 (en bleu) et Foxa2 (en rouge) (Adaptée de Petracca et al., 2016).

La complexité des sous-populations de Nc-LCS observées dans la ME, ainsi que dans l'ensemble du SNC mature, reposent sur le timing de la neurogenèse et l'organisation spatiale des domaines de progéniteurs qui assurent la différenciation neuronale. Ainsi, la double origine des Nc-LCS spinaux chez la souris, pourrait impliquer des fonctions distinctes, une hypothèse également suggérée chez d'autres espèces, comme chez le poisson-zèbre (Djenoune et al., 2014).

Au cours de leur différenciation, les neurones nouvellement formés expriment initialement la doublecortine (DCX) et la molécule d'adhésion cellulaire neurale polysialylée (PSA-NCAM), caractéristiques des neuroblastes en migration. En s'intégrant aux circuits existants, ils perdent progressivement l'expression de DCX et PSA-NCAM, tout en acquérant l'expression de la protéine Neuronal Nucléique (NeuN), un marqueur des neurones matures, ainsi que des propriétés électrophysiologiques associées (Marichal et al., 2009).

En ce qui concerne les Nc-LCS, l'état d'immaturité est l'une de leurs particularités. En effet, ils expriment à la fois des marqueurs de neurones immatures comme DCX, HuC/D et

PSA-NCAM (Russo et al., 2004 ; Marichal et al., 2009 ; Kutna et al., 2013 ; Djenoune et al., 2014 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014, 2017 ; Böhm et al., 2016 ; Petracca et al., 2016) ainsi que des marqueurs de neurones matures comme NeuN (Kutna et al., 2013 ; Djenoune et al., 2014 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014, 2017). Cet état immature persiste chez de nombreux vertébrés, y compris chez la souris **(Figure 15A)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014), le rat **(Figure 15B)** (Marichal et al., 2009 ; Kutna et al., 2013 ; Stoeckel et al., 2003) et la tortue **(Figure 15C)** (Russo et al., 2004), jusqu'à l'âge adulte. Bien que l'expression de DCX reste constante au cours du développement, celle de NeuN augmente modestement sans atteindre les niveaux observés chez d'autres types de neurones (Kutna et al., 2013). D'ailleurs, NeuN est plus fortement exprimé dans les Nc-LCS latéraux et dans les régions rostrales (Orts-Del'Immagine et al., 2014, 2017). Même dans l'expression de ces marqueurs d'immaturité, les Nc-LCS présentent une diversité d'expression, soulignant ainsi une hétérogénéité qui pourrait également refléter des fonctions différentes (Marichal et al., 2009).

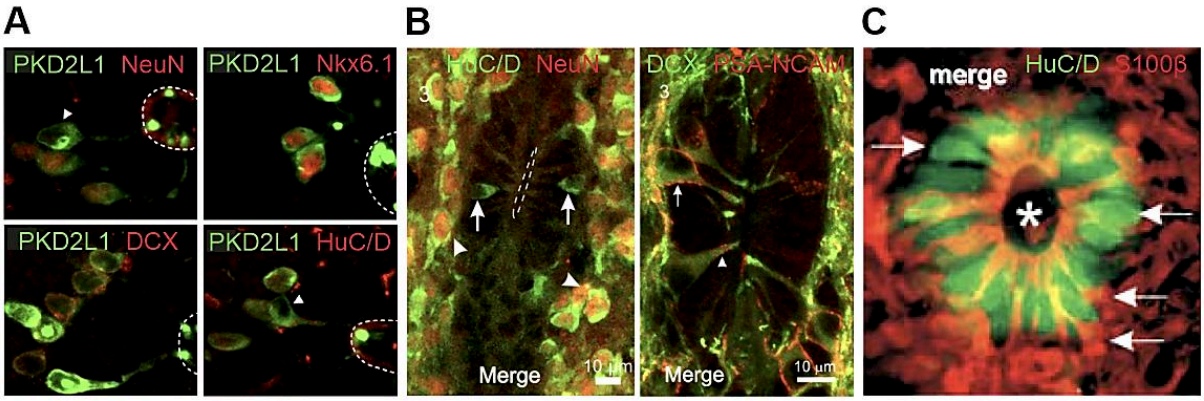


Figure 15 | **Les Nc-LCS expriment des marqueurs de maturité et d'immaturité à l'âge adulte**

(A) Microscopies confocales de tranches coronales de tronc cérébral de souris avec un immunomarquage des Nc-LCS avec PKD2L1 (en vert), des cellules matures $NeuN^+$ (en rouge, en haut à gauche) et des cellules immatures $Nkx6.1^+$, DCX^+ et HuC/D^+ (en rouge, en haut à droite et en bas ; ligne pointillée : CC) (Orts-Del'Immagine et al., 2014). **(B)** Microscopies confocales de tranches coronales de ME de rat, montrant une immunoréactivité positive pour les marqueurs d'immaturité HuC/D, DCX et PSA-NCAM et négative pour le marqueur de maturité NeuN, des Nc-LCS localisés dans la couche de cellules épendymaires (Marichal et al., 2009). **(C)** Microscopie confocale d'une tranche coronale de ME de tortue, montrant une immunoréactivité positive au marqueur de neurones immatures HuC/D (en vert), tout autour du CC (astérisque) et où l'immunomarquage S100β (en rouge), permet de visualiser en rouge, les cellules épendymaires et les cellules gliales (échelle : 20 µm) (Russo et al., 2004).

Jurčić et collaborateurs ont montré que les cellules distales $dPKD2L1^+$ du CC, présentent un phénotype immature similaire à celui des Nc-LCS, avec une faible expression du marqueur de maturité neuronale NeuN, tout en exprimant des marqueurs d'immaturité tels que DCX ou Nkx6.1 (Jurčić et al., 2021).

6- Propriétés intrinsèques

a) Mécanismes ioniques sous-jacents de l'excitabilité des Nc-LCS

Les Nc-LCS bulbo-spinaux sont, en général, des cellules compactes avec un diamètre d'environ 10 µm et une faible capacité membranaire (3-6 pF) (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Ces cellules présentent une résistance élevée (2 à 6 GΩ) et un potentiel de repos variant entre -40 et -70 mV. Ce sont bien des cellules nerveuses puisqu'elles expriment le marqueur neuronal NeuN et sont capables de générer des potentiels d'action spontanés chez plusieurs espèces de vertébrés. Les Nc-LCS expriment des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants (Na_v et K_v) fonctionnels, responsables de courants rapides et transitoires. Chez le rat nouveau-né, Marichal et collaborateurs ont montré la présence de deux populations de courants potassiques : des courants persistants à rectification retardée (I_{KD}) et des courants transitoires de type A (I_A). De plus, des canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) ont également été décrits (Marichal et al., 2009 ; Jurčić et al., 2019). Chez la souris adulte, Jurčić

et collaborateurs ont montré, que les Nc-LCS du tronc cérébral expriment des Ca_v fonctionnels, bloqués en présence de cadmium, un inhibiteur sélectif. L'activation de ces canaux à des potentiels de membrane plus dépolarisés que -50 mV, indique que les Ca_v exprimés par les Nc-LCS sont des canaux de haut seuil (HVA : high voltage activated), parmi lesquels figurent les types L, N, R et P/Q. En utilisant des toxines ou inhibiteurs sélectifs, ils ont montré que l'application d'ω-conotoxine GVIA, un bloqueur sélectif des $Ca_V2.2$, réduit significativement l'amplitude du courant enregistré, suggérant que les Nc-LCS bulbaires expriment principalement des Ca_v de type $Ca_v2.2$ (type N) (Jurčić et al., 2019).

Au niveau spinal, les Nc-LCS se distinguent par leurs propriétés électrophysiologiques intrinsèques, notamment rn répondant différemment à une brève injection de courant dépolarisant. Chez la souris, en fonction des propriétés de décharge des potentiels d'action, deux populations de Nc-LCS peuvent être observées : ceux qui répondent par une décharge tonique (répétitive) et ceux qui répondent par une décharge phasique (PA unique). Il semble que les Nc-LCS bulbaires présentent une plus grande proportion de décharge phasique **(Figure 16A)** (Orts-Del'Immagine et al., 2012). L'existence de ces deux types de décharge pourrait être liée à l'âge des animaux, à leur état de maturité et à la localisation des Nc-LCS autour du CC. Par exemple, les Nc-LCS dorsolatéraux ont un patron de décharge tonique et expriment le marqueur de maturité neuronal NeuN, alors que les Nc-LCS ventraux ont une décharge phasique **(Figure 14A)** (Petracca et al., 2016).

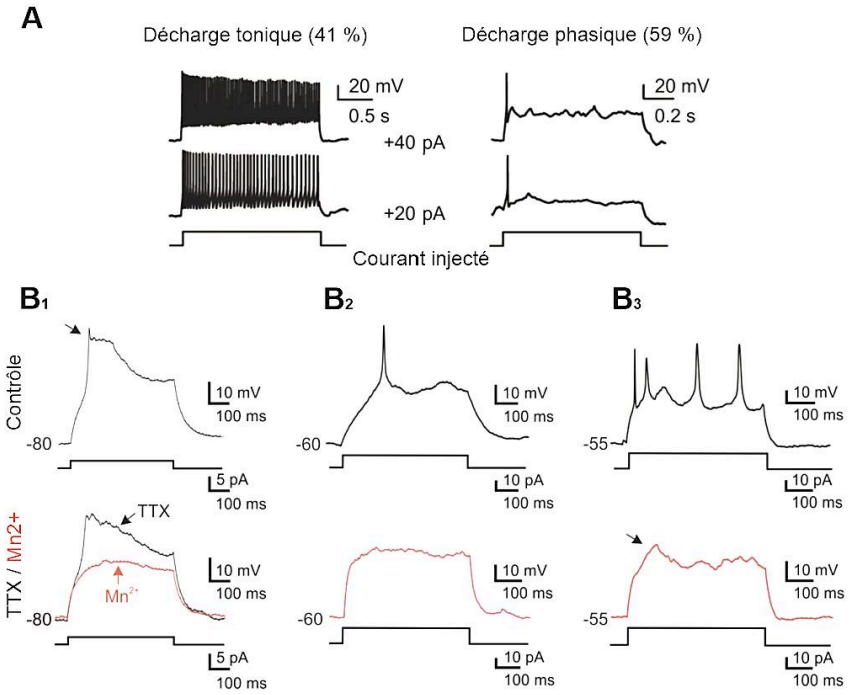


Figure 16 | Les Nc-LCS présentent différents patrons de décharge

(A) Traces représentatives de 2 types de patrons de décharge, enregistrés en CC dans des Nc-LCS du tronc cérébral de souris, après injection de courant positifs (+20 et +40 pA) (Orts-Del'Immagine et al., 2012). **(B)** Traces représentatives de 3 patrons de décharge distincts, enregistrés dans des Nc-LCS spinaux de rats. **(B1)** En condition contrôle, certains Nc-LCS présentent un potentiel dépolarisant lent avec un bref transient au début de la réponse (flèche), qui est sensible à la TTX (1 µM). En présence de 3 mM de Mn^{2+}, le potentiel dépolarisant lent disparait (en rouge). **(B2-3)** Les cellules avec un patron de décharge en pic unique (B2) ou en décharge répétée (B3), ont des PA médiés par des conductances Na+, car ils sont bloqués par l'ajout de TTX (traces rouges) (Adaptée de Marichal et al., 2009).

Chez le rat, trois populations de Nc-LCS ont été identifiées. Marichal distingue les Nc-LCS avec une résistance d'entrée élevée (6 GΩ) et une dépolarisation lente, impliquant des canaux calciques. La deuxième population avec une résistance d'entrée plus faible (≈4 GΩ), présente une décharge phasique, tandis que la troisième, avec une résistance d'entrée de 4 GΩ, présente une décharge tonique avec des potentiels d'action de plus grande amplitude (≈38 mV pour le type 2 contre ≈56 mV pour le type 3). De plus, les cellules qui déchargent de

manière phasique ont un potentiel de repos significativement plus dépolarisé que celles qui déchargeant de manière tonique (Russo et al., 2004 ; Marichal et al., 2009). La décharge phasique ou tonique, caractérisée respectivement par un PA unique ou une série de PA, implique des conductances sodiques et potassiques voltage-dépendantes (INa_v, I_{KD} et I_A) **(Figure 16B)**.

Ces différents patrons de décharge suggèrent, une différence de densité et de type de canaux voltage-dépendants exprimés dans les Nc-LCS (Marichal et al., 2009; Petracca et al., 2016), qui pourrait s'expliquer par des degrés de maturité neuronale. Ainsi, les neurones les plus immatures auraient une dépolarisation lente calcique, tandis qu'avec la maturation, les neurones à décharge phasique acquerraient les propriétés électrophysiologiques, soutenant les décharges toniques observées dans les Nc-LCS les plus matures. En effet, les propriétés électrophysiologiques de ces différents sous-types sont en corrélation avec leur profil immunohistochimique. Contrairement aux Nc-LCS avec un PA unique, les Nc-LCS toniques n'expriment pas le marqueur d'immaturité HuC/D et présentent des neurites plus développées (Marichal et al., 2009). Il semble donc que la maturation des PA soit accompagnée d'une maturation phénotypique et morphologique. L'hypothèse de l'existence de neurones avec des degrés de maturité variés, basée sur des données fonctionnelles, est ainsi confirmée par des observations morphologiques.

b) Récepteurs synaptiques et neurotransmission

Les Nc-LCS présentent des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) et inhibiteurs (PPSI), indiquant qu'ils sont intégrés dans un réseau synaptique. En effet, les Nc-LCS bulbaires chez la souris (Jurčić et al., 2019) et spinaux chez la lamproie (Jalalvand et al., 2014) reçoivent des afférences excitatrices, principalement glutamatergiques, et des afférences inhibitrices de type GABAergique.

Expression de récepteurs ionotropiques

Les Nc-LCS bulbo-spinaux des rongeurs expriment des récepteurs ionotropiques $GABA_A$, glycinergiques, cholinergiques de type nicotinique (nACh) et glutamatergiques (AMPA/Kainate) fonctionnels, révélés par l'application d'agonistes (Marichal et al., 2009 ; Orts-Del'Immagine et al., 2012 ; Corns et al., 2015 ; Orts Del'Immagine et al., 2015 ; Jurčić et al., 2019 ; Crozat et al., 2024 BioRxiv). Chez la lamproie, des récepteurs ionotropiques GABAergiques et glutamatergiques sont également présents dans les Nc-LCS de type 1 (Jalalvand et al., 2014). Concernant le récepteur purinergique de type P2X2, Stoeckel et Marichal ont montré son expression dans les Nc-LCS spinaux de rat, par des études immunohistochimiques et électrophysiologiques (Marichal et al., 2009 ; Stoeckel et al., 2003). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits chez la souris sur des tranches de tronc cérébral, suggérant que les récepteurs P2X2 seraient absents dans les Nc-LCS bulbaires dans ce modèle (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Expression de récepteurs métabotropiques

Outre les récepteurs ionotropiques, les Nc-LCS expriment également des récepteurs métabotropiques muscariniques et des récepteurs $GABA_B$ (Djenoune & Wyart, 2017 ; Jurčić et al., 2019). Par ailleurs, des études histologiques ont mis en évidence l'expression de récepteurs métabotropiques à la sérotonine R-5HT-6 (Htr6) et NPY (Npy1r) (*GENSAT Brain Atlas of Gene Expression*). Ces récepteurs, couplés aux protéines G, modulent la transmission synaptique sur une échelle de temps plus longue que les récepteurs ionotropiques (quelques secondes à quelques minutes).

Les récepteurs $GABA_B$ (R-$GABA_B$) activent les protéines G de type $G_{i/o}$, qui inhibent l'adénylate cyclase et inhibent les canaux ioniques *via* la liaison directe de la sous-unité Gβγ au canal. Les R-$GABA_B$ présynaptiques sont situés au niveau des terminaisons axonales des neurones excitateurs (hétérorécepteurs) et inhibiteurs (autorécepteurs), où leur activation bloque la libération de neurotransmetteurs, notamment en inhibant les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v). Les R-$GABA_B$ postsynaptiques sont exprimés dans le compartiment somatodendritique des neurones, où ils induisent un courant postsynaptique inhibiteur lent en activant les canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéines G (GIRK/Kir3). Cela entraine une hyperpolarisation de la membrane et réduit l'excitabilité neuronale. Ces récepteurs agissent aussi en présynaptique sur les canaux Ca_v, régulant ainsi les processus neuronaux dépendant du calcium (Gassmann & Bettler, 2012). Par exemple, Jurčić et collaborateurs ont observé par immunohistochimie, la présence de récepteurs $GABA_B$ dans des Nc-LCS bulbo-spinaux de souris. Grâce au baclofène, un agoniste spécifique des R-$GABA_B$, ils ont montré que ces récepteurs sont fonctionnels, et inhibent les canaux Ca_v de type N, par la liaison directe des sous-unités Gβγ au canal. De plus, l'activation des R-$GABA_B$ dans les Nc-LCS n'a pas induit d'hyperpolarisation dépendante du potassium (Kir3 : courants K^+ sortants), suggérant une absence d'expression des canaux GIRK (Jurčić et al., 2019; Riondel et al., 2024).

Une signalisation GABAergique particulière

Le GABA joue un rôle crucial pendant le développement, en fournissant l'excitation nécessaire à la maturation neuronale. Pendant le développement et dans les zones de neurogenèse adulte, la signalisation GABAergique peut avoir des effets différents selon la maturité des neurones. C'est pourquoi, Marichal et Reali ont étudié l'effet du GABA, sur des Nc-LCS à différents stades de maturité. Contrairement à la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, la technique de patch-clamp perforé, préserve les conditions physiologiques sans perturber l'homéostasie des ions chlorures. En utilisant la gramicidine, un antibiotique qui crée des pores cation-sélectifs/chlore imperméables dans la membrane, la concentration intracellulaire en ions Cl^- est ainsi préservée. Grace à cette approche, deux populations de Nc-LCS ont été mises en évidence, dans lesquelles le GABA peut avoir un effet inhibiteur ou excitateur (Marichal et al., 2009). Une population avec des cellules ayant un potentiel d'équilibre du chlore (E_{Cl}) autour de -70 mV, réagissent au GABA par une hyperpolarisation. Dans l'autre population de Nc-LCS avec un E_{Cl} plus dépolarisé, autour de -50 mV, l'application de GABA provoque une dépolarisation pouvant déclencher des PA (Russo et al., 2004 ; Marichal et al., 2009 ; Reali et al., 2011). Cette dualité d'action du GABA résulte de différences d'expression des transporteurs des ions chlorures, ce qui conduit à des concentrations intracellulaires distinctes, et donc à divers potentiels de réversion pour les courants GABAergiques. Le transporteur NKCC1 fait entrer des ions chlorures dans la cellule, augmentant ainsi la concentration intracellulaire en ions Cl^- et provoque un effet dépolarisant du GABA. À l'inverse, le transporteur KCC2 fait sortir les ions chlorures, permettant un effet hyperpolarisant du GABA. Au fur et à mesure que les neurones maturent, l'action du GABA passe d'excitatrice à inhibitrice en raison d'une diminution de l'activité de NKCC1 et/ou d'une augmentation de l'activité de KCC2 (Rivera et al., 1999; Ganguly et al., 2001). Ainsi, les Nc-LCS avec un GABA dépolarisant (HuC/D+), expriment fortement NKCC1, tandis que dans ceux où le GABA est hyperpolarisant, le rapport NKCC1/KCC2 est augmenté. Il est suggéré que les Nc-LCS exprimant le marqueur d'immaturité HuC/D se trouvent à des stades de maturité différents, avec des ratio NKCC1/KCC2 variables, influençant ainsi l'effet du GABA : excitateur ou inhibiteur. De plus, il a été montré que les Nc-LCS HuC/D positifs, hyperpolarisés par le

GABA, présentent généralement une décharge tonique, typique des neurones matures (Reali et al., 2011).

Ces résultats observés chez la tortue et chez le rat ont été confirmés chez la souris adulte par les travaux de Riondel et collaborateurs (2024), en comparant les Nc-LCS et les neurones GABAergiques matures de la corne dorsale. En patch-clamp configuration cellule attachée, l'activation des récepteurs $GABA_A$ provoque dans 70 % des cas, une dépolarisation et dans 30 % des cas, une hyperpolarisation dans les Nc-LCS, sans lien notable avec leur localisation autour du CC **(Figure 17A)**. De plus, les réponses dépolarisantes médiées par le GABA peuvent déclencher des PA et entrainer des élévations calciques intracellulaires *via* l'activation des Ca_V. Ces transients calciques sont bloqués par la bumetanide, un inhibiteur de NKCC1. Par hybridation *in situ*, ils observent que 18 % des Ns-LCS expriment NKCC1, alors que KCC2 ne semble pas être exprimé **(Figure 17B et C)**. L'absence de KCC2 est confirmée par des expériences de patch-clamp en configuration cellule entière, où les Nc-LCS ont une faible capacité à extruder les ions chlorures, en grande concentration dans la solution intrapipette (Riondel et al., 2024).

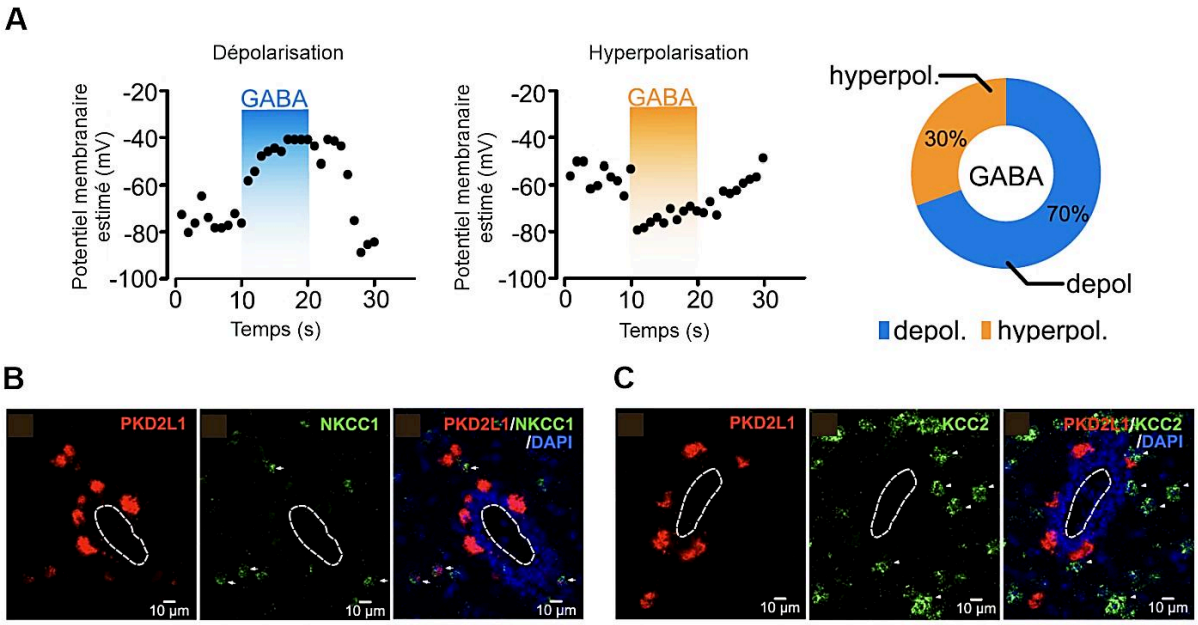


Figure 17| **L'activation des R-$GABA_A$ induit des réponses dépolarisantes et hyperpolarisantes dans les Nc-LCS spinaux**

(A) Graphiques montrant la variation du potentiel membranaire de deux Nc-LCS au cours du temps, répondant soit par une dépolarisation (à gauche), soit par une hyperpolarisation (à droite), suite à l'application de GABA par pression. A droite, le graphique montre que 70 % des Nc-LCS répondent à l'application de GABA par une dépolarisation. **(B-C)** Microscopies confocales de tranches coronales de ME de souris, montrant dans les Nc-LCS (ARNm PKD2L1, en rouge), l'expression d'ARNm NKCC1 (en vert, flèche ; A), mais pas d'ARNm KCC2 (en vert ; C), suite à une hybridation fluorescente *in situ* (RNAscope) (ligne pointillée : CC, DAPI : en bleu) (Riondel et al., 2024).

L'ensemble de ces résultats met en évidence des sous-populations de Nc-LCS spinaux exprimant une signalisation GABAergique soit inhibitrice, soit excitatrice. Le GABA excitateur pourrait favoriser la maturation et l'intégration des « jeunes » Nc-LCS dans le circuit spinal déjà existant.

7- PKD2L1 : un récepteur sensoriel pour les Nc-LCS bulbo-spinaux

a) Les canaux « Transient Receptor Potential » (TRP)

Les canaux TRP forment une famille de plus de cinquante membres, perméables aux cations et présents des organismes multicellulaires jusqu'aux mammifères (Vassort & Fauconnier, 2008). Les membres de la superfamille TRP remplissent divers rôles, mais l'une de leurs fonctions les plus importantes est la détection sensorielle (Clapham, 2003). Ils sont généralement activés par des stimuli environnementaux tels que, des variations de

température, de pression osmotique, des stimuli mécaniques ou encore des substances organiques comme le menthol ou le piment (Minke, 2006 ; Nilius et al., 2007 ; Vassort & Fauconnier, 2008) et sont impliqués dans diverses fonctions sensorielles, comme la vision, l'olfaction, le goût, la thermosensation ou la mécanosensation (Clapham, 2003 ; Nilius et al., 2007).

b) *Le canal Polycystin Kidney Disease 2- Like 1 (PKD2L1)*

PKD12L1, un membre des canaux TRP Polycystine

Les canaux TRP, sont divisés en 7 groupes et le canal PKD2-like 1 (PKD2L1), aussi appelé TRPP3, appartient aux TRP de type P, pour Polycystine (TRPP). Ce canal présente des similitudes de séquence et de structure, avec TRPP2 (PKD2), impliqué dans la polykystose rénale autosomique dominante (APKD), une maladie génétique qui entraîne la formation de kystes dans les reins, le foie et le pancréas. Chez la souris, la perte de PKD2, mène à une létalité embryonnaire accompagnée de défauts dans le développement des reins et du cœur (Wu & Somlo, 2000), suggérant une implication du canal dans la morphogenèse.

Expression et propriétés des canaux PKD2L1

PKD2L1 (TRPP3) est un canal cationique non sélectif perméable au calcium (Chen et al., 1999). Dans les cellules embryonnaires rénales (HEK 293T), son expression membranaire dépend de l'association avec une protéine de la famille PKD1 (Murakami et al., 2005). Associée avec PKD1L1, PKD2L1 est localisée sur le cil primaire des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (DeCaen et al., 2013), alors qu'exprimée seule, la protéine PKD2L1 est majoritairement localisée dans les organites intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique (Murakami et al., 2005). La protéine PKD2L1 est présente dans des cellules excitables et non excitables de plusieurs tissus et organes et son expression varie en fonction du stade de développement, avec des taux particulièrement élevés dans les tissus fœtaux (Nomura et al., 1998). Dans SNC, la protéine PKD2L1 est présente dans les Nc-LCS bulbo-spinaux (Huang et al., 2006 ; Jurčić et al., 2021 ; Orts Del'Immagine et al., 2015 ; Orts-Del'Immagine et al., 2012, 2014, 2017) mais aussi au niveau du bulbe olfactif, de l'hippocampe et du thalamus (Q. Li et al., 2007).

Expression de PKD2L1 chez l'Homme (Delmas et al., 2004 ; Nomura et al., 1998)	Expression de PKD2L1 chez les rongeurs (Huang et al., 2006 ; Murakami et al., 2005)
Muscles striés cardiaque et squelettique, rate, SNC, reins, testicules, rétine, placenta, foie	SNC, reins, testicules, rétine, bourgeons du goût, colon, intestin, aorte, chaine ganglionnaire dorsale, pancréas, glandes surrénales

Modulation de PKD2L1 par le calcium

Il a été largement démontré que l'activité du canal PKD2L1, perméable au calcium, est fortement amplifiée en présence de calcium extra- ou intracellulaire. Des enregistrements en configuration cellule entière, réalisés sur des ovocytes de Xénopes, ont révélé que l'application de calcium augmente le courant porté par PKD2L1 (Chen et al., 1999). De nombreux cils primaires contiennent le canal PKD2L1, permettant l'entrée des ions Ca^{2+} dans ces structures. Dans des conditions normales, le flux d'ions Ca^{2+} est toujours entrant en raison de sa concentration plus élevée à l'extérieur de la cellule. Dans un système d'expression hétérologue, PKD2L1 génère un courant entrant, responsable de l'augmentation de la concentration calcique intraciliaire. De manière surprenante, la concentration de calcium est plus élevée dans le cil (700 mM) que dans le reste du cytoplasme (<100 mM) (Delling et al., 2013). Comme l'ouverture du canal PKD2L1 est suffisamment importante (>100 pS) pour générer des PA dans les Nc-LCS (Orts Del'Immagine et al., 2015), et que ces canaux sont

constitutivement actifs et perméables au calcium, une dérégulation de leur activité pourrait entraîner des anomalies dans les concentrations de calcium cytoplasmique.

Fonctions chémo- et mécanosensorielles du canal PKD2L1

Bien que les canaux PKD2L1 aient une activité basale, leur probabilité d'ouverture peut être modulée par divers stimuli. En effet, comme nous le verrons dans la section suivante, le rôle sensoriel des Nc-LCS est largement influencé par le canal PKD2L1, du fait de sa sensibilité aux variations de pH extracellulaire, d'osmolarité, de température, ainsi qu'à des stimuli mécaniques. D'autres substances, telles que l'uridine et l'adénosine phosphate (UDP, ADP et ATP) sont également connues pour augmenter l'activité du canal PKD2L1 (DeCaen et al., 2013). Grâce à ses propriétés chémo- et mécanosensorielles, PKD2L1 pourrait détecter divers changements dans le LCS, moduler son activité basale, et ainsi ajuster le niveau d'excitabilité des Nc-LCS pour répondre à ces modifications. Les conséquences physiologiques de ces propriétés, restent encore à élucider.

c) PKD2L1, une expression sélective dans les Nc-LCS

Plusieurs études ont montré, que le canal PKD2L1 est un marqueur sélectif des Nc-LCS bulbo-spinaux (Orts-Del'Immagine et al., 2012, 2014, 2015, 2017 ; Djenoune & Wyart, 2017 ; Jurčić et al., 2021). Chez la souris, des enregistrements en patch-clamp en configuration cellule entière de Nc-LCS bulbo-spinaux, ont permis d'observer des courants spontanés unitaires entrants **(Figure 18A)**, induits par l'ouverture du canal PKD2L1. Ce courant est caractérisé par une large conductance de 150 pS une faible probabilité d'ouverture de 0,04 et une dépendance au voltage **(Figure 18B et C)**. Par ailleurs, l'impossibilité de l'enregistrer en configuration cellule attachée, semble indiquer une faible densité de canaux PKD2L1 fonctionnels/actifs présents à la membrane des Nc-LCS (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

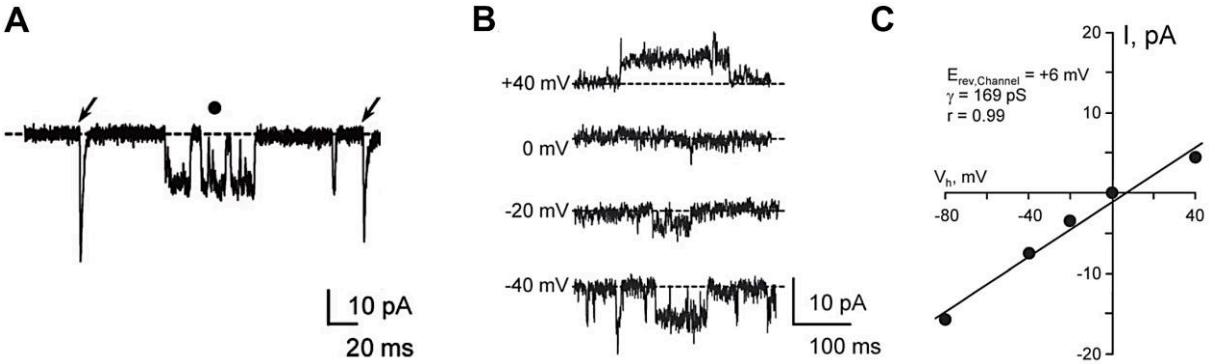


Figure 18 | Les Nc-LCS présentent des activités synaptiques spontanées et une activité de courant unitaire

(A) Trace représentative d'un enregistrement en VC à V_h -80 mV, d'un Nc-LCS sur une tranche aigue de tronc cérébral de souris, montrant des courants entrants rapides (flèches), typiques d'une activité synaptique et des activités de courant unitaire (point). **(B)** Traces représentatives de courants unitaires spontanés, enregistrés à différents potentiels de maintien (V_{Step} de -80 à +40 mV) dans un Nc-LCS (ligne pointillée : fermeture du canal). **(C)** Relation courant-voltage (courbe I-V) du courant unitaire, enregistré dans la cellule en B. L'amplitude du courant unitaire est reportée sur le graphique en fonction du saut de potentiel correspondant. Le potentiel de réversion (E_{rev}) et la conductance du canal (γ), ont été calculés par la régression linéaire des points expérimentaux (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

d) Rôle de PKD2L1 dans l'excitabilité des Nc-LCS

Les Nc-LCS présentent une activité spontanée de décharge de PA ainsi qu'une activité spontanée du canal PKD2L1. Orts Del'Immagine et collaborateurs ont montré que, la suppression de PKD2L1 chez la souris, ne modifie pas les propriétés intrinsèques des Nc-LCS, mais altère en revanche leurs propriétés de décharge. En effet, l'absence de PKD2L1, diminue la proportion de Nc-LCS ayant une activité spontanée, ainsi que leur fréquence de décharge (Orts Del'Immagine et al., 2015). Chez la larve de poisson-zèbre, sa suppression diminue fortement les réponses calciques enregistrées dans les Nc-LCS ventraux, suggérant que sa

présence est indispensable au maintien de l'activité spontanée des Nc-LCS (Sternberg et al., 2018).

Il est intéressant de noter que l'excitabilité des Nc-LCS est influencée par l'activité du canal PKD2L1, puisque son ouverture pour des durées supérieures à 20 ms, suffit à dépolariser leur potentiel de membrane et à déclencher des PA (Orts Del'Immagine et al., 2015). Le canal PKD2L1, caractérisé par une grande résistance d'entrée, représente ainsi un générateur de PA (« spike generator ») capable de moduler l'excitabilité des Nc-LCS.

8- Partenaires synaptiques et projections axonales

Le terme Nc-LCS, désignent l'ensemble des neurones du SNC qui contacte le LCS via leur dendrite, leur soma ou leur axone (Vigh & Vigh-Teichmann, 1998), et engendre ainsi en plus des différences de localisation et de morphologie, des différences de projections axonales et donc de partenaires synaptiques.

a) Partenaires présynaptiques

La microscopie électronique à transmission sur des tranches de ME de plusieurs espèces, telles que le rat, la souris ou le poisson zèbre, a révélé la présence de synapses axo-somatiques autour des Nc-LCS. Ces terminaisons synaptiques renferment de grandes vésicules granuleuses, dont la provenance n'a pas encore été élucidée (Barber et al., 1982 ; Djenoune et al., 2017 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014). Par ailleurs, d'autres terminaisons synaptiques présentes autour des Nc-LCS contiennent des petites vésicules synaptiques claires, probablement issues de neurones GABAergiques (Barber et al., 1982). Cela est concordant avec les résultats d'une étude montrant la présence de puncta positifs pour la GAD67 (glutamate décarboxylase) autour du CC, ainsi qu'au contact du soma des Nc-LCS **(Figure 19A et B)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Par ailleurs, des enregistrements électrophysiologiques de Nc-LCS, couplés à un choc hyperosmotique, provoquant une libération vésiculaire, ont mis en évidence une neurotransmission glycinergique et GABAergique sur les Nc-LCS chez la souris **(Figure 19C et D)** (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Ces mêmes afférences ont également été observées chez la lamproie (Jalalvand et al., 2014).

Chez la souris, il a également été montré que des fibres sérotoninergiques, catécholaminergiques et cholinergiques se trouvent à proximité des Nc-LCS, suggérant que plusieurs neurotransmetteurs pourraient jouer un rôle dans la modulation de leur activité **(Figure 19E-G)** (Orts-Del'Immagine et al., 2014). De plus, des terminaisons synaptiques avec une forte immunoréactivité pour les peptides Met-Enk-Arg-Gly-Leu ont été observées chez le rat (Shimosegawa et al., 1986). Ces données indiquent que les Nc-LCS bulbo-spinaux sont intégrés dans un réseau synaptique complexe, bien que l'origine de tous ces contacts présynaptiques reste à clarifier.

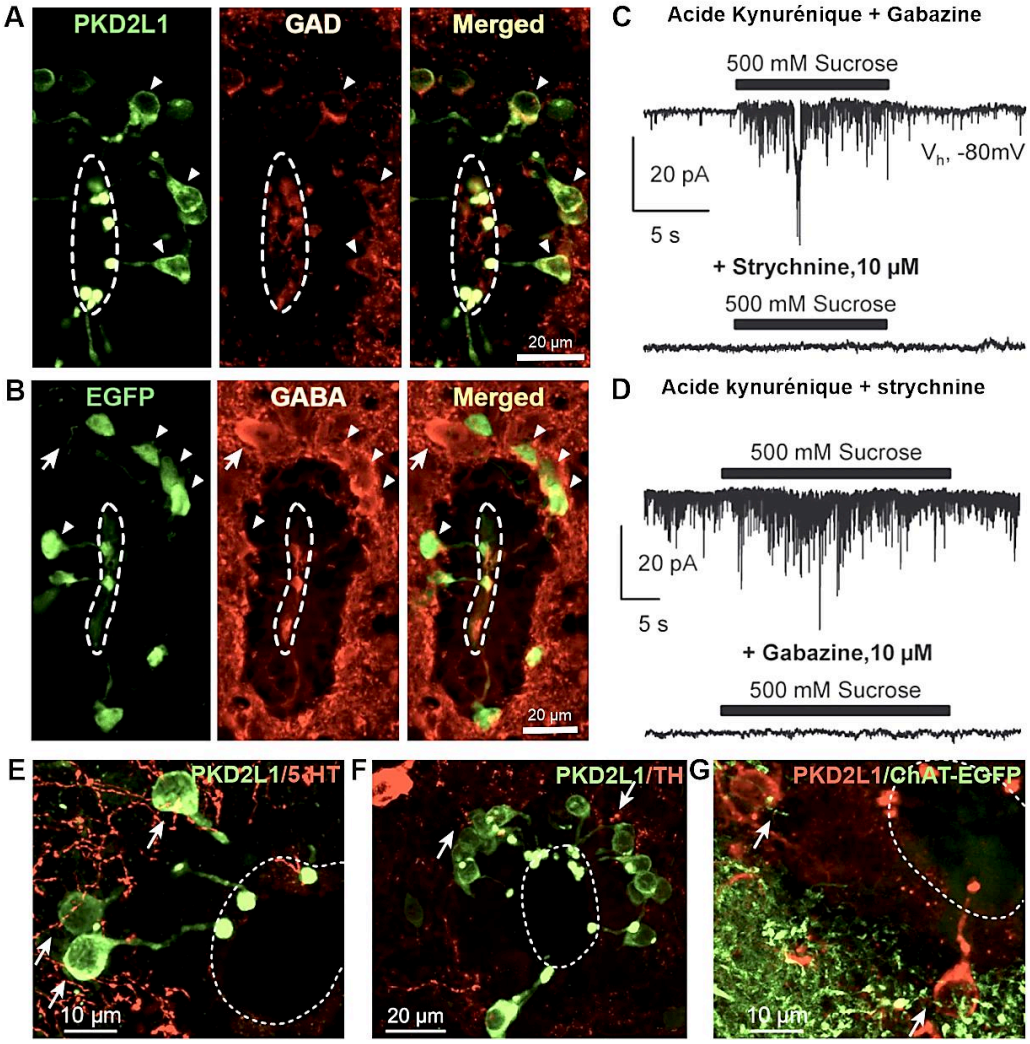


Figure 19| **Les Nc-LCS sont GABAergiques et sont en contact avec des fibres GABAergiques, monoaminergiques et cholinergiques**

(A-B-E-F-G) Microscopies confocales de coupes coronales de tronc cérébral de souris. **(A-B)** L'immunomarquage des Nc-LCS PKD2L1$^+$ (en vert), des cellules GAD67$^+$ (en rouge, A) et des cellules GABA$^+$ (en rouge, B), montre que les Nc-LCS sont GABAergiques et qu'ils sont en contact avec des fibres GABAergiques (Orts-Del'Immagine et al., 2014). **(C-D)** Les Nc-LCS du tronc cérébral possèdent des récepteurs glycinergiques et GABAergiques fonctionnels. **(C)** Traces représentatives de l'enregistrement en VC d'un Nc-LCS en configuration cellule entière. En présence d'acide kynurénique (1 mM) et de gabazine (10 µM) pour bloquer la transmission glutamatergique et GABAergique respectivement, l'application par pression d'aCSF contenant 500 mM de sucrose (10 s, en haut), évoque des évènements synaptiques, bloqués par l'ajout de strychnine (10 µM) dans le bain, pour bloquer la transmission glycinergique (en bas). **(D)** De la même façon, en présence d'acide kynurénique et de strychnine, le choc hyperosmotique induit des réponses synaptiques dans le Nc-LCS enregistré, qui sont bloquées par l'ajout de gabazine dans le bain (Orts-Del'Immagine et al., 2012). **(E-F)** L'immunomarquage contre la 5-HT (en rouge, E), la tyrosine hydroxylase (TH : en rouge, F), montre que les Nc-LCS PKD2L1$^+$ (en vert) ont des fibres 5-HT$^+$ et TH$^+$ proche de leur soma (flèches). (G) Chez des souris ChAT-EGFP (ChAT : en vert), le marquage PKD2L1 (en rouge) montre la présence de puncta ChAT$^+$ autour des Nc-LCS (flèches) (Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Récemment, en collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri, nous avons identifié pour la première fois chez les mammifères, les partenaires présynaptiques des Nc-LCS. Par une approche de traçage neuronal monosynaptique rétrograde avec le virus de la rage muté, nous avons montré que ≈85 % des contacts synaptiques GABAergiques sur les Nc-LCS provenaient de projections de Nc-LCS localisés dans des régions plus caudales **(Figure 20A et B)**. Les Nc-LCS semblent ainsi former un réseau ascendant de Nc-LCS interconnectés.

Cette interconnectivité anatomique doit être confirmée d'un point de vue fonctionnel, et fera l'objet d'une partie des résultats. De plus, cette même stratégie a mis en évidence que les Nc-LCS reçoivent majoritairement des entrées synaptiques d'interneurones GABAergiques (≈50 %) présents dans les régions dorsales de la ME, mais aussi des entrées synaptiques d'interneurones glutamatergiques (≈25 %) (Gerstmann et al., 2022) **(Figure 20C et D)**.

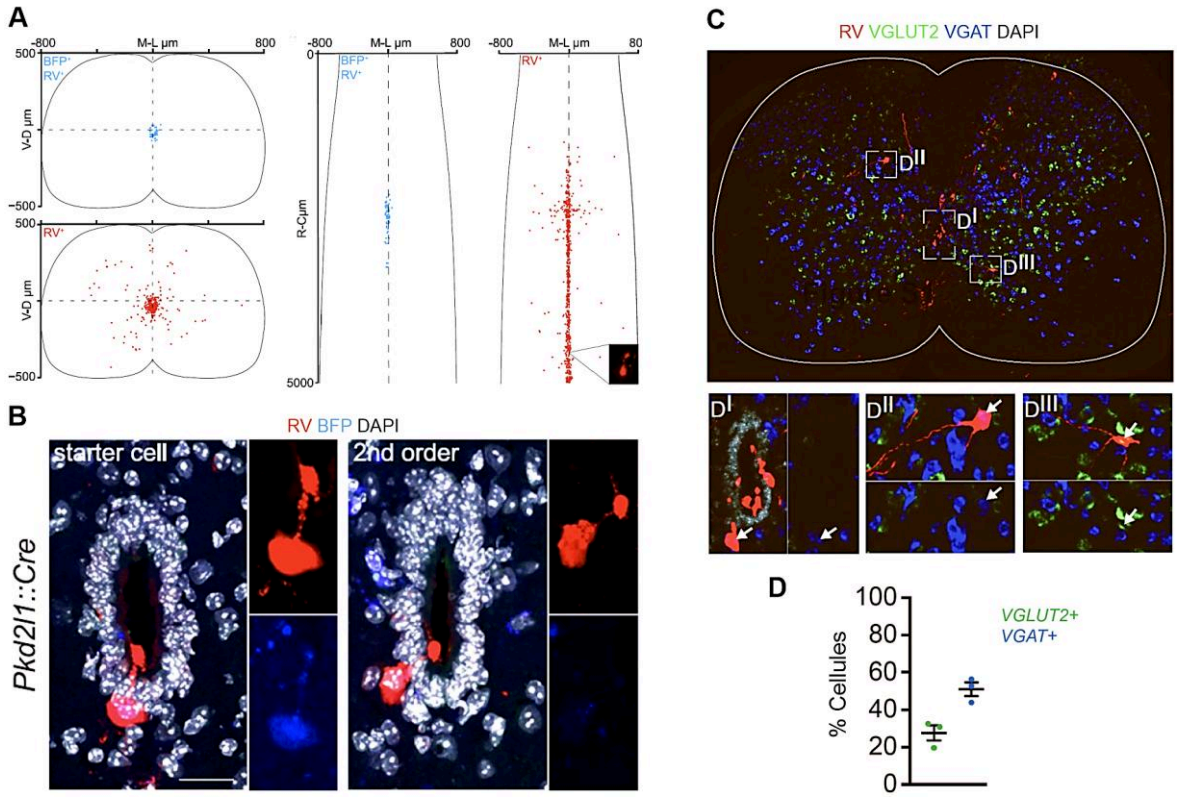


Figure 20 | Les Nc-LCS forment un réseau ascendant de Nc-LCS interconnectés

(A) Reconstruction digitale de la position des cellules infectées par traçage neuronal monosynaptique rétrograde avec le virus de la rage muté, sur des coupes coronales (gauche) et longitudinales (droite) de ME de souris PKD2L1-cre. L'injection bilatérale intraspinale d'un cocktail d'AAV Cre-dépendants (AAV-syn-FLEX-splitTVA-EGFP-tTA [avian TVA receptor] + AAV-TREtight-mTagBFP2-B19G) au niveau lombaire, a permis dans un premier temps, le ciblage spécifique des Nc-LCS lombaires (starter cell : en bleu) en les rendant compétents pour l'infection du virus de la rage (RV). Trois semaines après, la glycoprotéine d'enveloppe aviaire EnvA du virus de la rage pseudotypé (RVΔG-mCherry/EnvA), a été injectée au même niveau, pour la diffusion trans-synaptique du virus de la rage vers les partenaires présynaptiques des Nc-LCS (cellules de 2nd ordre : en rouge ; échelle : 20 µm). **(B)** Images représentatives des cellules BFP/RV+ (sarter cell, en bleu et rouge) et des cellules uniquement RV+ (2nd order cell, en rouge), qui correspondent aux neurones trans-synaptiquement connectés aux Nc-LCS. **(C)** Hybridation *in situ* des cellules RV+, montrant des neurones de second ordre excitateurs (VGLUT2+) et inhibiteurs (VGAT+). **(D)** Quantification du pourcentage de cellules du 2nd ordre RV+, immunopositives pour VGLUT2 ou VGAT (Gerstmann et al., 2022).

b) Projections axonales et partenaires postsynaptiques

Chez la larve de poisson-zèbre, l'étude des fibres axonales des Nc-LCS spinaux, a révélé une projection ascendante et ipsilatérale vers la partie ventrale de la ME, au niveau de la fissure médiane (Wyart et al., 2009 ; Djenoune et al., 2017) **(Figure 21A)**. Ces axones émettent des collatérales qui traversent entre 2 et 6 segments spinaux, où ils établissent des contacts avec des interneurones du réseau moteur (Fidelin et al., 2015 ; Djenoune et al., 2017).

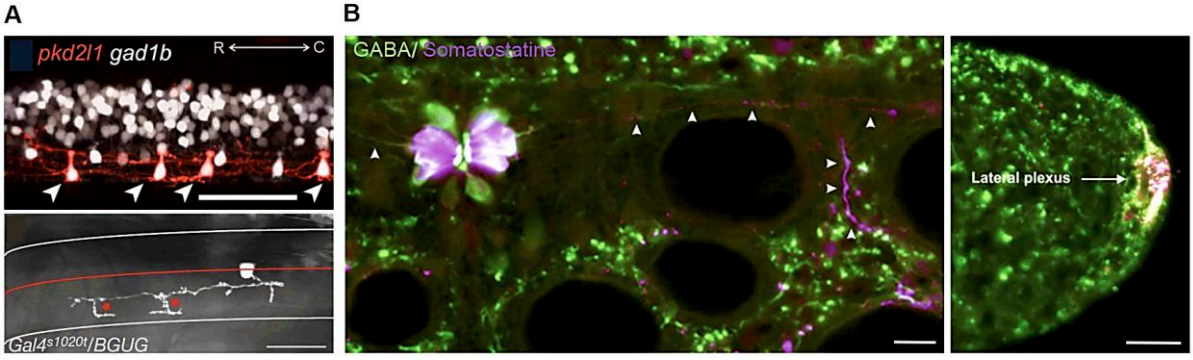


Figure 21 | Projections axonales des Nc-LCS chez le poisson-zèbre et la lamproie

(A) Microscopies de larves de poisson-zèbre (Tg(pkd2l1:gal4;UAS:ChR2-mCh;Gad1b:GFP), en haut ; échelle 50 µM et Gal4s1020t/BGUG, en bas ; échelle : 25 µM), montrant des projections ascendantes ipsilatérales émanant des Nc-LCS PKD2L1/GAD1+ (flèches) et la présence de collatérales (étoiles rouges) (Fidelin et al., 2015 ; Wyart et al., 2009). **(B)** Microscopie confocale d'une section de ME de lamproie montrant une immunoréactivité positive des Nc-LCS de type 1 pour le GABA (en vert) et la somatostatine (en violet) autour du CC. Les Nc-LCS projettent latéralement vers le plexus latéral (Jalalvand et al., 2014).

De la même façon, chez la lamproie, deux populations de Nc-LCS se distinguent par leurs projections axonales. Bien que ces deux types cellulaires projettent vers les extrémités latérales de la ME, les cellules de type 1 (GABA/Somatostatine$^+$, en vert et en violet), se ramifient pour former un plexus autour des dendrites mécanosensibles des « edge cells » **(Figure 21B)** (Jalalvand et al., 2014). Ces cellules sont des neurones équipés de récepteurs à l'étirement, qui participent activement au réseau locomoteur (Grillner et al., 1984 ; Vinay et al., 1996).

Il est intéressant de noter que les Nc-LCS ont des trajectoires de projection et des cibles postsynaptiques distinctes en fonction de leur localisation dorso-ventrale. Les Nc-LCS ventraux présentent des projections plus longues, plus ramifiées et une arborisation dendritique plus grande, suggérant des cibles post-synaptiques différentes des Nc-LCS dorsaux (Djenoune et al., 2017). En effet, des varicosités axonales ont été observées au niveau de différentes populations d'interneurones du réseau locomoteur. Les Nc-LCS ventraux projettent vers les motoneurones CaP (caudal primary), et les dorsaux ciblent les interneurones glutamatergiques V0-v. Les interneurones sensoriels CoPA (commissural primary ascending) sont, quant à eux, contactés par les deux types de Nc-LCS **(Figure 22A-C)** (Djenoune & Wyart, 2017 ; Djenoune et al., 2017 ; Böhm et al., 2016 ; Hubbard et al., 2016).

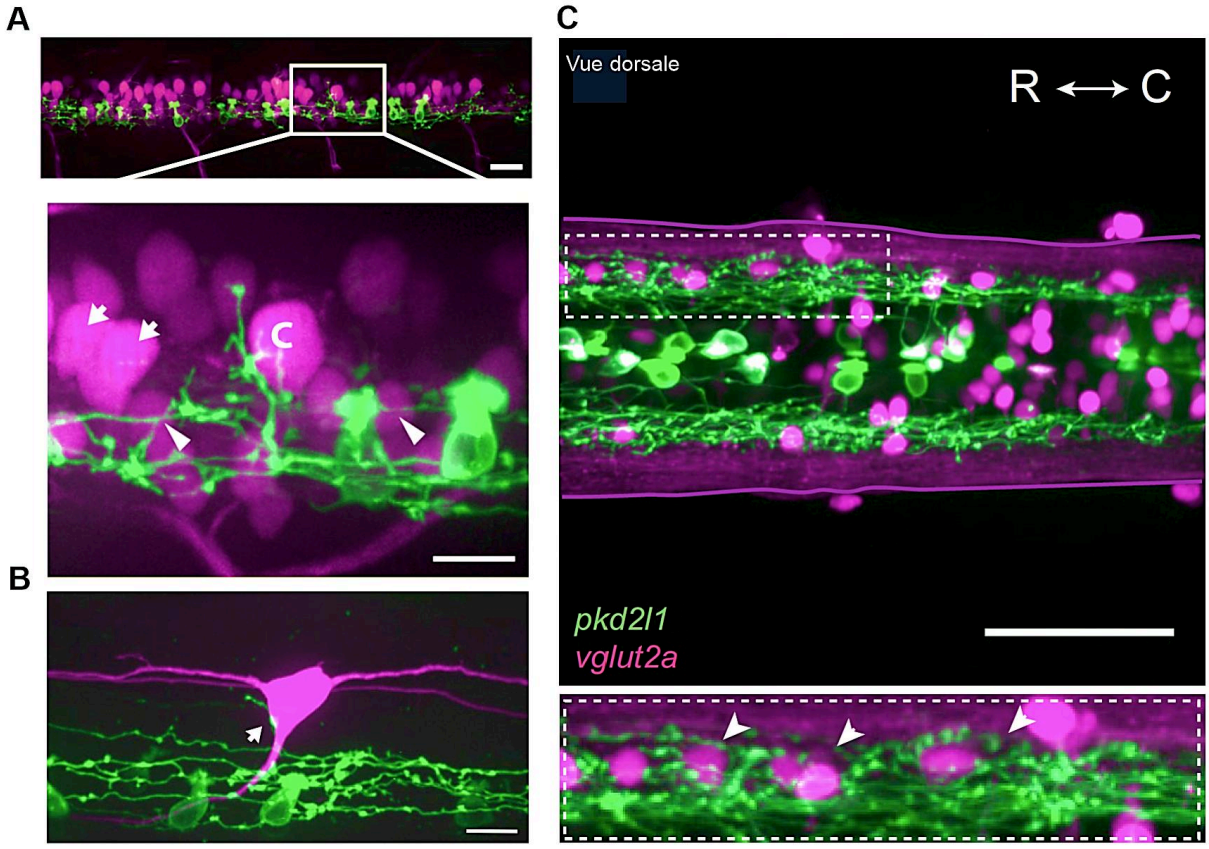


Figure 22 | Partenaires post-synaptiques des Nc-LCS chez le poisson-zèbre

(A-B) Microscopies confocales de larves de poisson-zèbre (Tg(pargmnet2-GFP; pkd2l1:gal4; UAS:ChR2-mCherry), échelle : 20-10 µm ; D et Tg(pkd2l1:gal4; UAS:ChR2-mCherry; tbx16:GFP), échelle : 10 µm ; E), montrant des projections issues des Nc-LCS pkd2l1$^+$ (GFP/mCherry$^+$, en vert) autours d'un motoneurone CaP (noté C, agrandissement en A) et d'un interneurone sensoriel CoPA (GFP$^+$, magenta ; en B) (Hubbard et al., 2016). **(C)** Projections de plusieurs sections optiques, en vue dorsale, imagées à partir d'une larve de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:gal4;UAS:ChR2-YFP; vglut2a:lox-DsRed-lox-GFP), où les interneurones V0v (vglut2a$^+$, DsRed$^+$; en magenta) présentent des varicosités pkd2l1$^+$ (Nc-LCS ; YFP$^+$, en vert) autour de leur soma (flèches sur l'agrandissement en bas ; échelle : 50 µm) (Fidelin et al., 2015).

Il y a encore quelques années, peu d'informations étaient disponibles chez les mammifères, quant à leurs voies de projection et leurs partenaires postsynaptiques. Des études immunohistologiques, avaient montré la présence de marquages Htr6, VIP, P2X2, ou

GAD, autour du CC, dans des faisceaux latéraux parallèles au CC, ainsi qu'au niveau de la fissure médiane ventrale de la ME de rat **(Figure 23A)** (Stoeckel et al., 2003). Etant donné le phénotype GABAergique des Nc-LCS, ces observations suggèrent que ces fibres pourraient correspondre à leurs axones (Stoeckel et al., 2003 ; Djenoune et al., 2017). Des projections similaires ont également été observées chez le chat et le singe (LaMotte, 1988).

Chez la souris, mon équipe a récemment montré que les axones des Nc-LCS projettent vers la fissure médiane de la ME, formant de longs faisceaux de fibres ascendants (Crozat et al., 2024 BioRxiv) **(Figure 23B)**. Nakamura et collaborateurs ont en outre démontré que les Nc-LCS projettent ventralement puis principalement rostralement avec un nombre de collatérales plus élevé dans la partie dorsale des segments cervicaux et dans la partie ventrale des segments lombaires. Cette densité plus élevée de projection dans les segments cervicaux et lombaires pourrait être liée à un réseau spinal local spécifique et à la fonction associée. Par ailleurs, les Nc-LCS projetteraient sur une longueur moyenne ≈1800-4800 µm (Nakamura et al., 2023) **(Figure 23C)**. En utilisant le traçage rétrograde viral, il a été confirmé chez la souris, que les Nc-LCS projettent vers les segments rostraux et forment des contacts synaptiques fonctionnels avec d'autres Nc-LCS plus rostraux. Contrairement aux autres espèces, les Nc-LCS des régions ventrales ou dorsales, n'ont pas pu être marqués sélectivement pour mettre en évidence des voies de projection axonale spécifiques, c'est-à-dire, des cibles postsynaptiques différentes, par rapport à leur localisation autour du CC et dans les segments rostro-caudaux, chez la souris (Gerstmann et al., 2022).

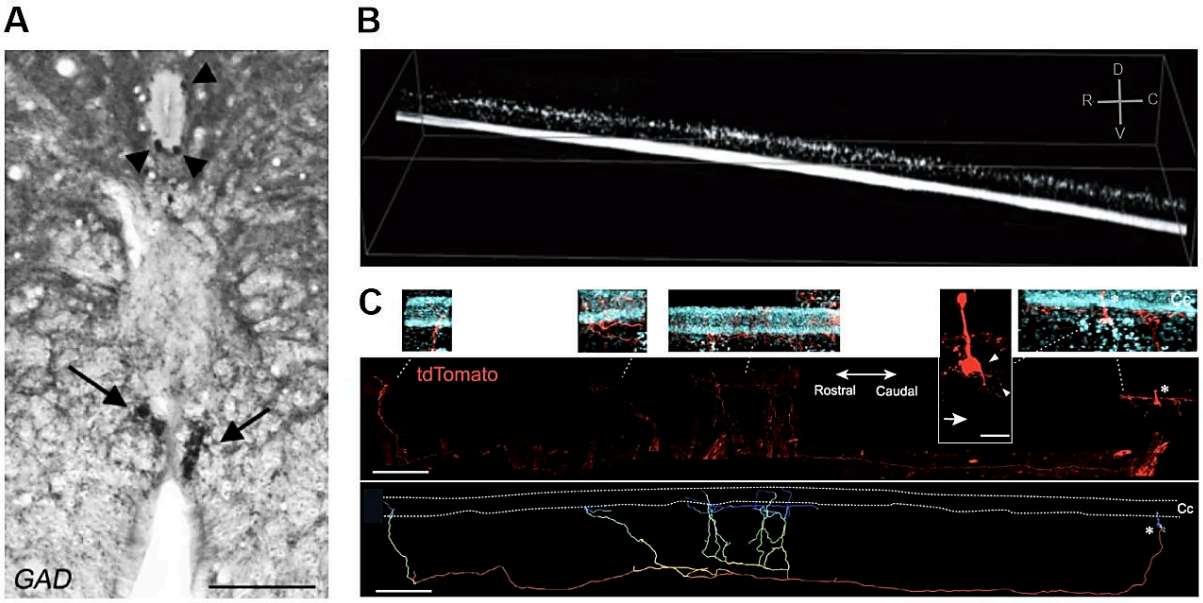


Figure 23 | **Projections axonales des Nc-LCS chez les rongeurs**

(A) Microscopie optique d'une coupe coronale de ME lombaire chez le rat, montrant une immunoréactivité positive pour la GAD autour du CC (triangles) et de la fissure médiane ventrale (flèche ; échelle : 100 µm) (Stoeckel et al., 2003). **(B)** Microscopie à feuillets de lumière d'un segment transparisé de ME lombaire, observé en vue latérale, montrant la distribution rostro-caudale des Nc-LCS chez une souris exprimant la tdTomato dans les Nc-LCS (Taille de la boite en µm axe Rostro-caudal x Latéro-médian x Dorso-ventral : 3734.25 x 1228.50 x 1192) (Crozat et al., 2024 BioRxiv). **(C)** Vue latérale du segment cervical d'une souris Rosa26lsl-tdTomato, injectée avec un AAV-Syn-Cre, permettant de cibler spécifiquement les Nc-LCS via une injection intraventriculaire. Images représentatives d'un Nc-LCS tdTomato$^+$ localisé au niveau du CC (DAPI : en bleu) et de ses projection (en rouge) (flèche : axone, triangle : dendrites, astérisques : soma) et sa reconstruction (en bas).

Récemment, en collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri, nous avons étudié les cibles postsynaptiques des Nc-LCS au niveau lombaire, en utilisant des souris exprimant la synaptophysine, une protéine de la machinerie de la libération vésiculaire, couplée à la tdTomato dans les Nc-LCS **(Figure 24A)**. Sur des tranches coronales de ME lombaire de ses souris, un immunomarquage anti-ChAT (marqueur les neurones cholinergiques), met en évidence, des boutons présynaptiques tdTomato$^+$, à proximité de trois populations de

neurones cholinergiques : les interneurones V0c, les motoneurones de la colonne motrice médiane (MMC) et latérale (LMC) **(Figure 24B)** (Gerstmann et al., 2022). De plus, d'autres sous-types d'interneurones ventraux pourraient également constituer des cibles des Nc-LCS, puisque des boutons synaptiques ont été détectés près des interneurones dI4-6/V0 (Lhx1$^+$) et V2a (Chx10$^+$), mais pas autour d'interneurones V1 (Cellules de Renshaw : calbindine$^+$ et V1 FoxP2$^+$) **(Figure 24C)** (Gerstmann et al., 2022). Ainsi, les Nc-LCS semblent établir des connexions avec des interneurones clés du réseau moteur spinal, ainsi qu'avec des motoneurones.

Toutefois, aucune donnée histologique n'a permis de retracer précisément les voies de projection des axones depuis le soma des Nc-LCS jusqu'à leur terminaison synaptique, et aucune étude fonctionnelle n'a encore été réalisée chez le mammifère. La caractérisation fonctionnelle des partenaires postsynaptiques sera abordée dans la partie résultats.

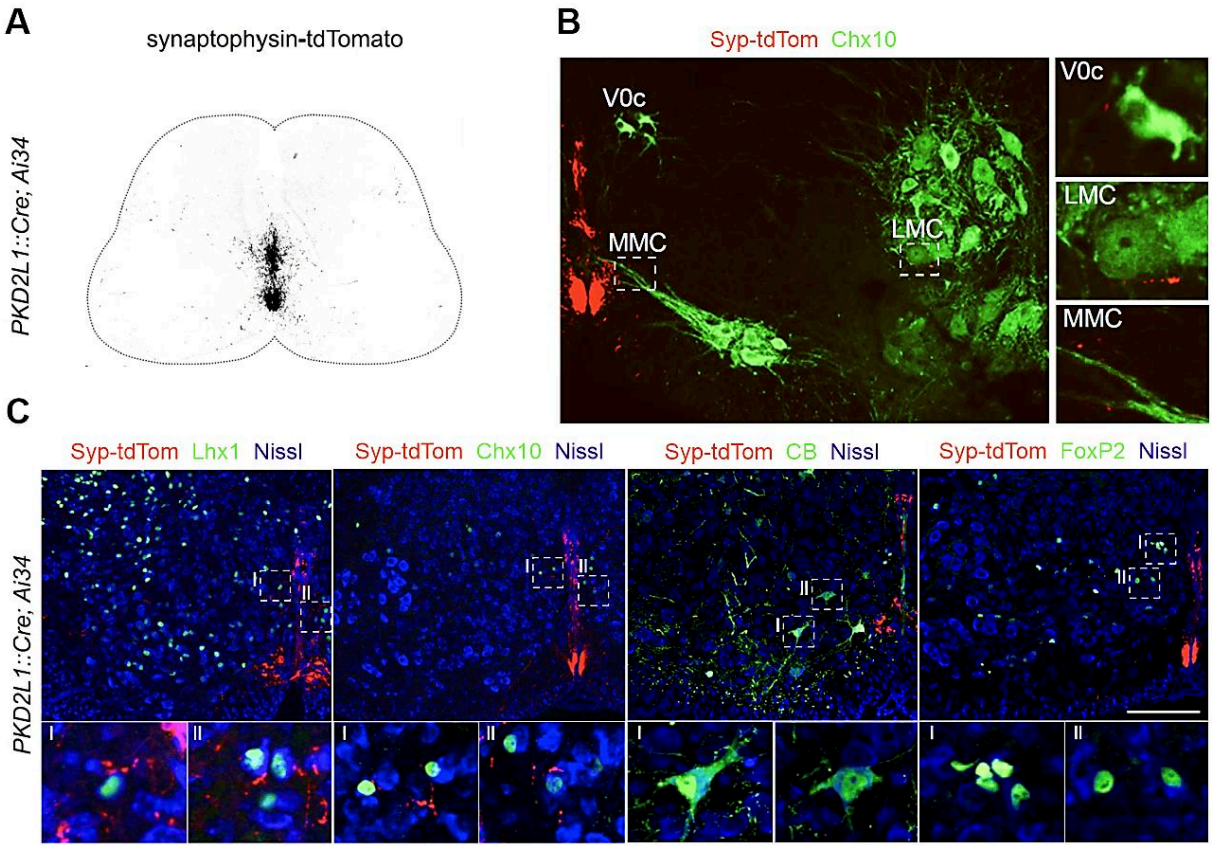


Figure 24| **Partenaires post-synaptiques des Nc-LCS chez les rongeurs**

(A) Image représentative d'un marquage des Nc-LCS par la synaptophysine couplée à la tdTomato, sur une tranche coronale de ME lombaire de souris P7 Pkd2l1::Cre. **(B)** Image représentative d'une tranche coronale lombaire de souris P7 Pkd2l1::Cre, montrant des puncta synaptophysine-tdTomato$^+$ en contact avec des cellules ChAT$^+$: interneurones V0c, motoneurones MMC et LMC (échelle : 200 µm). **(C)** Images représentatives de puncta synaptophysine-tdTomato$^+$ en contact avec les interneurones Lhx1$^+$ (V0/dI4-6) et Chx10$^+$ (V2a), mais pas sur les interneurones calbindine$^+$ (CB) de la corne ventrale (cellules de Renshaw), ni les interneurones FoxP2$^+$ (V1) (échelle : 200 µm) (Gerstmann et al., 2022).

9- Fonctions des Nc-LCS

a) Le rôle des Nc-LCS dans la sécrétion de molécules bioactives ?

La fonction de sécrétion a été l'un des premiers rôles hypothétiques attribués aux Nc-LCS par Vigh et collaborateurs. Chez plusieurs espèces de vertébrés, des terminaisons des Nc-LCS, ont été observées à la surface ventrolatérale de la ME, suggérant de possibles contacts avec le LCS sous-arachnoïdien ou avec des vaisseaux méningés. Par ailleurs, l'ultrastructure de ces terminaisons, révèle la présence de vésicules synaptiques (200-400 Å) et granulaires (600-

1800 Å), caractéristiques des zones neurosécrétrices (Vigh et al., 1977). Des vésicules granulaires ont également été observées dans le bud et le soma des Nc-LCS, accompagnées de nombreuses mitochondries (Vigh et al., 1983), ainsi qu'un réticulum endoplasmique très développé (Fujita et al., 2012). La localisation stratégique des Nc-LCS entre le LCS et le parenchyme, ainsi que ces observations anatomiques, suggèrent qu'ils pourraient avoir une fonction sécrétrice, bien que cette hypothèse doive être démontrée sur le plan fonctionnel.

b) Les Nc-LCS, des neurones sensoriels ou intéroceptifs

Plusieurs éléments suggèrent que les Nc-LCS possèdent une fonction sensorielle. Tout d'abord, ces neurones envoient une dendrite vers le CC, qui se termine par une protrusion au contact du LCS (Orts-Del'Immagine et al., 2012 ; Djenoune et al., 2014 ; Orts Del'Immagine et al., 2015 ; Petracca et al., 2016). De plus, les Nc-LCS expriment spécifiquement le canal PKD2L1, un membre de la superfamille des canaux TRP, souvent impliqués dans des fonctions sensorielles (Clapham, 2003). Par ailleurs, il a été démontré que ces neurones expriment des canaux ASICs (Acid Sensing Ionic Channels) fonctionnels (Orts-Del'Immagine et al., 2012 ; Jalalvand et al., 2016). Ces canaux ioniques, sont exprimés dans les neurones sensoriels et possèdent à la fois des fonctions chémosensibles, mais aussi mécanosensibles (Welsh et al., 2002 ; Jalalvand et al., 2016 ; W.-G. Li & Xu, 2010). Enfin, des cils primaires avec des fonctions sensorielles, ont été observés dans les Nc-LCS de plusieurs vertébrés (Vigh et al., 1977 ; Stoeckel et al., 2003 ; Bishop et al., 2007 ; Marichal et al., 2009 ; Orts-Del'Immagine et al., 2014).

Chémosensibilié des Nc-LCS

En 1989, Vigh-Teichmann et collaborateurs ont suggéré que les Nc-LCS pouvaient détecter des variations de la composition du LCS (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989).

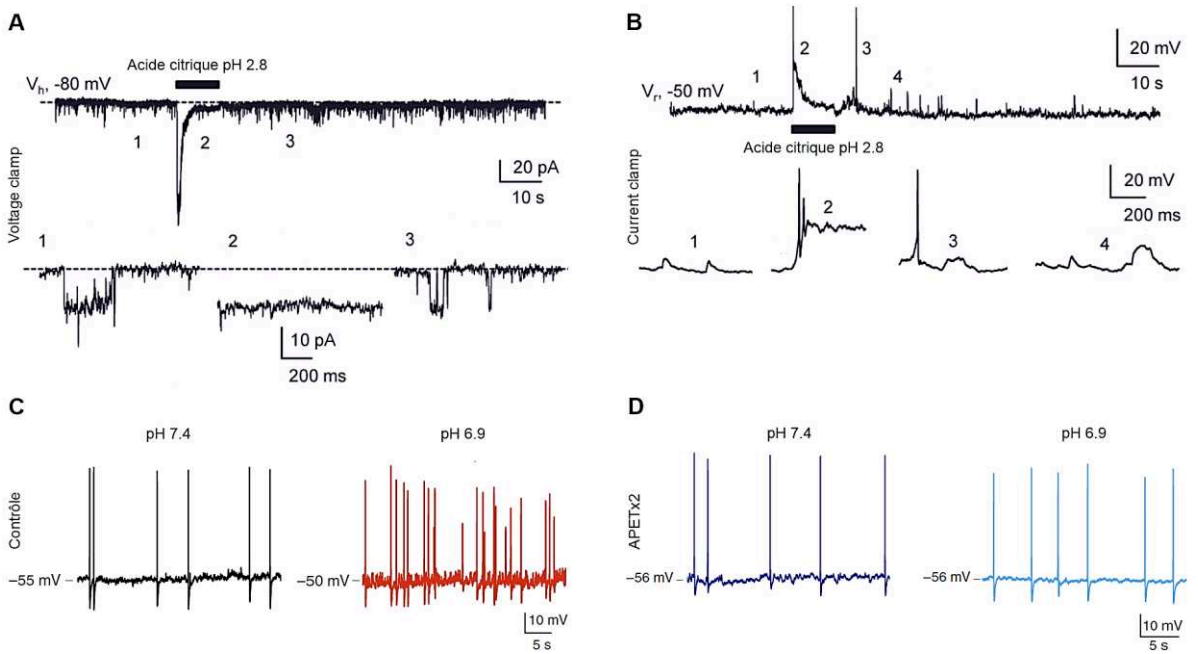


Figure 25 | Les Nc-LCS détectent l'acidification du milieu extracellulaire grâce à l'activation des canaux ASIC

(A) Trace représentative de courants spontanés enregistrés en VC à V_h -80 mV dans un Nc-LCS, de tronc cérébral de souris, avant (1), pendant (2) et après (3) l'application par pression d'une solution à 30 mM d'acide citrique (pH 2,8 ; 10 s). L'activité du canal PKD2L1 est totalement bloquée pendant l'acidification du milieu extracellulaire. **(B)** Trace représentative enregistrée en CC à un RMP de -50 mV dans le même Nc-LCS qu'en A, avant (1), pendant (2) et après (3) l'application d'acide citrique, dans les mêmes conditions qu'en A. L'acidification extracellulaire induit une décharge de PA au début de l'acidification ; due probablement au courant entrant observé en A, suivie de dépolarisations (Adaptée de Orts-Del'Immagine et al., 2012). **(C-D)** Traces représentatives d'enregistrements en CC de Nc-LCS chez la lamproie. En condition contrôle, à pH 7,4 et en présence de gabazine (20 µM), AP5 (100 µM) and NBQX (40 µM), pour bloquer la transmission GABAergique, glutamatergique (R-NMDA, kainate et AMPA), respectivement, le neurone présente des PA spontanés (en rouge). La diminution du pH à 6,9, augmente la fréquence de décharge des PA. **(D)** L'augmentation de la fréquence de décharge des PA, induite par l'acidification du milieu extracellulaire, est abolie par la présence d'APETx2 (2 µM, en bleu clair), un antagoniste des canaux ASIC3 (Jalalvand et al., 2016b).

Chez la souris, cette hypothèse a été confirmée sur des Nc-LCS du tronc cérébral. L'acidification extrême du milieu extracellulaire avec une solution d'acide citrique à un pH 2,8 inhibe l'activité basale du canal PKD2L1 **(Figure 25A)**. En mode courant imposé, l'acidification extracellulaire entraîne une large dépolarisation générant des PA suivis de petites dépolarisations (Orts-Del'Immagine et al., 2012) **(Figure 25B)**. Quatre ans plus tard, les mêmes auteurs ont montré que la détection de l'acidification extracellulaire persiste chez des souris mutantes pour la protéine PKD2L1, suggérant une implication des canaux ASICs (Orts Del'Immagine et al., 2015).

Chez la lamproie, l'acidification du milieu extracellulaire, passant d'un pH de 7,4 à 6,9, induit une augmentation de la fréquence de décharge des PA, dans les Nc-LCS **(Figure 25C)**. Cet effet est bloqué par l'antagoniste APETx2, spécifique des ASIC3 **(Figure 25D)**, confirmant les résultats obtenus chez la souris. Les Canaux ASIC3 augmenteraient ainsi l'excitabilité des Nc-LCS suite à une acidification du milieu extracellulaire (Jalalvand et al., 2016).

Contrairement à l'effet de l'acidification, l'alcalinisation du milieu extracellulaire active les canaux PKD2L1. Chez la souris, en mode voltage-imposé, l'application d'une solution TAPS à un pH de 8,8, augmente la probabilité d'ouverture du canal PKD2L1 de 88 %, sans affecter l'amplitude du courant unitaire **(Figure 26A)**. Cette alcalinisation augmente également la fréquence de décharge des PA dans les Nc-LCS du tronc cérébral (Orts-Del'Immagine et al., 2012) **(Figure 26B)**. Chez les souris KO pour la protéine PKD2L1, l'alcalinisation n'a plus d'effet, suggérant que canal PKD2L1 est activé par l'alcalinisation du milieu extracellulaire, à l'origine de l'augmentation de l'excitabilité des Nc-LCS (Orts Del'Immagine et al., 2015). Nous avons récemment confirmé ces résultats dans les Nc-LCS spinaux (Crozat et al., 2024 BioRxiv).

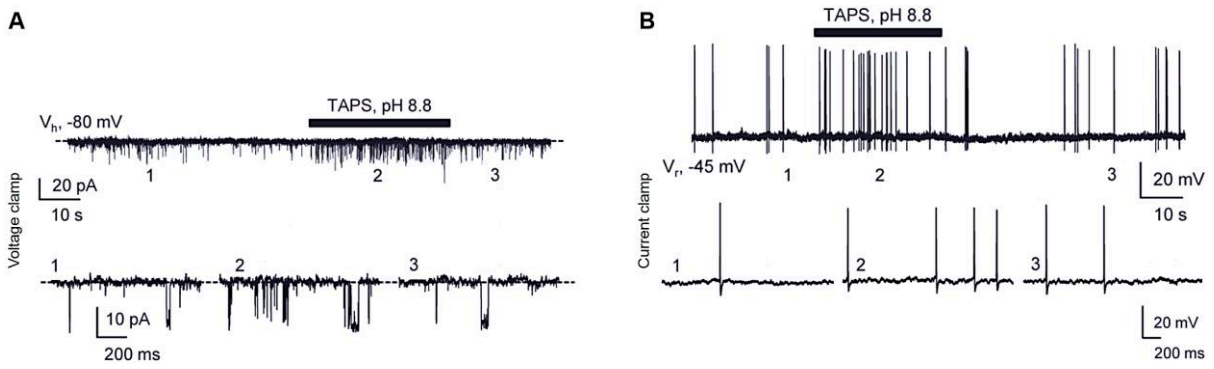


Figure 26| **L'alcalinisation augmente à la fois l'activité du canal PKD2L1 et l'excitabilité des Nc-LCS**

(A) Trace représentative de courants spontanés enregistrés en VC à V_h -80 mV dans un Nc-LCS du tronc cérébral de souris, avant (1), pendant (2) et après (3) l'application par pression d'une solution alcaline TAPS à un pH 8,8 (30 s, ligne pointillée : fermeture du canal). L'activité du canal PKD2L1 est augmentée par l'alcalinisation du milieu extracellulaire. **(B)** Trace représentative enregistrée en CC à un RMP de -45 mV dans le même Nc-LCS qu'en A, avant (1), pendant (2) et après (3) l'alcalinisation du milieu, qui induit une augmentation de la décharge de PA (Adaptée de Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Toujours chez la souris, l'application d'une solution hypertonique sur les Nc-LCS du tronc cérébral tend à réduire la probabilité d'ouverture du canal unitaire **(Figure 27A)**, alors qu'une solution hypotonique l'augmente de manière significative sans affecter l'amplitude du courant **(Figure 27B)**. Cela démontre que l'activité du canal PKD2L1 est régulée par les variations d'osmolarité extracellulaire. Les auteurs expliquent ces variations d'activité du canal par des changements de volume cellulaire : la cellule gonfle sous l'effet d'un choc hypo-osmotique, tandis qu'un choc hyper-osmotique la fait se rétracter (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

En résumé, grâce à l'expression fonctionnelle des canaux PKD2L1 et ASICs, les Nc-LCS pourraient constituer un système capable de détecter les variations de pH et d'osmolarité et d'intégrer ces informations pour ajuster leur niveau d'excitabilité.

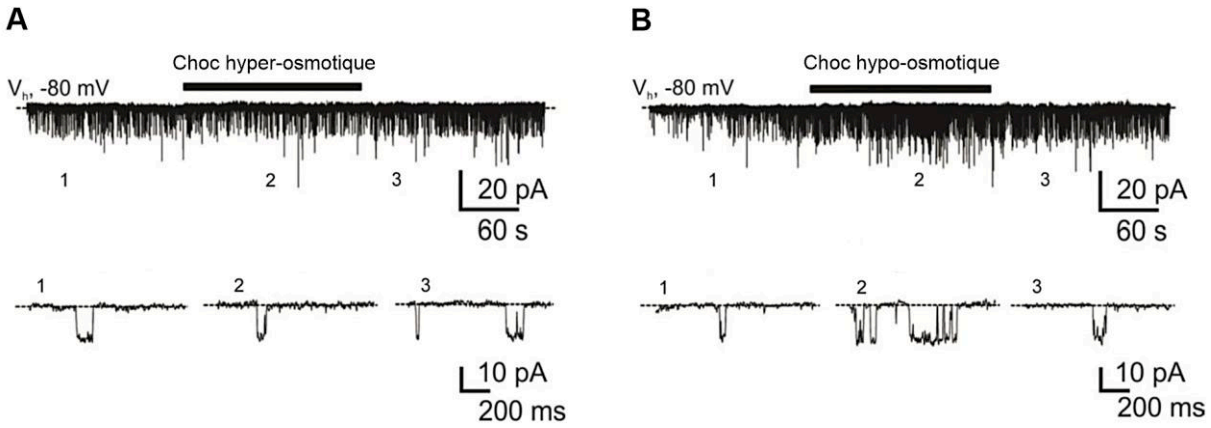


Figure 27 | Un choc hypo-osmotique extracellulaire augmente fortement l'activité du canal PKD2L1

(A) Trace représentative de courants spontanés enregistrés en VC à V_h -80 mV dans un Nc-LCS du tronc cérébral de souris, avant (1), pendant (2) et après (3) l'application par pression d'une solution hyper-osmotique (3 min, ligne pointillée : fermeture du canal). **(B)** Trace représentative de courants spontanés enregistrés en VC à V_h -80 mV dans un Nc-LCS, avant (1), pendant (2) et après (3) l'application par pression d'une solution hypo-osmotique (3 min). L'activité du canal PKD2L1 est augmentée par le choc hypo-osmotique (Adapté de Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Mécanosensibilité des Nc-LCS

Des recherches menées sur la lamproie ont révélé que les Nc-LCS de type 1 sont sensibles aux mouvements de flux **(Figure 28A)**. Lorsque ces cellules sont soumises à un flux sous pression, un PA peut être enregistré en mode courant imposé dans ces cellules. Cette réponse est directement liée à l'activation mécanique des Nc-LCS, puisqu'elle persiste en présence de bloqueurs synaptiques ou de TTX (Jalalvand et al., 2016). Précédemment, il a été démontré que les Nc-LCS expriment des canaux ASICs fonctionnels (Orts-Del'Immagine et al., 2012 ; Jalalvand et al., 2016), sensibles à la fois au pH et aux stimuli mécaniques (Chalfie, 2009 ; Welsh et al., 2002). L'application d'APETx2, un inhibiteur des canaux ASIC3, bloque la réponse mécanique induite par l'application du flux, suggérant que la mécanosensibilité des Nc-LCS est médiée par les canaux ASIC3 **(Figure 28B)** (Jalalvand et al., 2016).

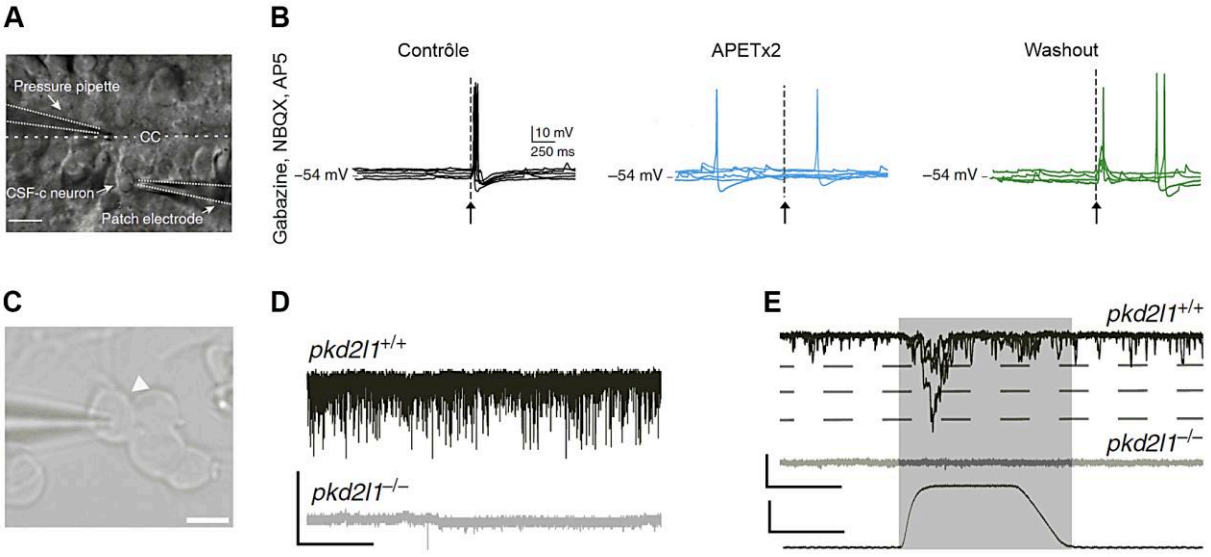


Figure 28 | Les Nc-LCS sont sensibles aux mouvements de fluides *in vitro*

(A) Image en infrarouge d'une tranche longitudinale aigue de lamproie avec le CC visible en son centre (ligne pointillée), l'électrode de patch enregistrant un Nc-LCS et la pipette d'application par pression (échelle 10 µM). **(B)** Traces représentatives d'enregistrements en CC d'un Nc-LCS, pendant des stimulations par pression (20 p.s.i, 80 ms), avant, pendant et après l'application d'APETx2, un inhibiteur des canaux ASIC3 (2 mM), en présence de gabazine (20 mM), d'AP5 (100 mM) et de NBQX (40 mM) dans le bain (Jalalvand et al., 2016b). **(C)** Image en lumière transmise de Nc-LCS en culture à partir d'un embryon Tg(pkd2l1:TagRFP), avec une électrode de patch positionnée sur un Nc-LCS (flèche, échelle : 5 µm). **(D)** Traces représentatives d'enregistrements en VC de Nc-LCS pkd2l1$^{+/+}$ (en noir) et pkd2l1$^{-/-}$ (en gris) en culture (échelle : 20 pA, 2 s). **(E)** Traces représentatives d'enregistrements en VC de Nc-LCS pkd2l1$^{+/+}$ (en noir) et pkd2l1$^{-/-}$ (en gris) (échelle : 25 pA, 20 ms), avant, pendant (fenêtre grise) et après l'application d'un stimulus mécanique par une pipette en verre (échelle : 2 µm, 20 ms) (Sternberg et al., 2018).

Une étude sur des Nc-LCS de larves de poisson-zèbres en culture a montré que ces cellules répondent également aux stimuli mécaniques via le canal PKD2L1 **(Figure 28C)**. L'application d'un stimulus mécanique sur la membrane des Nc-LCS augmente la probabilité d'ouverture du canal PKD2L1, ce qui n'est pas observé chez les Nc-LCS mutants pour ce canal **(Figure 28D et E)**. Ainsi, les Nc-LCS répondent directement aux stimuli mécaniques par le biais du canal PKD2L1, suggérant que leur activité pourrait notamment refléter le flux de LCS *in vivo* (Sternberg et al., 2018).

Une fois la mécanosensibilité des Nc-LCS établie au niveau membranaire, plusieurs études ont cherché à reproduire ces résultats sur des préparations de ME isolées. Chez la lamproie, l'application d'un mouvement latéral sur la partie caudale de la ME (courbure passive), mimant un comportement de nage, induit une augmentation de l'activité des Nc-LCS, suivie par des variation de l'intensité de fluorescence d'un indicateur calcique (Oregon Green Bapta-1 dextran) **(Figure 29A)** (Jalalvand et al., 2016).

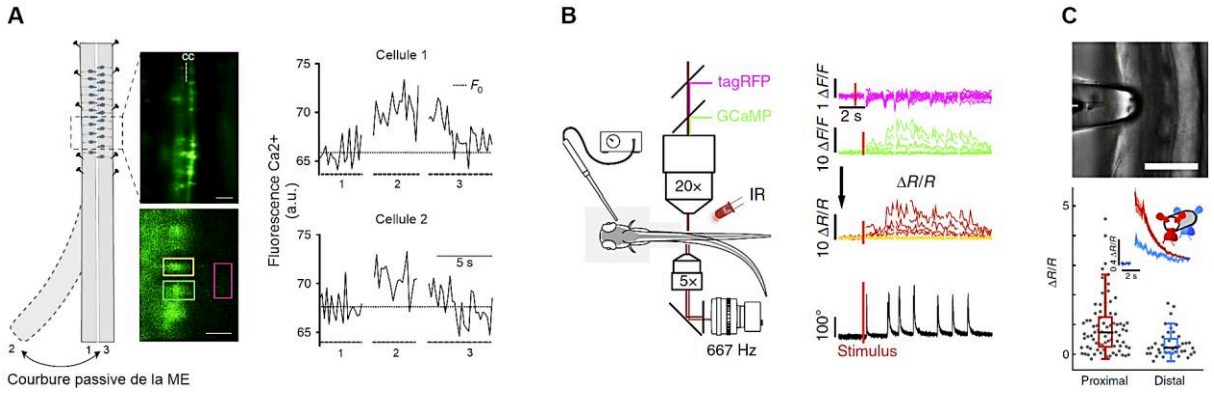


Figure 29 | Les Nc-LCS sont sensibles aux stimuli mécaniques

(A) Schéma expérimental du mouvement passif de la partie caudale de la ME d'une lamproie. L'injection d'un indicateur calcique (Oregon Green 488 Bapta-1 dextran : traceur rétrograde) dans la ME, permet de suivre l'activité calcique de deux Nc-LCS localisés autour du CC (rectangles jaune et bleu), avant (1), pendant (2) et après (3) la courbure latérale de la moelle (ligne pointillée : fluorescence basale moyenne avant le mouvement, F_0) (Jalalvand et al., 2016b). **(B)** Schéma expérimental de l'imagerie biphotonique de Nc-LCS exprimant tagRFP (magenta) et GCaMP5 (vert), dans une larve de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:GCaMP5, pkd2l1:tagRFP), dont la tête est immobilisée. L'activité des Nc-LCS est enregistrée avant, pendant (stimulus, trait rouge) et après un jet d'eau sur la vésicule otique de la larve. La soustraction des variations de fluorescences du tagRFP (en magenta) au signal GCaMP (en vert), a permis de retirer les artéfacts de mouvements de la larve, et d'obtenir la trace des variations de fluorescence ΔR/R (en marron, échelle 10 mm). En parallèle, les déflections de la queue de la larve, induit par le réflexe d'échappement sont enregistrées (trace noire, en bas). **(C)** Image infrarouge d'un stimulus mécanique latéral, appliqué par la pointe d'une électrode de verre sur la queue d'une larve paralysée (échelle : 50 mm) et le boxplot de la variation de fluorescence corrigée (ΔR/R) des Nc-LCS proximaux (<100 µm, en rouge) et distaux (>100 µm, en bleu) du point de stimulation (Böhm et al., 2015).

Chez la larve de poisson-zèbre, une déformation mimant une contraction musculaire peut être induite de façon active par la stimulation de la vésicule otique, ou passive par un stimulus mécanique de la queue. Böhm et collaborateur ont montré que la courbure active de la queue, induite par un comportement de fuite **(Figure 29B)**, ainsi que la courbure passive de la queue d'une larve anesthésiée **(Figure 29C)**, ont activé les Nc-LCS. Il est à noter que les Nc-LCS situés à proximité de la stimulation sont fortement activés, par rapport aux Nc-LCS plus distaux. Par ailleurs, les auteurs ont montré que les Nc-LCS répondent principalement à des stimuli mécaniques associés à une contraction musculaire et que cette réponse est dépendante du canal PKD2L1, puisqu'elle est abolie chez les mutants PKD2L1. Ces résultats suggèrent que le canal PKD2L1 joue un rôle important dans la détection de la courbure de la ME chez le poisson-zèbre (Böhm et al., 2016).

Chez des embryons de poisson-zèbres, présentant une altération de la mobilité ciliaire, l'injection de billes fluorescentes dans le système ventriculaire, a mis en évidence un flux de LCS défectueux, empêchant son transport vers les régions caudales du CC **(Figure 30A)**. Lorsque le flux de LCS est perturbé, une courbure anormale de la colonne vertébrale est

observée chez l'embryon (Sternberg et al., 2018) **(Figure 30A, en haut à droite)**, ainsi que chez l'adulte (Grimes et al., 2016). Dans ces conditions, l'activité spontanée des Nc-LCS est totalement supprimée, suggérant que leur fonctionnement dépend du flux de LCS **(Figure 30A, en bas)** (Sternberg et al., 2018). Par ailleurs, chez les larves dépourvues de motilité ciliaire, le comportement d'échappement, n'induit plus d'augmentation de l'activité calcique dans les Nc-LCS ventraux et dorsaux (en bas, traces bleues), comparé au contrôle (en haut, traces vertes). L'activité de PKD2L1 dans les Nc-LCS a également un impact sur la morphogenèse de la colonne vertébrale, puisque la perte de fonction du canal PKD2L1, est associée à une courbure anormale de la colonne vertébrale à l'âge adulte **(Figure 30C)**. Le rôle de PKD2L1 dans la morphogenèse de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre, est confirmé par des études menées chez les souris KO pour PKD1 ou PKD2, présentant des défauts dans le développement des reins, du pancréas, du cœur et du squelette (G. Wu et al., 2000 ; Boulter et al., 2001).

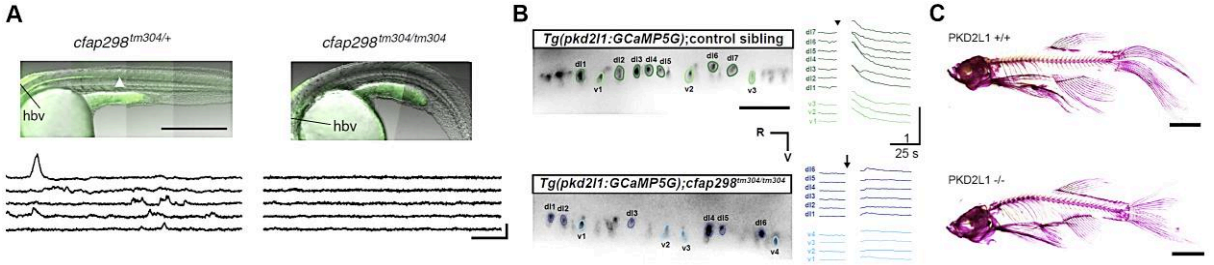


Figure 30| **La réponse sensorielle des Nc-LCS est altérée chez les mutants pour les cils mobiles**

(A) Images représentatives de larves de poisson-zèbre cfap298$^{tm304/+}$ et cfap298$^{tm304/tm304}$, mutantes hétérozygotes ou homozygotes chez lesquelles, les cils mobiles sont défectueux, après l'injection de billes fluorescentes dans le ventricule du rhombencéphale (hbv, échelle : 250 µm), accompagnées des variations de fluorescences de l'activité calcique des Nc-CS (Indicateur calcique GCaMP5 : 30% ΔF/F, 30 s) (Sternberg et al., 2018). **(B**) Vues sagittales des Nc-LCS enregistrés et les ROI utilisées pour calculer les variations de fluorescences ΔF/F des Nc-LCS dorsaux et ventraux, échelle : 500 µm), accompagnées des transients calciques des Nc-LCS, enregistrés dans des larves contrôles (en vert) et dans des larves Tg(pkd2l1:GCaMP5G), cfap298$^{tm304/tm304}$ (en bleu), avant et après la stimulation de la vésicule otique, (flèche), (Orts-Del'Immagine et al., 2020). **(C)** Coloration rouge Alizarin des os de poisson-zèbres adultes (20 mois) pkd2l1$^{+/+}$ et pkd2l1$^{-/-}$ (échelle : 5 mm) (Sternberg et al., 2018).

En 1921, Kolmer a émis l'hypothèse que les Nc-LCS spinaux pourraient percevoir les mouvements de la colonne vertébrale par l'intermédiaire de la fibre de Reissner, une agrégation glycoprotéique de la SCO-spondine, sécrétée dans le quatrième ventricule et s'étendant le long du CC. Ainsi, les mouvements de la colonne entraîneraient un déplacement de cette fibre, qui pourrait être détecté par les terminaisons sensorielles (bud/kinocilium) des Nc-LCS (Vigh & Vigh-Teichmann, 1998). Des études récentes ont mis en lumière une interaction entre la fibre de Reissner, les microvillosités et le cil mobile des Nc-LCS dans la lumière du CC **(Figure 31A et B)**. Orts et collaborateurs ont vérifié cette hypothèse en démontrant que l'absence de la fibre de Reissner chez les larves de poisson-zèbres mutantes pour la SCO-spondine, supprime la réponse mécanosensorielle des Nc-LCS (ventraux et dorsaux) lors de la courbure de la queue (flèche ; **Figure 31C**), sans affecter l'activité du canal PKD2L1, ni leurs propriétés intrinsèques. Cela suggère que les Nc-LCS détectent la courbure de la colonne en interagissant avec la fibre de Reissner (Orts-Del'Immagine et al., 2020). La modification de cette interaction, qui transmet l'information d'une courbure du corps aux Nc-LCS, pourrait expliquer le phénotype de scoliose observé chez le poisson-zèbre (Sternberg et al., 2018).

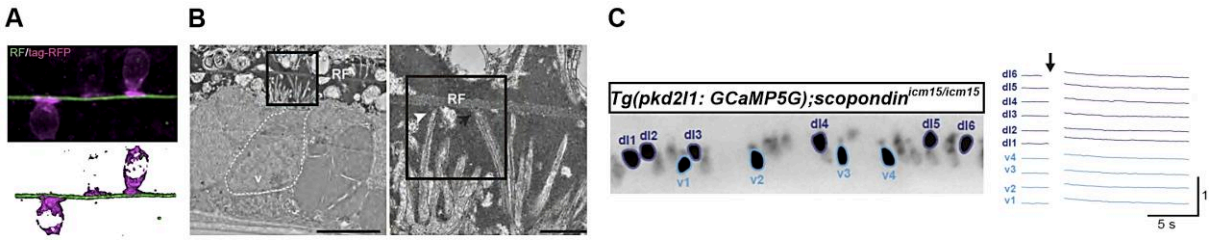


Figure 31| **La réponse sensorielle des Nc-LCS à la courbure de la moelle épinière est altérée en l'absence de la fibre de Reissner**

(A) Projection de sections optiques en vue sagittale imagées après immunohistochimie contre tag-RFP (Nc-LCS : pkd2l1^{+}, en magenta) et la fibre de Reissner (RF, en vert), d'une larve de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:GAL4;UAS:tagRFPCAAX) et la reconstruction 3D du z stack. **(B)** Microscopie électronique à transmission (MET), d'une coupe sagittale de ME d'une larve de poisson-zèbre, montrant un Nc-LCS avec des microvillosités (flèche blanche) et un cil mobile (flèche noire) proche de la RF. **(C)** Les transients calciques des Nc-LCS ont été enregistrés dans des larves Tg(pkd2l1:GCaMP5G), scopondin$^{icm15/icm15}$ (en bleu), où la RF est absente, avant et après la stimulation de la vésicule otique (flèche, vue sagittale) (Orts-Del'Immagine et al., 2020).

En conclusion, les Nc-LCS possèdent des propriétés chémosensibles en détectant des variations de la composition du milieu extracellulaire et du LCS, ainsi que mécanosensibles, puisqu'ils sont activés par des modifications de la courbure de la colonne vertébrale. A l'avenir, l'un des enjeux sera d'identifier en conditions physiologiques, les signaux chimiques auxquels les Nc-LCS répondent. Ces données suggèrent que les Nc-LCS représentent des acteurs du système sensoriel intéroceptif, capables d'intégrer des stimuli de différents types pour transmettre l'information vers des populations neuronales qu'il reste à caractériser.

c) Le rôle des Nc-LCS dans la modulation de l'activité motrice

Chez le poisson-zèbre

De façon générale, le comportement est le résultat final de l'intégration sensorielle par le SNC. Les poissons peuvent ainsi effectuer une nage lente lors d'un comportement d'exploration, caractérisé par des battements lents, symétriques et alternés de la queue. Ils peuvent également adopter une nage rapide lors d'un comportement d'échappement, appelé réaction de fuite en « C », impliquant la contraction unilatérale de la musculature axiale dans la direction opposée au stimulus, en pliant le corps en forme de « C », suivie d'une contraction controlatérale de la musculature de l'autre côté du corps (Domenici, 2010). Ces deux comportements sont notamment modulés par différents réseaux spinaux **(Figure 32)**.

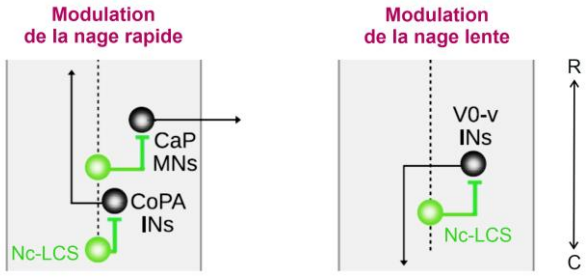


Figure 32| **Modulation de la nage chez la larve de poisson-zèbre**

Représentation schématique des circuits neuronaux spinaux impliqués dans la modulation de la nage rapide (à gauche) et de la nage lente (à droite) (Vue dorsale, ligne pointillée : ligne médiane de la ME) (Adapté de Wu & Carbo-Tano et al., 2021).

Au niveau de la ME, la locomotion dépend d'un réseau de neurones capable de générer des commandes motrices périodiques, essentielles pour réaliser des mouvements rythmiques. Ce réseau est appelé générateur central de patron (CPG). De nombreuses études réalisées chez le poisson-zèbre, ont mis en évidence le rôle des Nc-LCS spinaux dans la modulation de la locomotion. L'activation optogénétique des Nc-LCS initie un comportement de nage lente, qui est aboli par l'application de bicuculline, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, confirmant la nature GABAergique de la neurotransmission. Ces résultats indiquent que l'activation des Nc-LCS est suffisante pour activer le CPG locomoteur et ainsi induire une nage lente (Wyart et al., 2009) **(Figure 33A)**.

Dans le but d'évaluer le rôle des Nc-LCS dans la boucle sensori-motrice de la locomotion, des études ont examiné le comportement d'échappement, caractérisé par une nage rapide, chez la larve de poisson-zèbre mutante pour PKD2L1. Les résultats montrent une diminution de la fréquence de battement de la queue, suggérant que la détection de stimuli par les Nc-LCS, médiée par PKD2L1, est nécessaire pour optimiser la fréquence locomotrice lors de la nage rapide (Böhm et al., 2016). L'analyse de la connectivité fonctionnelle montre une connexion entre les Nc-LCS ventraux et deux éléments clés du circuit d'échappement : les motoneurones primaires CaPs (caudally located primary motor neurons), impliqués dans le contrôle postural et la nage rapide, et les interneurones sensoriels glutamatergiques CoPAs (commissural primary ascending interneurons), qui recrutent les motoneurones du côté controlatéral de la ME **(Figure 33B1)**. Le blocage de la transmission synaptique des Nc-LCS par la toxine botulique a révélé une augmentation des mouvements de rotation, la larve étant alors incapable de maintenir une posture stable lors de la nage **(Figure 33B2)**. Ces résultats suggèrent que les Nc-LCS, en détectant les mouvements latéraux de la colonne vertébrale, pourraient moduler l'excitabilité des composants du circuit d'échappement, pour assurer la stabilité posturale lors de la nage rapide. Ce système sensori-moteur, situé dans la ME, pourrait également intégrer des rétrocontrôles visuels et vestibulaires (Hubbard et al., 2016).

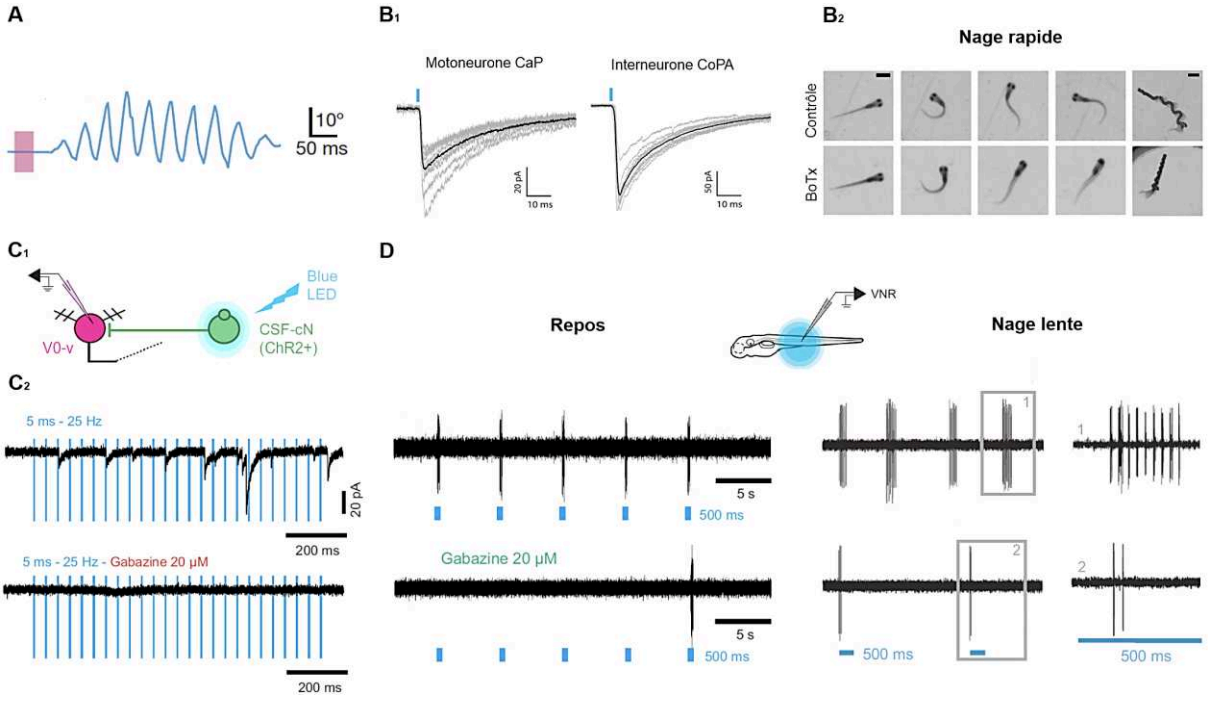


Figure 33 | Les Nc-LCS modulent la nage rapide et lente ainsi que la posture chez la larve de poisson-zèbre

(A) Trace représentative de l'angle de déflexion de la queue d'une larve (Gal4s1003t) après stimulation optogénétique des Nc-LCS (rectangle rose). **(B1)** Traces représentatives d'enregistrements en VC d'IPSC dans un motoneurone CaP et un interneurone CoPA, induits par l'activation optogénétique des Nc-LCS ChR2$^+$ dans des larves Tg(pkd2l1:gal4; UAS:ChR2-mCherry). **(B2)** Séquence d'images d'une larve de poisson-zèbre contrôle et Tg(pkd2l1:gal4; UAS:BoTxBLC-GFP), où les Nc-LCS sont éliminés par la toxine botulique, pendant l'induction acoustique d'un comportement d'échappement (nage rapide) (échelle : 1 mm - 2 mm) (Hubbard et al., 2016). **(C1)** Schéma expérimental de l'enregistrement en patch-clamp configuration cellule entière d'un interneurone V0v (vglut2a+, magenta), tout en stimulant des Nc-LCS ChR2$^+$ par la lumière dans une larve de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:gal4;UAS:ChR2-YFP;vglut2a:lox:DsRed:lox:GFP). **(C2)** Traces représentatives d'enregistrements en VC d'IPSC dans un V0v pendant la stimulation optogénétique des Nc-LCS, avant et après l'application de gabazine dans le bain. **(D)** Traces représentatives d'enregistrements extracellulaires d'une racine ventrale (VNR) de larve de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:gal4;UAS:ChR2-YFP), avec l'activation simultanée de la ChR2 par la lumière (rectangle bleu) dans les Nc-LCS, au repos (D, à gauche) en absence (en haut) et en présence de gabazine dans le bain (en bas). (D, à droite) Enregistrement de la VNR pendant une activité de nage fictive en absence (en haut) et en présence (en bas) de stimulations optogénétiques des Nc-LCS (Fidelin et al., 2015).

Suite à ces résultats et à l'hypothèse selon laquelle les Nc-LCS projettent sur des composants clés du CPG locomoteur responsables de la nage lente, des études ont cherché à identifier les cibles postsynaptiques des Nc-LCS. Des connexions axo-somatiques et axo-

dendritiques ont été observées entre les Nc-LCS et les interneurones glutamatergiques ventrolatéraux, appelés V0-v (MCoDs : multipolar commissural descending interneurons) (cf ci-dessus, Section IA 8b : Projections axonales et partenaires postsynaptique). Ces connexions synaptiques se sont révélées fonctionnelles, puisque l'activation optogénétique des Nc-LCS a permis d'enregistrer des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) GABAergiques dans les interneurones V0-v **(Figure 33C1 et C2)**. Lesquels présentent une activité rythmique lors d'épisodes de locomotion fictive lente. Fidelin et collaborateurs ont ainsi démontré que les Nc-LCS peuvent moduler le CPG locomoteur de manière état-dépendant. En effet, au repos, l'activation des Nc-LCS déclenche une activité de nage lente, tandis que leur activation durant une activité en cours, inhibe cette dernière en réduisant la durée et la fréquence des événements locomoteurs **(Figure 33D)**. Ces résultats suggèrent que les Nc-LCS peuvent moduler l'excitabilité du CPG locomoteur, en projetant sur des interneurones prémoteurs excitateurs de la nage lente (Fidelin et al., 2015).

Ces études dans le modèle de poisson-zèbre montrent que les Nc-LCS modulent les comportements liés aux CPGs locomoteurs, tant pour la nage rapide, lors de l'échappement acoustique, que pour la nage lente.

Récemment, une étude a montré que les Nc-LCS localisés dans la ME rostrale, font des connexions fonctionnelles avec des neurones réticulospinaux du tronc cérébral et sont responsables de l'augmentation de la vitesse et de la stabilisation de la posture pendant la nage. L'ablation biphotonique des Nc-LCS rostraux diminue la vitesse de nage et entraine des déficits posturaux pendant une réponse d'échappement. Ces résultats suggèrent que les retours sensoriels spinaux médiés par les Nc-LCS, sont capables de moduler les commandes descendantes du tronc cérébral vers la ME (M.-Y. Wu et al., 2021).

En plus des stimuli mécaniques, les Nc-LCS peuvent également détecter des stimuli chimiques et influencer le réseau locomoteur. Chez la lamproie, une diminution du pH extracellulaire réduit la fréquence des bouffées de PA, un effet annulé par l'ajout d'APETx2, un inhibiteur spécifique des canaux ASIC3 **(Figure 34, à gauche)**. Cela suggère que les Nc-LCS de type 1, peuvent ralentir le rythme locomoteur *via* les canaux ASIC3. De plus, ces Nc-LCS synthétisent du GABA et de la somatostatine (SST), et s'il a été montré que le GABA réduit l'activité locomotrice *via* les récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ (Tegnér et al., 1993), la fonction de la SST reste moins claire. Après l'application d'un antagoniste des récepteurs sst2 de la SST, Jalalvand et collaborateurs ont observé une augmentation du rythme locomoteur **(Figure 34, à droite)**. Comme chez la lamproie, les Nc-LCS sont les seules cellules à exprimer la SST dans la ME et qu'ils sont activés par une baisse du pH, l'augmentation du rythme locomoteur observée, pourrait être due à une libération tonique de SST par les Nc-LCS, puisque la baisse du pH n'affecte pas le rythme locomoteur (Jalalvand et al., 2016).

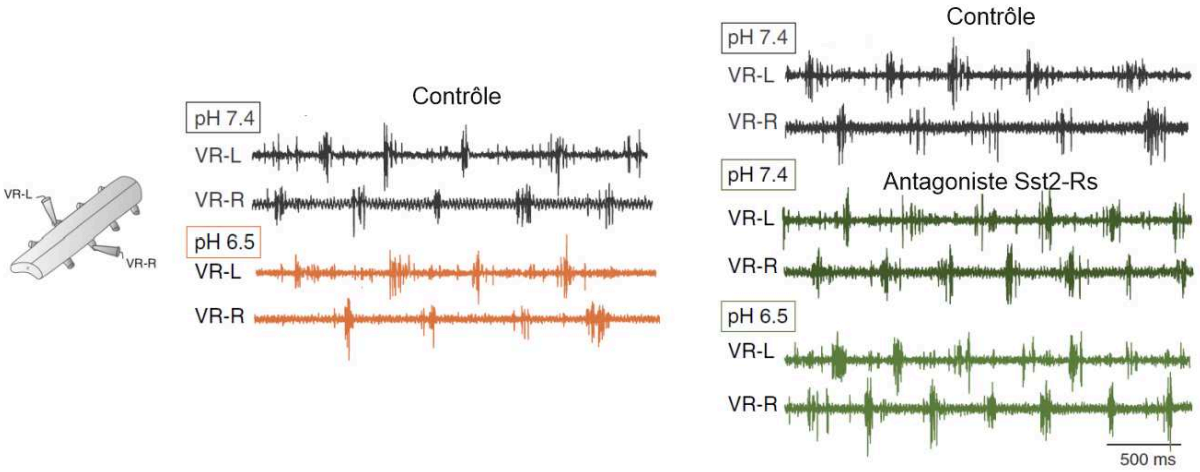


Figure 34| **Les Nc-LCS modulent la nage chez la lamproie**

Représentation schématique de l'enregistrement des racines ventrales gauche (VR-L) et droite (VR-R) sur une ME isolée de lamproie, pendant l'induction d'une locomotion fictive par 100 µM de NMDA. Traces représentatives d'enregistrements des VR en condition contrôle à un pH 7,4 (traces noires) et à 6,5 (traces orange), ou en présence d'antagoniste des récepteurs Sst2 (CYN-154806 : 2 mM ; à droite, traces vertes) à un pH 7,4 et 6,5 (Jalalvand et al., 2016b).

Ces découvertes suggèrent que les Nc-LCS spinaux représentent une nouvelle population de neurones sensoriels intrinsèques au SNC, capable de moduler l'activité motrice. Ces fonctions restent encore largement à être démontrée chez les mammifères.

Chez la souris

Contrairement au poisson-zèbre, les études sur la fonction des Nc-LCS, chez les mammifères, sont encore limitées. Les poissons et les vertébrés quadrupèdes, sont confrontés à des contraintes environnementales différentes qui influencent leur capacité à se déplacer. Bien qu'il existe des ressemblances dans les mécanismes de contrôle de la locomotion, il est légitime de se demander si les Nc-LCS remplissent des rôles similaires chez les mammifères. Deux études récentes se sont penchées sur la fonction des Nc-LCS chez la souris, en utilisant l'expression du canal PKD2L1 pour étudier leur implication dans les comportements moteurs.

Dans une étude récente, Gerstmann et collaborateurs se sont intéressés au rôle des Nc-LCS dans la modulation l'activité motrice. Ils ont ainsi génétiquement délété les Nc-LCS chez la souris à l'aide de la toxine diphtérique (expression sélective du récepteur) et n'ont constaté aucun déficit dans les comportements moteurs de base, comme la marche (vitesse, cycle du pas, stabilité). Cependant, lors de la réalisation de tâches complexes, comme le test de la poutre et de l'échelle horizontale, où la précision et les retours sensoriels sont essentiels, les souris traitées avec la toxine ont montré des déficits. Ces déficits se traduisent par un nombre plus élevé d'erreurs (chutes ou glissades), lorsque le test est plus exigeant (poutre plus étroite et barreaux de l'échelle plus espacés) **(Figure 35A2)**. De façon surprenante, le canal PKD2L1, nécessaire à la fonction des Nc-LCS chez le poisson-zèbre, ne semble pas jouer de rôle dans la réalisation de mouvements fins, puisque les souris KO pour le canal PKD2L1, réalisent les tests de la même façon que les souris PKD2L1$^{+/+}$ **(Figure 35B2)**. À l'inverse, ces déficits sont reproduits chez des souris dépourvues de cils dans les Nc-LCS. Ces structures sont mécanosensibles et répondent aux mouvements de fluide (ΔCil : ciliogenèse supprimée par l'élimination du transport des protéines par le transporteur intra-flagellaire Ift88, **Figure 35C**) (Gerstmann et al., 2022). Ces résultats suggèrent que les Nc-LCS jouent un rôle important dans l'habileté motrice, indépendamment de PKD2L1, mais lié aux structures ciliées. Il est à noter que des mécanismes compensatoires peuvent se mettre en place chez les souris KO pour le canal PKD2L1, qui ont été générées par croisement.

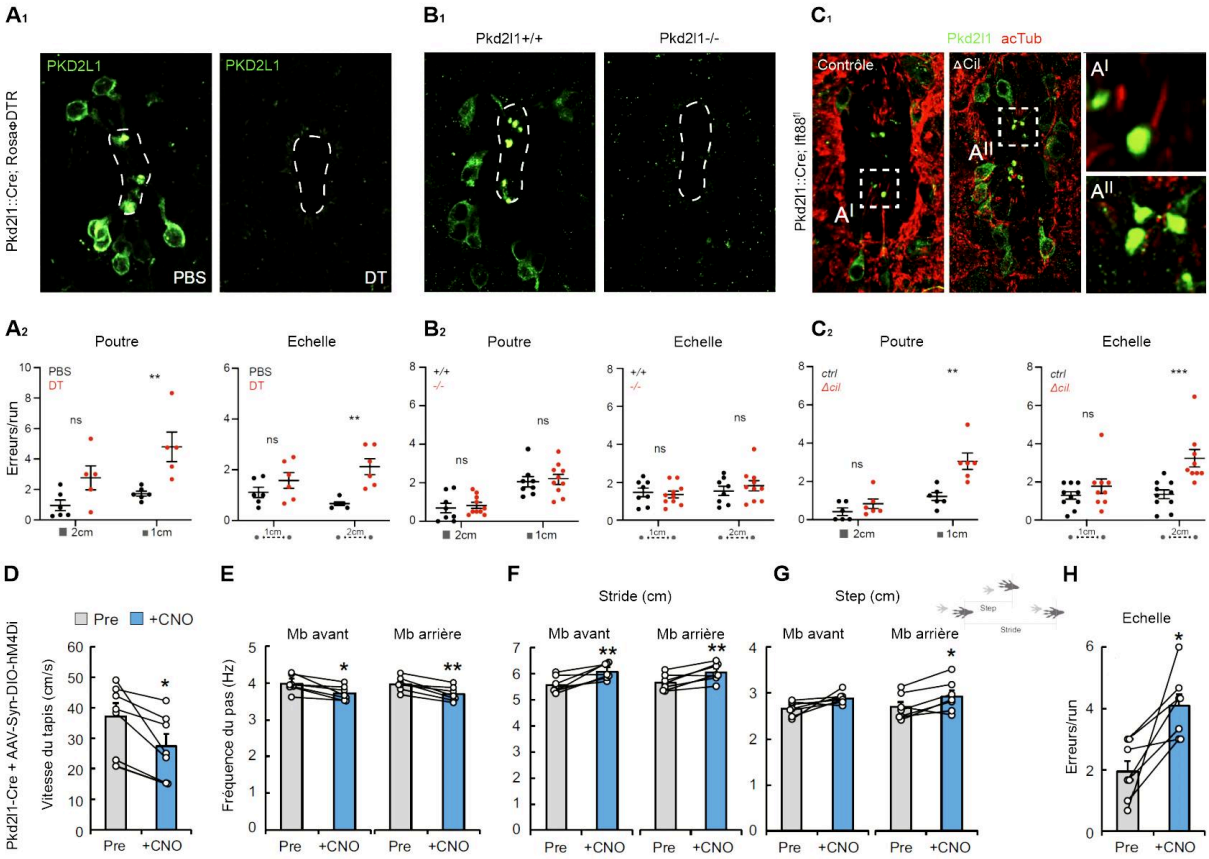


Figure 35 | **L'ablation ou l'inactivation des Nc-LCS perturbe la motricité fine et la locomotion chez la souris**

(A1) Microscopies confocales après immunomarquage de neurones Pkd2l1^{+} (en vert) autour du CC (ligne pointillée), 60 jours après l'injection de PBS (à gauche) ou de toxine diphtérique (DT), chez des souris Pkd2l1::Cre; RosaFDTR. **(B1)** Image de l'immunomarquage Pkd2l1 (en vert) chez des souris Pkd2l1$^{+/+}$ et Pkd2l1$^{-/-}$. **(C1)** Immunomarquage de Nc-LCS Pkd2l1^{+} (en vert) et de leurs protrusions dans la lumière du CC (AI et AII) et des cils tubuline-acétylée^{+} (acTub^{+}, en rouge), chez une souris contrôle et une souris ΔCil (Pkd2l1::Cre;Ift88fl), où la production des cils est altérée. **(A2, B2, C2)** Box-plot de la quantification du nombre d'erreurs de placement des pattes (glissades et chutes) pendant le test de la poutre (large de 2 ou 1 cm), ou pendant le test de l'échelle (barreaux espacés de 1 ou 2 cm) chez des modèles de souris respectifs (Gerstmann et al., 2022). **(D-H)** Tests comportementaux avant (en gris) et après l'inhibition chémogénétique des Nc-LCS, par le CNO (clozapine-N-oxide, en bleu), chez des souris Pkd2l1-Cre + AAV-Syn-DIO-hM4Di-mCherry (injection intracérébroventriculaire). **(D-G)** Locomotion sur tapis roulant, avec les box-plot de la mesure de la vitesse maximale atteinte (cm/s ; D), de la fréquence du pas (Hz ; F), de la longueur des foulées (cm ; F et G), des membres avant et arrière. **(H)** Box-plot de la quantification du nombre d'erreurs de placement des pattes lors du test de l'échelle (Nakamura et al., 2023).

Par ailleurs, une autre étude a révélé que l'inactivation chémogénétique des Nc-LCS par le CNO (Clozapine-N-Oxide) dans un modèle DREADDs, altère la locomotion sur tapis roulant. Bien que la coordination motrice soit préservée, les souris montrent des difficultés à maintenir le rythme, avec une diminution de la fréquence du pas **(Figure 35D et E)** et une augmentation de la longueur des foulées **(Figure 35F et G)**. Ces souris ont également montré des déficits dans le test de l'échelle **(Figure 35H)** (Nakamura et al., 2023), indiquant que les Nc-LCS contribuent au contrôle de la locomotion et à la motricité fine. Ces résultats suggèrent que chez la souris, les Nc-LCS jouent un rôle dans le contrôle moteur adaptatif, basé sur des mécanismes de rétrocontrôle sensoriel. La caractérisation du réseau neuronal impliqué et notamment la nature des retours sensoriels vers les Nc-LCS reste à être réalisée.

d) Le rôle des Nc-LCS comme acteurs de la niche spinale ?

Nous avons vu précédemment que la région autour du CC, appelée niche spinale, possède des propriétés de réparation et de régénération neuronale, notamment suite à des lésions spinales (Meletis et al., 2008). D'autre part, le LCS contient des molécules en relation avec ces processus et informe le SNC de l'état inflammatoire et post-lésionnel. De nombreuses études ont observé des niveaux élevés de cytokines, protéines produites par des cellules immunitaires, dans le LCS, suite à des traumatismes crâniens ou des lésions de la ME. Parmi

elles, on retrouve les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6), IL-1 ou TNF (Tumor Necrosis Factor) (Woodcock & Morganti-Kossmann, 2013). La protéine de structure S100β, utilisée comme biomarqueur pour juger la sévérité des lésions, est aussi retrouvée dans le LCS de patients lésés médullaires (Kwon et al., 2010). Après une lésion, le profil d'expression de chaque cytokine dans le LCS, peut fournir des informations sur l'étendue des lésions tissulaires, qui pourrait être détecté par les Nc-LCS, et pourraient ainsi être acteurs dans la niche spinale.

Partant de l'hypothèse que certaines cellules en contact avec le CC, pourraient être des neuroblastes similaires à ceux des niches neurogéniques, Marichal et collaborateurs ont combiné des études immunohistochimiques avec des enregistrements en patch-clamp, chez le rat. Leurs résultats montrent que les Nc-LCS présentent des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles proches de celles des neurones immatures des niches neurogéniques adultes. En effet, en plus d'exprimer des protéines impliquées dans la plasticité et la migration, telles que DCX, PSA-NCAM ou HuD/C, les Nc-LCS peuvent progressivement exprimer NeuN (Marichal et al., 2009 ; Petracca et al., 2016), et présenter plusieurs propriétés électrophysiologiques (réponses lentes dépendantes du Ca^{2+}, PA uniques ou décharges répétitives dépendantes des ions Na^{+}, différentes résistances membranaires). Ceci suggère différents stades de différenciation, similaires à ceux observés dans les neurones spinaux de l'embryon de Xénope (Spitzer & Ribera, 1998). Ainsi, le CC de la ME des mammifères contient des cellules avec des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles analogues à celles des neurones immatures des niches neurogéniques adultes. Ces résultats indiquent que les Nc-LCS immatures, pourraient être quiescents et, sous certaines conditions, devenir matures et s'intégrer au réseau spinal.

Chez les mammifères, une cicatrice gliale se forme à la suite d'une lésion de la ME (SCI). Bien que cette cicatrice limite l'étendue des dommages et empêche les lésions secondaires, elle peut également freiner la régénération neuronale et la récupération fonctionnelle. Récemment, une étude a mis en évidence l'implication des Nc-LCS et des cellules épendymaires dans ces processus post-lésionnels. Les auteurs montrent que les Nc-LCS spinaux expriment un récepteur aux opioïdes de type κ (*kappa*), OPRK1. Son ligand, la prodynorphine (PDYN), est exprimée par des cellules localisées dans les régions ventrales et dorsales du CC. Ces cellules, sont des cellules épendymaires, qui expriment également le facteur de transcription sox2 et la protéine des filaments intermédiaires Nestine (Yue et al., 2024), deux marqueurs caractéristiques des cellules souches et des progéniteurs (Furube et al., 2020). Après une SCI, l'administration d'un antagoniste des récepteurs OPRK1, perturbe la prolifération des cellules épendymaires, la formation de la cicatrice gliale et les fonctions motrices. Ces résultats suggèrent que la libération d'opioïdes κ, active les Nc-LCS *via* les récepteurs OPRK1, qui inhibent par la suite la prolifération des cellules épendymaires (Yue et al., 2024).

En conclusion, dans le CC de la ME, les propriétés de cellules souches sont principalement attribuées aux cellules épendymaires situées aux l'extrémités du CC ainsi qu'aux péricytes. Les Nc-LCS semblent jouer un rôle important dans les mécanismes cellulaires déclenchés par une lésion de la ME. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider leurs propriétés en conditions physiologique et pathologique.

e) Rôle des Nc-LCS dans l'immunité innée

Lors d'une infection bactérienne du SNC, les bactéries peuvent envahir le LCS **(Figure 36A)**. Une étude récente chez la larve de poisson-zèbre, a mis en lumière le rôle des Nc-LCS face à ces pathogènes, en permettant la mise en place d'une réponse immunitaire innée. Les

Nc-LCS, situés autour du CC et en contact direct avec le LCS, grâce à leurs protrusions, montrent une augmentation surprenante de leur activité, lors d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*. En effet, 12 heures après l'injection bactérienne dans le 4ème ventricule **(Figure 36A)**, on observe des transients calciques importants dans les Nc-LCS spinaux **(Figure 36B)** ainsi qu'une courbure de la larve **(Figure 36C)**. L'infection par *Streptococcus pneumoniae* libérant des toxines et/ou des métabolites, sont détectés par les Nc-LCS comme des composés amers, *via* des récepteurs du goût. Cette reconnaissance entraîne l'activation des Nc-LCS, qui libèrent alors dans le LCS des éléments clés de l'immunité innée, tels que des cytokines et des facteurs du complément. Cette réponse ne se limite pas à la défense contre les pathogènes, mais elle est également essentielle à la survie de l'hôte. En effet, si la transmission synaptique des Nc-LCS est inhibée par la toxine botulique, le taux de survie des animaux infectés est réduit de moitié. Ainsi, les Nc-LCS jouent un rôle crucial dans la lutte contre les pathogènes en sécrétant des substances neuroactives et en participant activement à l'immunité innée (Prendergast et al., 2023).

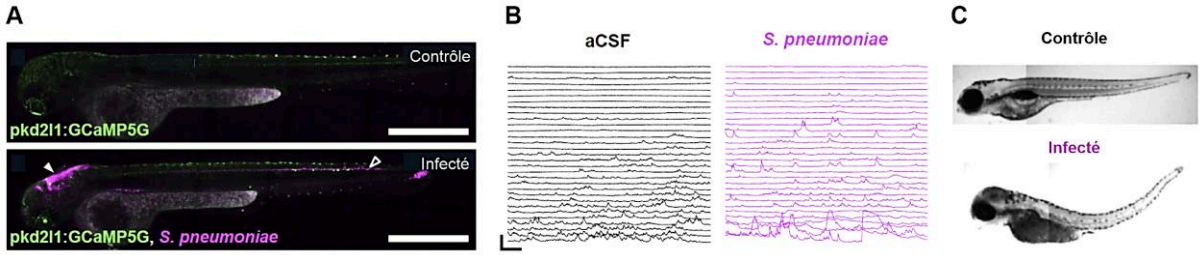


Figure 36| **Les Nc-LCS répondent à l'infection par *streptococcus pneumoniae* et participent à la survie de l'hôte**

(A1) Images de deux larves de poisson-zèbre Tg(pkd2l1:GCaMP5G) en condition contrôle et après l'infection par *streptococcus pneumoniae* (en magenta, injection dans le ventricule du rhombencéphale, échelle : 500 µm). **(B)** Activité calcique des Nc-LCS chez deux larves de poisson-zèbre, 21 heures après l'injection d'aCSF (en noir, gauche) ou de *streptococcus pneumoniae* (en magenta, droite ; échelle : 200% ΔF/F, 25 s). **(C)** Images en lumière transmise de larves de poisson-zèbre, injectée avec du PBS (contrôle, en haut) et avec *streptococcus pneumoniae* (en bas) (Prendergast et al., 2023).

De nombreux éléments suggèrent que les Nc-LCS bulbo-spinaux, présents chez divers vertébrés, forment un système multisensoriel capable de détecter les variations de pH, d'osmolarité et les stimuli mécaniques, qui modulent leur activité. Leur position stratégique à l'interface entre le LCS et le parenchyme en fait des candidats idéaux pour la détection des changements de composition et de flux du LCS. Les Nc-LCS pourraient alors influencer différents composants spinaux en conditions physiologiques et pathologiques. Bien que, chez le poisson-zèbre, les Nc-LCS aient été directement impliqués dans la locomotion, le contrôle postural, l'organogenèse de l'axe corporel et de la courbure de la ME, les recherches sur leurs fonctions chez les mammifères doivent être approfondies.

C- Locomotion et posture

1- La locomotion : le comportement moteur à la base du mouvement

Chez les animaux, il existe des comportements moteurs dits rythmiques, comme la respiration, la mastication ou la marche, ainsi que des comportements moteurs épisodiques, tel que le grattage, la déglutition ou la toux. Les mouvements rythmiques sont contrôlés par des générateurs central de patron (CPGs : Central Pattern Generators), composés de réseaux neuronaux, qui vont déterminer le rythme de décharge des motoneurones et la séquence appropriée de contraction musculaire (Cazalets et al., 1992 ; Prinz, 2006). Les CPGs peuvent fonctionner indépendamment des informations supraspinales et sensorielles, bien que ces dernières soient cruciales pour ajuster les mouvements, en réponse à des changements environnementaux et pour initier ou mettre fin aux actions motrices (Grillner & Manira, 2015).

a) La locomotion : définition fonctionnelle

La locomotion, dérivée du latin *motio* signifiant mouvement, est la fonction motrice qui permet aux êtres vivants de se déplacer d'un lieu à un autre. Elle est essentielle à la survie des mammifères car elle répond à des besoins vitaux tels que, la recherche d'un habitat, de nourriture, de partenaires ou le comportement de fuite face aux prédateurs.

La locomotion varie selon l'espèce animale considérée et son mode de déplacement se manifeste sous forme de nage chez les poissons, de vol chez les oiseaux et les insectes, et de différentes formes de déplacements terrestres chez les animaux à membres, comme la marche, la propulsion, le rampement, la brachiation et le saut. Toutefois, l'objectif reste le même : se déplacer efficacement vers les ressources et s'éloigner des dangers. La locomotion résulte de l'intégration de nombreuses activités cérébrales et spinales, permettant de coordonner les mouvements du corps pour se déplacer et ajuster l'allure en fonction de l'environnement et des conditions donnés. Cette activité dépend d'une composante motrice qui va permettre la contraction musculaire, mais également de retours sensoriels qui vérifient la bonne exécution du mouvement et son adaptation en fonction de l'environnement.

b) La locomotion : définition mécanistique

La locomotion est un comportement moteur complexe, impliquant l'activation coordonnée de nombreux muscles des membres et du tronc. Chez les animaux quadrupèdes, elle repose sur l'activation rythmique et alternée des muscles fléchisseurs et extenseurs des membres gauches et droits, entraînant un mouvement coordonné des différentes parties du corps **(Figure 37A)**. Le cycle locomoteur du pas, comprend une phase d'appui et une phase de transfert pour chaque membre. La phase d'appui, correspond au moment où le membre est en contact avec le sol, tandis que la phase de transfert, apparait lorsque le membre est fléchi dans les airs. La répétition alternée et rythmique de ce cycle, entre les membres avant et arrière, est appelé le patron locomoteur **(Figure 37B)**.

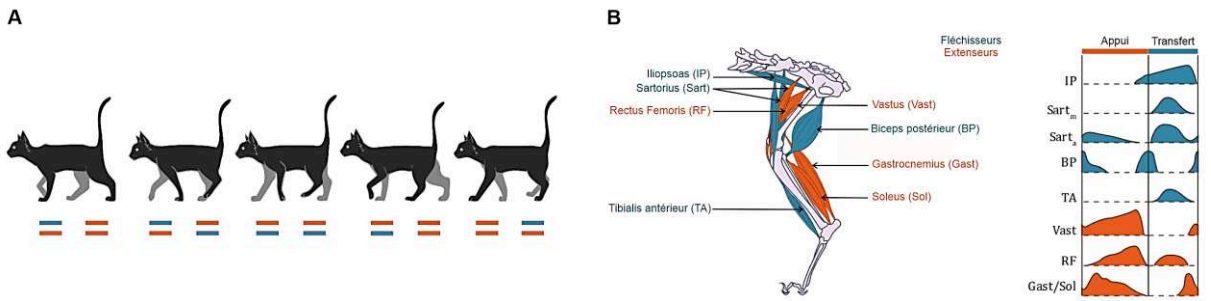


Figure 37| **Le cycle locomoteur de la patte arrière**

(A) Le cycle locomoteur comprend la contraction coordonnée de différents muscles fléchisseurs et extenseurs, qui va permettre à un moment précis et avec une tension musculaire donnée, le mouvement des pattes. Le cycle d'un pas est composé d'une phase d'appui (en rouge), lorsque la patte est en contact avec le sol, et d'une phase de transfert (en bleu), lorsque celle-ci est en mouvement, sans entrer en contact avec le sol. **(B)** Schéma représentant les muscles fléchisseurs (en bleu) et extenseurs (en rouge) de la patte arrière avec leurs contactions correspondantes durant le cycle d'un pas. Pendant la phase d'appui, lorsque le pied est en contact avec le sol, la cheville et la hanche sont en extension, tandis que le genou est en flexion. Pendant la phase de transfert, toute la patte est fléchie et la flexion du genou permet le mouvement de balancier du membre vers l'avant (Drouillas, 2022).

c) Mise en place de la locomotion

A la naissance, le nouveau-né dispose d'un répertoire moteur limité, et exécute ce qu'on appelle la marche réflexe dans les airs, où les mouvements de « marche » se résument à une alternance entre les muscles fléchisseurs et extenseurs. Le cycle locomoteur, composé d'une phase d'appui, et d'une phase de transfert, n'est pas encore mis en place. C'est au cours de la période postnatale (entre quelques semaines à années en fonction de l'espèce) que le système moteur se développe progressivement, permettant à l'individu de se lever, de maintenir son équilibre et enfin de marcher (Grillner & El Manira, 2020). Ce délai s'explique par la maturation tardive des mécanismes neuronaux à l'origine du contrôle postural. La stabilisation du corps/de l'abdomen par le tonus musculaire et son contrôle, sont nécessaires avant de pouvoir se déplacer. En étudiant le comportement de nage chez le rat nouveau-né, où les contraintes de posture et de gravité ne sont pas aussi importantes que pour la locomotion terrestre, il a été montré que le CPG locomoteur est déjà en place à la naissance. En effet, des enregistrements électromyographiques (EMG) des muscles des membres avant et arrière, ont révélé une activité rythmique alternée entre les muscles fléchisseurs et extenseurs, ainsi qu'une alternance de l'activité des membres gauches et droits (Cazalets et al., 1990). Ainsi, bien qu'une maturation soit nécessaire, il semblerait que le développement des mécanismes neuronaux à l'origine du contrôle postural, soit l'une des conditions préalables aux comportements locomoteurs.

Les mammifères, possèdent un patron locomoteur similaire (Catavitello et al., 2018). Cependant, certains d'entre eux, peuvent coordonner leurs mouvements et maintenir leur équilibre dès la naissance. Une étude suggère que les espèces ayant un cerveau plus volumineux, pourraient nécessiter une plus longue maturation du système nerveux, de la conception jusqu'à la mise en place de la locomotion (Garwicz et al., 2009).

Afin de faire face au phénomène de gravité et aux changements d'équilibre, les animaux terrestres quadrupèdes et bipèdes ont développé des mécanismes permettant le contrôle postural, par un ajustement du tonus musculaire du tronc et des membres. Le maintien de la posture intervient également pendant l'exécution de divers mouvements, jusqu'à leur fin.

Pour se déplacer, tous les animaux ont besoin d'une coordination du système musculosquelettique, responsable de la production du mouvement et du système nerveux, qui en contrôle la contraction. La locomotion est régulée par divers systèmes neuronaux situés dans le cerveau et dans la ME.

2- De la volonté au mouvement : Implication des structures supraspinales

La locomotion est un comportement orienté vers un but, qui est initié par des signaux provenant soit du cortex pour un traitement volontaire, soit du système limbique pour un traitement émotionnel. Par ailleurs, la locomotion nécessite également des processus automatiques pour contrôler les mouvements tels que, l'ajustement du tonus musculaire postural et le mouvement rythmique des membres (Takakusaki, 2013).

a) Contrôle de la posture

Le tronc cérébral formé du mésencéphale, du pont et de la *médulla* contient plusieurs régions impliquées dans le contrôle de la locomotion et le maintien de la posture. Au niveau du tegmentum mésopontique, se trouve la région locomotrice mésencéphalique (MLR), qui contient les noyaux cunéiforme (CNf) et pédonculo-pontin (PPN), impliqués dans le contrôle de la posture et de la marche (Caggiano et al., 2018). En ce qui concerne la posture, des études ont montré que la stimulation électrique des neurones cholinergiques du PPN ventrolatéral chez le chat décérébré, supprime le tonus musculaire postural, enregistré par l'EMG du muscle *soléaire*. Par contre, la stimulation de la partie dorsale du CNf, induit une augmentation du tonus musculaire. Les auteurs montrent par ailleurs, que le tonus musculaire est aussi augmenté lorsque les noyaux monoaminergiques du *locus coeruleus* (LC, noradrénaline) et du raphé (RN, sérotonine, 5-HT) sont stimulés (Takakusaki et al., 2016). Enfin, des expériences chez le chat intact ou décérébré, ont montré que la formation réticulée médullaire (MRF) semble également jouer un rôle dans le contrôle de la posture. Lorsque la partie dorsale de la MRF (MRF-d) est stimulée, le tonus postural diminue et l'animal se couche, tandis que lorsque la partie ventrale (MRF-v) est stimulée, le tonus musculaire augmente et l'animal passe d'une position couchée à une position debout et commence à marcher (Mori et al., 1989 ; Takakusaki et al., 2016). La lésion unilatérale du noyau réticulaire latéral (*médulla* ventrale) chez le chat, provoque une asymétrie posturale avec une hypertonie ipsilatérale et une hypotonie controlatérale des muscles extenseurs des membres (Corvaja et al., 1977). Ainsi, le tonus musculaire postural est régulé par l'interaction entre un système inhibiteur, composé notamment de la région ventrale du PPN (neurones cholinergiques) et de la région dorsale de la MRF (MRF-d), et un système excitateur, qui comprend la région dorsale du CNf, le *locus coeruleus* (LC), les noyaux du raphé (RN) et la région ventrale de la MRF (MRF-v) **(Figure 38)**. D'autres structures cérébrales tel que le *Globus pallidus* et le cervelet ont aussi été impliqués dans les processus de contrôle postural.

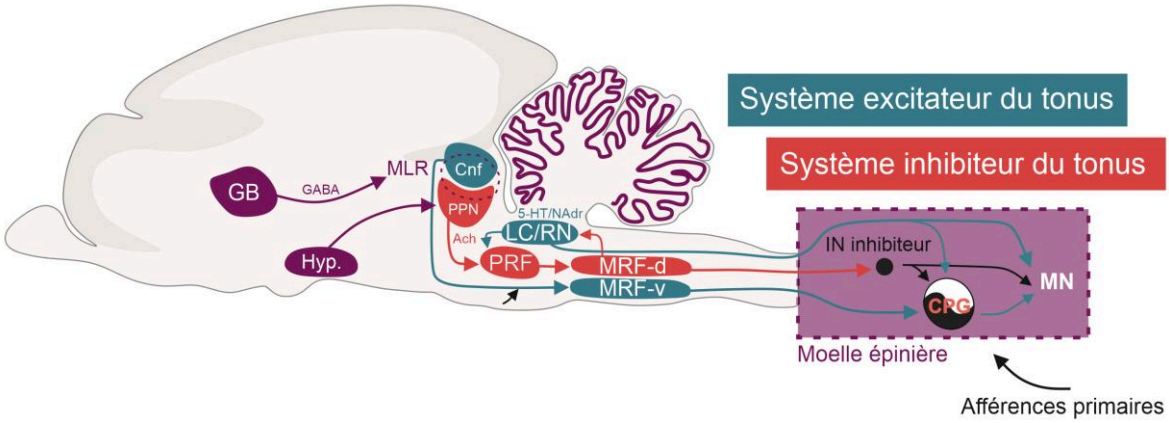


Figure 38 | Mécanismes contrôlant le tonus postural

Les signaux provenant de la MLR contrôlent le tonus postural : la région dorsale du CNf, le LC, les RN et la MRF-v sont responsables de l'augmentation du tonus musculaire postural. Les neurones cholinergiques de la partie ventrale du PPN, projetant sur la formation réticulée pontique (PRF) et enfin les neurones réticulospinaux de la MRF-d, vont induire une hypotonie, via des interneurones inhibiteurs localisés dans la *lamina* VII de la ME. Les signaux des ganglions de la base (GB) vont agir sur les systèmes excitateur et inhibiteur, alors que le système limbique va uniquement agir sur le système inhibiteur du tonus musculaire postural via le PPN (Hyp. : hypothalamus) (Adapté de Takakusaki, 2013).

Il a été suggéré que les mécanismes neuronaux de la posture et de la locomotion ont, en partie, des structures neuronales communes au niveau du tronc cérébral, du cervelet et de la ME, afin de générer des mouvements locomoteurs appropriés (Mori et al., 1989). Par exemple, nous allons voir par la suite que les signaux provenant de la MLR activent le système excitateur du tonus postural, ainsi que le système à l'origine du rythme locomoteur, composé de la MRF et du CPG dans la ME.

b) Contrôle de la locomotion

Les structures neuronales impliquées dans le contrôle supraspinal de la locomotion, sont notamment localisées dans les ganglions de la base, responsables de la sélection des comportements moteurs, ainsi que dans la région locomotrice mésencéphalique (MLR), et la formation réticulée médullaire (MRF), qui initient le mouvement (Arber & Costa, 2022 ; Goulding, 2009).

Sélection du comportement locomoteur : Rôle majeur des ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB) jouent un rôle clé en interprétant les informations sensorielles et en sélectionnant un comportement moteur adapté (Grillner & Robertson, 2015). Un déficit en dopamine, par exemple, peut entraîner des dysfonctionnements des GB, qui se manifestent par des déficits moteurs importants comme une hypokinésie, observée notamment chez des patients parkinsoniens, chez lesquels, l'initiation et l'exécution des mouvements complexes, sont altérées (Sian et al., 1999). Il a été montré que les neurones de projection du striatum (SPN), peuvent initier ou stopper la locomotion selon qu'ils expriment le récepteur D1 ou D2 de la dopamine, respectivement (Kravitz et al., 2010). Les neurones GABAergiques des noyaux de sortie des GB (SNr et GPi), ont une activité tonique au repos, et assurent notamment l'inhibition continue de la région locomotrice mésencéphalique (MLR). Ce n'est que lorsque l'inhibition tonique est levée par le striatum que les neurones de la MLR peuvent initier la locomotion (Grillner et al., 2005 ; Grillner & El Manira, 2020) **(Figure 39)**.

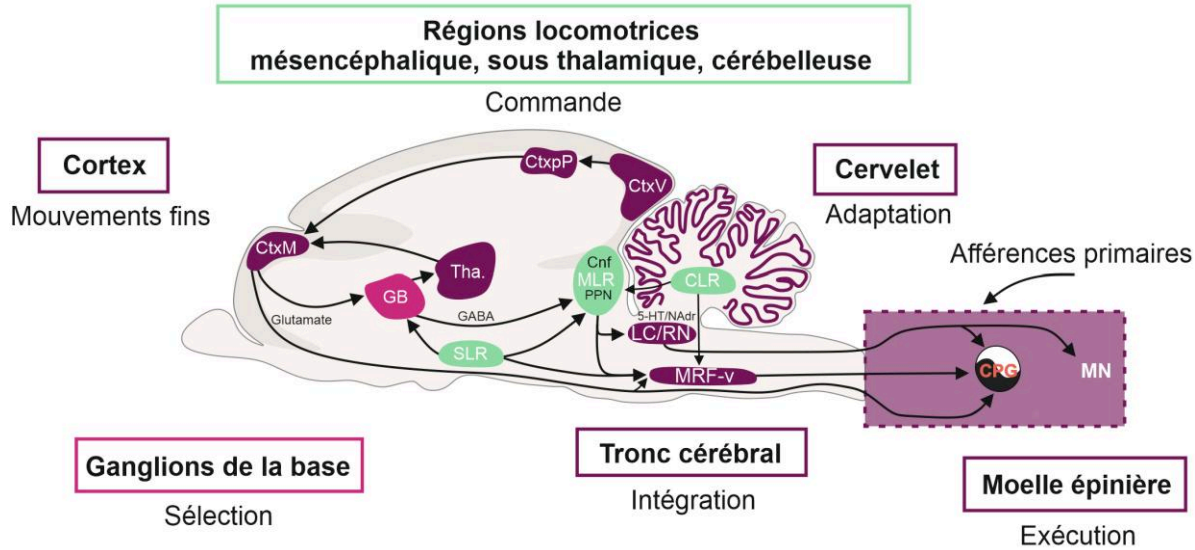


Figure 39 | Mécanismes contrôlant la locomotion *via* les ganglions de la base et la MLR

Les ganglions de la base (GB) sélectionnent le comportement moteur en exerçant via la SNr et le GPi une inhibition tonique de l'activité de la MLR. Lorsque l'inhibition GABAergique est levée, la locomotion peut être initiée par la MLR. Les neurones glutamatergiques du CNf, contrôlent l'alternance des membres pendant la marche et le trot et leur synchronie au galop. Le PPN, régule uniquement la marche à allure modérée. Ainsi, le système excitateur constitué de la MLR, du LC/RN et de la voie excitatrice réticulospinale émergeant de la MRF-v, vont initier le rythme locomoteur, en projetant sur le CPG et les MN dans la ME (CtxM : cortex moteur, CtxpP : cortex pariétal postérieur, CtxV : cortex visuel, Tha. : Thalamus, MN : motoneurones) (Adapté de Takakusaki, 2013, 2015 et Kiehn, 2016).

Initiation de la locomotion : La région locomotrice mésencéphalique (MLR)

Dans les années 1960, une équipe russe a découvert que la stimulation électrique continue, d'une zone spécifique du mésencéphale, pouvait déclencher la locomotion chez un chat décérébré (i.e. présentant une section transversale au-dessus des colliculi supérieurs) (Shik & Orlovsky, 1976). Cette région, appelée région locomotrice mésencéphalique (MLR), est présente chez tous les vertébrés entre le mésencéphale et le pont, et comprend les noyaux du CNf et la partie dorsale du PPN. Des recherches récentes ont montré que la stimulation de la MLR chez une souris à l'arrêt, peut initier la marche. En augmentant la fréquence de stimulation, la vitesse de déplacement augmente, passant de la marche au trot, puis au galop. Par des manipulations optogénétiques, Caggiano et collaborateurs ont montré *in vivo*, que ces deux noyaux fonctionnent en synergie pour initier un comportement locomoteur adapté au contexte. Le CNf, composé de neurones glutamatergiques, contrôle la locomotion à faible vitesse, avec l'alternance des membres, et à des vitesses plus élevées, avec leur activation synchrone. Le PPN, composé de neurones glutamatergiques et cholinergiques, régule uniquement la marche à allure modérée. Ainsi, l'initiation de la locomotion semblerait dépendre de l'activité des neurones du CNf pour le comportement de fuite et du PPN pour les comportements d'exploration (Caggiano et al., 2018). La MLR est spécifiquement ciblée par les neurones GABAergiques de la substance noire réticulée des GB (Roseberry et al., 2016), bien qu'elle reçoive également des entrées synaptiques des autres régions locomotrices (SLR : sous-thalamique et CLR : cérébelleuse) (Takakusaki, 2008).

Chez plusieurs vertébrés, y compris les mammifères et les poisson-zèbres, la MLR active les voies monoaminergiques descendantes, du *locus coeruleus* (LC : NAdre) et des noyaux du raphé (RN : 5-HT), ainsi que les neurones réticulospinaux localisés dans la région ventrale de la formation réticulée médullaire (v-MRF), qui vont activer des interneurones dans le réseau locomoteur spinal pour initier le mouvement (Dubuc et al., 2008 ; Noga et al., 2017) **(Figure 39)**.

3- De la volonté au mouvement : Implication de la moelle épinière

La planification et l'initiation de la locomotion ont lieu dans des régions supraspinales. Une fois initiée, la locomotion repose sur l'activité de réseaux neuronaux de la ME, les CPGs locomoteurs, qui orchestrent de manière autonome la séquence et le rythme précis des mouvements.

a) Les motoneurones spinaux

Les motoneurones sont des cellules nerveuses essentielles, qui permettent la contraction des fibres musculaires et constituent ainsi le dernier relais du circuit moteur. Ils jouent un rôle crucial en transmettant les commandes motrices, provenant du système nerveux central et périphérique, vers les muscles effecteurs. Chez les mammifères, les motoneurones sont remarquables par leur taille : leurs axones peuvent atteindre plusieurs mètres de long. Chez la souris, l'arborisation dendritique de ces cellules peut s'étendre sur près d'1 millimètre de diamètre, leur permettant d'intégrer un large éventail d'informations. Un seul motoneurone peut contrôler plusieurs fibres musculaires au sein d'un muscle, formant ainsi une unité motrice, composée d'un motoneurone et de toutes les fibres musculaires qu'il innerve. Les motoneurones présentent une grande diversité et sont organisés en trois groupes, selon les cibles qu'ils innervent. Les motoneurones brachiaux, localisés dans le tronc cérébral, projettent vers les muscles de la face et du cou. Les motoneurones viscéraux, appartiennent au système nerveux autonome, contrôlent les muscles lisses des viscères (tels que le cœur et les artères) et des glandes. Enfin, les

motoneurones somatiques qui innervent les muscles squelettiques, feront l'objet d'une description plus détaillée dans la suite de la thèse (Stifani, 2014).

Muscles squelettiques et fibres musculaires

Les muscles squelettiques, accrochés au squelette par les tendons, sont responsables de la posture et des mouvements des membres. Ils sont composés de deux structures : les fibres extrafusales et les fuseaux neuromusculaires. Les fibres extrafusales, qui génèrent la force, sont divisées en trois types : les fibres à contraction lente et résistantes à la fatigue (slow-twitch fatigue-resistant SFR ou type I), ont une contraction de faible intensité, pouvant durer dans le temps, les fibres à contraction rapide et résistantes à la fatigue (FFR ou type IIA), et enfin les fibres à contraction rapide mais fatigables (FF ou type IIB), fournissent une force de contraction intense mais se fatiguent rapidement. Les fuseaux neuromusculaires, sont eux composés de fibres intrafusales (fibres du sac nucléaire et fibres de la chaîne nucléaire) et informent sur la position et sur le niveau d'étirement des muscles. (Manuel & Zytnicki, 2019 ; Stifani, 2014) (cf **Figure 61A** Section IC 4A).

Les motoneurones somatiques : alpha et gamma

Les motoneurones somatiques dérivent du domaine de progéniteurs pMN et expriment transitoirement le facteur de transcription Hb9. Ils sont cholinergiques, se trouvent dans la région ventrale du tronc cérébral et de la ME dans la *lamina* IX, et innervent les muscles squelettiques. Les motoneurones reçoivent des entrées synaptiques provenant des neurones moteurs du cortex, des neurones sensoriels, des interneurones (V0c, V1 Ia et cellules de Renshaw, V2, non-V2a Shox2^{+} et V3 Sim1^{+}), et ils peuvent également former des connexions réciproques *via* leurs collatérales (Bhumbra & Beato, 2018). Les motoneurones se regroupent selon les types de fibres musculaires qu'ils innervent. Il y a les motoneurones *alpha*, *gamma* et *bêta,* seuls les deux premiers seront décrits dans ce manuscrit (Stifani, 2014 ; Lu et al., 2015 ; Manuel & Zytnicki, 2019).

Motoneurones alpha

Les motoneurones *alpha*, innervent exclusivement les fibres musculaires extrafusales, sont responsables de la contraction musculaire et jouent un rôle crucial dans les réflexes spinaux, en recevant des connexions monosynaptiques des neurones sensoriels (Eccles et al., 1960). Ils se divisent en trois sous-types selon les fibres extrafusales qu'ils innervent : les motoneurones *alpha* SFR, FF, et FFR. Les motoneurones *alpha* SFR, recrutés en premier, ont une décharge immédiate régulière de faible fréquence. Ils ont un petit corps cellulaire, une grande résistance d'entrée, une vitesse de conduction lente (85 m/s) et peuvent maintenir leur activité sur de longues durées. Les motoneurones FF sont recrutés en dernier et déchargent de façon retardée à haute fréquence, majoritairement en bouffées de PA (Leroy et al., 2014 ; Manuel & Zytnicki, 2019). Ils ont un corps cellulaire plus grand, une vitesse de conduction rapide (100 m/s) et apportent une force de contraction rapide supplémentaire au muscle activé. Les motoneurones SFR sont impliqués dans le maintien de la posture tandis que les FF dans les mouvements de forte intensité. Les motoneurones FFR, quant à eux, possèdent des caractéristiques intermédiaires (Burke et al., 1973 ; Stifani, 2014) (cf **Figure 61A** Section IC 4A).

Motoneurones gamma

Les motoneurones *gamma* sont subdivisés en motoneurones *gamma* dynamiques et *gamma* statiques, et contrôlent exclusivement la sensibilité des fuseaux musculaires. La décharge des motoneurones *gamma* augmente la tension des fibres musculaires intrafusales, mimant l'étirement du muscle. Les axones *gamma* dynamiques innervent une fibre du sac nucléaire et augmentent la sensibilité de la terminaison primaire à la vitesse d'étirement. Les

axones *gamma* statiques innervent à la fois les fibres de la chaîne nucléaire et l'autre fibre du sac nucléaire, et augmentent la sensibilité à l'étirement des terminaisons primaires et secondaires. Comme, ils reçoivent uniquement des entrées sensorielles indirectes et qu'ils ne possèdent aucune fonction motrice, les motoneurones *gamma* ne participent pas directement aux réflexes spinaux, mais influencent la modulation de la contraction musculaire (Manuel & Zytnicki, 2011 ; Stifani, 2014) (cf **Figure 61A** Section IC 4A).

Organisation des motoneurones somatiques en colonnes motrices

Les motoneurones somatiques sont organisés en colonnes le long de l'axe rostro-caudal de la ME : la colonne médiane motrice (MMC) et la colonne latérale motrice (LMC). La MMC est localisée dans la région médiane de la ME ventrale le long de l'axe rostro-caudal. Les motoneurones qui la composent expriment les facteurs de transcription Mnx1, Isl1/2 et Lhx3 (Tsuchida et al., 1994) et innervent les muscles axiaux (dos), principalement impliqués dans le maintien de la posture. La LMC est localisée dans la région latérale de la ME ventrale au niveau brachial (C5-T1) et lombaire (L1-L5). Au niveau lombaire, les motoneurones de la LMC innervent les muscles de membres postérieurs. On distingue, les motoneurones médians LMC_m qui expriment Hb9 faiblement, Isl1/2 et Foxp1, ciblent la partie ventrale des muscles des membres. Les motoneurones latéraux LMC_l expriment Hb9, Lim1, Isl2 (Isl1 faible) et Foxp1 et innervent la partie dorsale des muscles (Lu et al., 2015). Les motoneurones reçoivent des informations provenant des régions supraspinales, des interneurones du CPG locomoteur et des neurones sensoriels. Les mouvements complexes tels que la marche nécessitent la coopération de plusieurs douzaines de muscles. Les boucles de rétrocontrôle sensori-motrices sont donc essentielles pour ajuster les mouvements en temps réel (Deska-Gauthier & Zhang, 2019).

b) La découverte du Générateur Central de Patron (CPG) locomoteur

Au début du XXe siècle, le neurophysiologiste écossais Thomas Graham Brown a démontré pour la première fois, la capacité des muscles fléchisseurs et extenseurs des membres postérieurs, à effectuer des mouvements rythmiques chez un chat décérébré (section au niveau T12) (Stuart & Hultborn, 2008). Cette découverte a révélé l'existence, dans la ME, d'un réseau de neurones capable de générer des mouvements rythmiques, en l'absence d'entrées sensorielles.

Dès la fin du XXème siècle, la stimulation électrique de la MLR ou l'application d'un cocktail pharmacologique, a permis de déclencher *ex vivo*, des mouvements apparentés à une activité dite de « locomotion fictive ». Sur des préparations de ME isolées de souris nouveau-nées, l'application d'agonistes NMDA, mime les afférences glutamatergiques descendantes de la MRF-v et active le CPG locomoteur, alors que la 5-HT mime les entrées sérotoninergiques issues des noyaux du raphé, et stabilise le rythme (Cazalets et al., 1992). Le patron observé est caractérisé par une activité rythmique alternée entre les racines ventrales gauches et droites, ainsi qu'une alternance de l'activité au niveau des racines ventrales ipsilatérales liées, aux motoneurones fléchisseurs (L2) et extenseurs (L5) (Vinay et al., 2002). Le SNC, ainsi isolé, est maintenu en vie dans du LCS artificiel oxygéné et les sorties motrices sont enregistrées au niveau des racines ventrales (formées par les axones des motoneurones spinaux) à l'aide d'électrodes de succions. L'activité fictive enregistrée est ainsi induite en l'absence d'afférences sensorielles et supraspinales **(Figure 40)**.

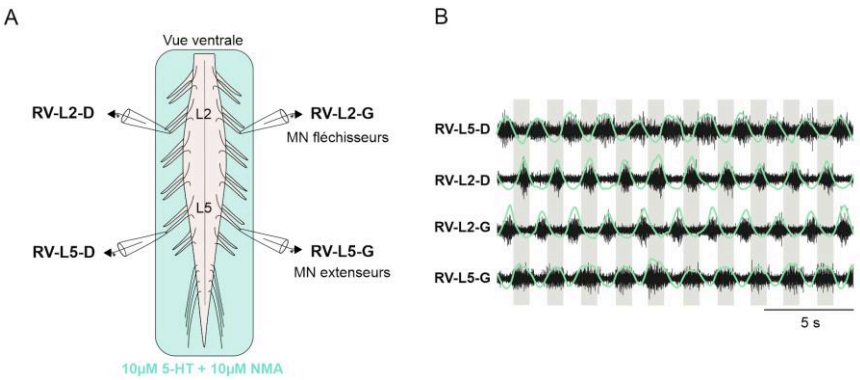


Figure 40| **Préparation *ex vivo* de moelle épinière isolée de rongeur et enregistrement d'une activité de « locomotion fictive »**

(A) Schéma expérimental de la préparation, avec les enregistrements extracellulaires des racines ventrales (RV) L2 (fléchisseur-dominant) et L5 (extenseur-dominant) gauches et droites, par des électrodes de succion, au niveau du segment lombaire. **(B)** Enregistrements simultanés des MN fléchisseurs (L2) et extenseurs (L5) des RV droites et gauches, pendant une activité de locomotion fictive, induite pharmacologiquement par l'application de NMA à 10 µM et de 5-HT à 10 µM. Une alternance entre les RV droites et gauches ainsi qu'une alternance entre les RV L2 et L5 ipsilatérales sont visibles.

Notion de demi-centres

Chez le chat, Graham Brown et Lundberg ont introduit le concept de demi-centres interconnectés pour expliquer l'organisation du CPG spinal, qui est à l'origine de l'activité rythmique et alternée des motoneurones fléchisseurs et extenseurs durant la locomotion. Selon l'hypothèse des demi-centres, cette activité résulte de l'inhibition réciproque entre deux groupes d'interneurones excitateurs glutamatergiques, situés de part et d'autre de la moelle épinière : un demi-centre extenseur et un demi-centre fléchisseur, activant respectivement les motoneurones extenseurs et fléchisseurs. Selon cette vision, chaque membre est contrôlé par un CPG et l'inhibition réciproque implique qu'un seul hémi-centre puisse être activé à la fois. Cependant certains groupes de motoneurones, actifs pendant les phases de flexion et d'extension du cycle locomoteur, ne sont pas pris en compte dans ce modèle (McCrea & Rybak, 2008).

Concepts de l'émergence du rythme locomoteur

La génération du rythme est une propriété fondamentale des réseaux neuronaux qui coordonnent des mouvements répétitifs comme la respiration, la mastication et la locomotion. Deux modèles ont été proposées afin d'expliquer la source du rythme : le modèle des neurones pacemaker et le modèle de réseau émergeant (Kiehn, 2016). Le modèle des neurones pacemaker, repose sur des mécanismes non synaptiques et suggère l'existence de propriétés intrinsèques particulières, qui permettent l'oscillation du potentiel membranaire de certains interneurones. Neurones qui vont synchroniser l'activité d'interneurones non-pacemaker. Ces propriétés membranaires de décharge, sont activées par les courants sodiques persistants (INaP) et par des courants calciques dépendants des récepteurs NMDA. Dans le modèle émergeant, le rythme né de l'interaction synaptique entre plusieurs interneurones excitateurs glutamatergiques, qui synchronisent leur activité (Brocard et al., 2010).

c) Le CPG de la nage

Les nombreuses études menées chez la lamproie, le têtard et le poisson zèbre ont permis de détailler la structure du CPG de la nage. Comparées aux vertébrés quadrupèdes, ces espèces non membrées, ont l'avantage d'avoir un nombre limité de neurones et un comportement locomoteur simplifié. Bien que les mouvements de nage des vertébrés aquatiques diffèrent de ceux des vertébrés terrestres, l'organisation générale du système locomoteur est conservée, permettant la translation des connaissances des vertébrés inférieurs, vers les vertébrés supérieurs (Grillner, 2003; Kiehn, 2006).

La lamproie

Chez la lamproie, la nage consiste en une série de contractions musculaires à gauche et à droite, générées par des CPGs présents dans les 100 segments le long de l'axe rostro-caudal de la ME. Chaque CPG est capable de générer un patron moteur rythmique à l'origine d'une nage lente ondulatoire (Grillner & El Manira, 2020 ; Kiehn & Dougherty, 2013).

Des études sur le CPG ont montré qu'il est possible d'enregistrer une activité motrice rythmique sur une préparation d'hémi-moelle (section le long de la ligne médiane). En effet, l'application de NMDA (mimant la commande supraspinale issue de la MRF-v), génère des décharges rythmiques rapides et coordonnées entre les racines ventrales ipsilatérales. Sur cette même préparation, l'inhibition de la transmission synaptique glycinergique, augmente la fréquence de décharge sans affecter l'activité rythmique. Ces résultats suggèrent que l'inhibition glycinergique ipsilatérale n'est pas essentielle à la génération du rythme. L'excitation récurrente des interneurones glutamatergiques locaux est quant à elle suffisante. Ainsi, le générateur de rythme de la lamproie est constitué de neurones excitateurs glutamatergiques ipsilatéraux locaux (Cangiano & Grillner, 2003).

L'activité locomotrice est initiée par les neurones réticulospinaux du tronc cérébral, qui projettent de manière ipsilatérale sur des interneurones glutamatergiques spinaux. L'activation de ces interneurones via les récepteurs NMDA et AMPA entraine une entrée massive de calcium, qui active ensuite des canaux potassiques calcium-dépendants (IK_{Ca}), entraînant l'hyperpolarisation et l'arrêt de la décharge des neurones. Lors d'une activité neuronale soutenue, les niveaux de sodium augmentent également, activant des canaux potassiques sodium-dépendants (INaP), qui participent aussi à l'hyperpolarisation. Ainsi, c'est l'interaction entre l'excitation et les propriétés membranaires intrinsèques des neurones glutamatergiques, qui génère le rythme (Grillner & El Manira, 2020).

L'importance de l'inhibition réciproque dans la coordination de l'alternance gauche-droite a été montré par le blocage pharmacologique des récepteurs glycinergiques, qui a transformé l'alternance des racines ventrales, des deux côtés de la ME, en décharges rythmiques synchrones (Grillner & Wallén, 1980 ; Cohen & Harris-Warrick, 1984).

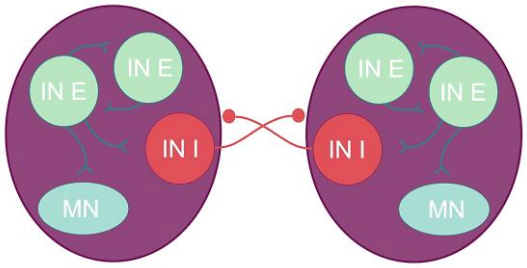


Figure 41 | Représentation schématique du CPG chez la lamproie

Chaque hémi-centre contient un CPG composé d'interneurones excitateurs (IN E) glutamatergiques qui sont responsables du rythme, via leurs connexions récurrentes. Ils projettent ipsilatéralement sur des motoneurones (MN) et sur des interneurones inhibiteurs (IN I) glycinergiques commissuraux, qui inhibent les composants neuronaux de l'autre hémi-centre. Ainsi, tant que les neurones commissuraux d'un hémi-segment sont actifs, l'autre côté est inhibé, permettant l'alternance gauche-droite des contractions musculaires (Adapté de Kiehn & Dougherty, 2013).

Ces études montrent que le CPG locomoteur des vertébrés inférieurs est composé d'hémi-centres, qui s'inhibent mutuellement. Ils sont localisés dans chaque hémi-moelle, le long de la ME et repose sur l'activation réciproque d'interneurones excitateurs glutamatergiques locaux à projection ipsilatérale. Ces neurones sont responsables à la fois de la genèse du rythme et de l'activation des motoneurones, tandis que les interneurones commissuraux inhibiteurs assurent l'alternance gauche-droite, responsable du mouvement ondulatoire de la lamproie **(Figure 41)**. Ces résultats suggèrent que l'excitation et l'inhibition

sont séparées dans le temps. Toutefois, des données plus récentes semblent mettre en évidence la coexistence d'une activité synaptique inhibitrice et excitatrice équilibrée, plutôt que temporellement séparée (Berg et al., 2007).

Le Poisson-Zèbre

La locomotion chez les poissons implique des ondulations latérales du corps induites par la contraction précise et alternée des segments le long de l'axe rostro-caudal. Les techniques de modification génétique chez le poisson-zèbre, ont permis d'identifier les composants majeurs du circuit locomoteur de la nage : les interneurones excitateurs V2a, sont responsables de la genèse du rythme et les interneurones excitateurs V0v et inhibiteurs V0d contrôlent la coordination gauche-droite. Par ailleurs, comme nous l'avons précédemment abordé (Introduction, Section IB 9c), les Nc-LCS sont également impliqués dans la genèse du rythme, puisqu'ils sont suffisants pour activer le CPG locomoteur et jouent un rôle clé dans les comportements de nage lente et d'échappement (Wyart et al., 2009; Fidelin et al., 2015; Böhm et al., 2016; Hubbard et al., 2016).

Interneurones V2a

Chez le poisson-zèbre, le rythme locomoteur est généré par les interneurones glutamatergiques V2a (CiDs : circumferential descending cells), caractérisés par l'expression du facteur de transcription Chx10. Sur une préparation *in vivo*, l'activation optogénétique de ces interneurones prémoteurs ipsilatéraux, déclenche une nage lente, caractérisée par une activité alternée entre les côtés gauche et droit qui se propage le long de l'axe rostro-caudal (Ljunggren et al., 2014). De plus, l'élimination aiguë et sélective des interneurones V2a par un laser bi-photonique augmente le seuil d'induction de l'activité de nage, diminue la fréquence des décharges et altère la coordination intersegmentaire nécessaire à la propagation rostro-caudale de l'activité, comparé à la larve contrôle (Eklöf-Ljunggren et al., 2012) **(Figure 42A et B)**. Ainsi, les interneurones V2a sont à la fois nécessaires et suffisants pour initier la locomotion.

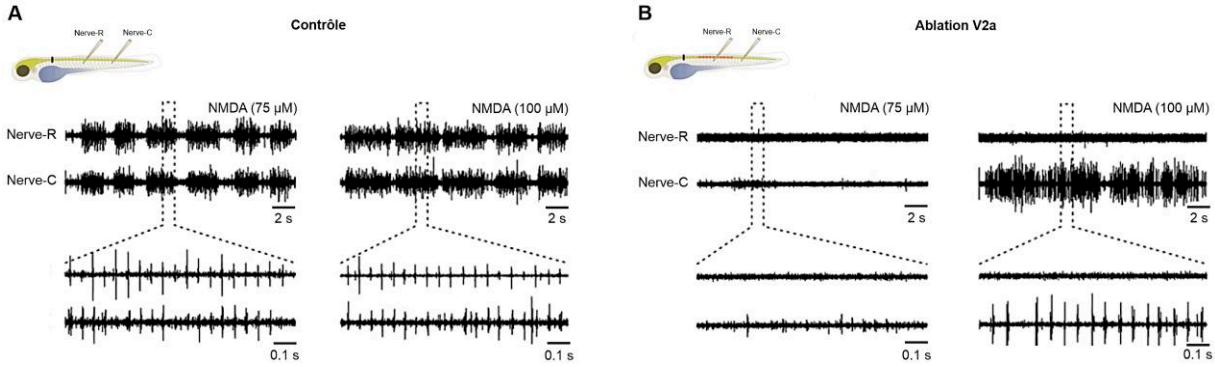


Figure 42| **L'ablation des interneurones V2a altère l'activité de nage chez la larve de poisson-zèbre**

(A et B) Schéma expérimental représentant le site de la transsection (trait noir) et la position des électrodes d'enregistrement pour la nage fictive, chez une larve de poisson-zèbre contrôle (A) et chez une larve dont certains interneurones V2a sont éliminés via un laser biphotonique (zone orange ; B). L'application de NMDA à 75 µM est suffisante pour induire une nage fictive chez la larve contrôle (A), comparé à la larve avec ablation aigue des interneurones V2a (B). L'augmentation de la concentration de NMDA à 100 µM prolonge la durée des épisodes de nage en contrôle, tandis que chez la larve où des interneurones V2a sont supprimés, la nage fictive est enregistrée uniquement dans la région caudale, en dessous de l'ablation (Adapté de Eklof Ljunggren et al., 2012).

En plus de générer et de coordonner les mouvements locomoteurs, le CPG doit également permettre la transition entre différentes vitesses de locomotion, afin de s'adapter aux conditions environnementales. Le CPG spinal convertit les commandes excitatrices supraspinales, en un recrutement progressif des unités motrices, ce qui permet d'ajuster la vitesse du mouvement. Les larves de poisson-zèbre nagent à des fréquences élevées (>20 Hz) en utilisant principalement des muscles rapides, tandis que les adultes nagent à des

fréquences beaucoup plus basses (1-21 Hz). Ces changements correspondent à une réorganisation musculaire, passant d'une couche musculaire rapide, à une organisation en trois couches (muscles lents, intermédiaires et rapides). Chez le poisson-zèbre adulte, trois sous-types d'interneurones V2a (V2a lents, intermédiaires ou rapides) et trois groupes de motoneurones, avec des propriétés intrinsèques spécifiques, sont recrutés en fonction de la vitesse de nage **(Figure 43)** (Ampatzis et al., 2013). Cette organisation en trois modules de vitesse est responsable de la flexibilité observée dans le contrôle de la vitesse de nage, où chaque module peut être recruté de façon indépendante ou séquentielle (Ampatzis et al., 2014 ; Grillner & El Manira, 2020). Song et collaborateurs montrent que chaque module est composé de deux interneurones V2a effectuant des connexions récurrentes excitatrices. Les interneurones V2a lents ont une activité en bouffées, projettent leurs axones de façon unidirectionnelle vers les parties caudales de la ME et ciblent préférentiellement les motoneurones lents, via les récepteurs NMDA. Les interneurones V2a rapides présentent des oscillations du potentiel membranaire, projettent bi-directionnellement et font des synapses sur le soma des motoneurones rapides, où ils produisent une faible excitation. De plus, les auteurs montrent que le module lent est recruté avant le module rapide et ce dernier, nécessite l'activation d'un plus grand nombre d'entre eux pour générer une réponse des motoneurones (Song et al., 2018). L'élimination des interneurones V2a impliqués dans la nage rapide supprime la capacité de nager à la plus haute fréquence (Eklöf-Ljunggren et al., 2012). Ainsi, chez le poisson zèbre, le CPG locomoteur n'est pas constitué d'un unique réseau mais plutôt de trois modules de vitesses interneurones-motoneurones, activés individuellement ou séquentiellement en fonction de la vitesse de la nage. Les interneurones V2a constituent donc une source d'excitation intrinsèque essentielle pour la mise en place normale du rythme locomoteur. Les Nc-LCS sont aussi impliqués dans la modulation de la vitesse, en projetant sur des composants des circuits d'échappement et de nage lente (cf Section I A8c, **Figure 32**).

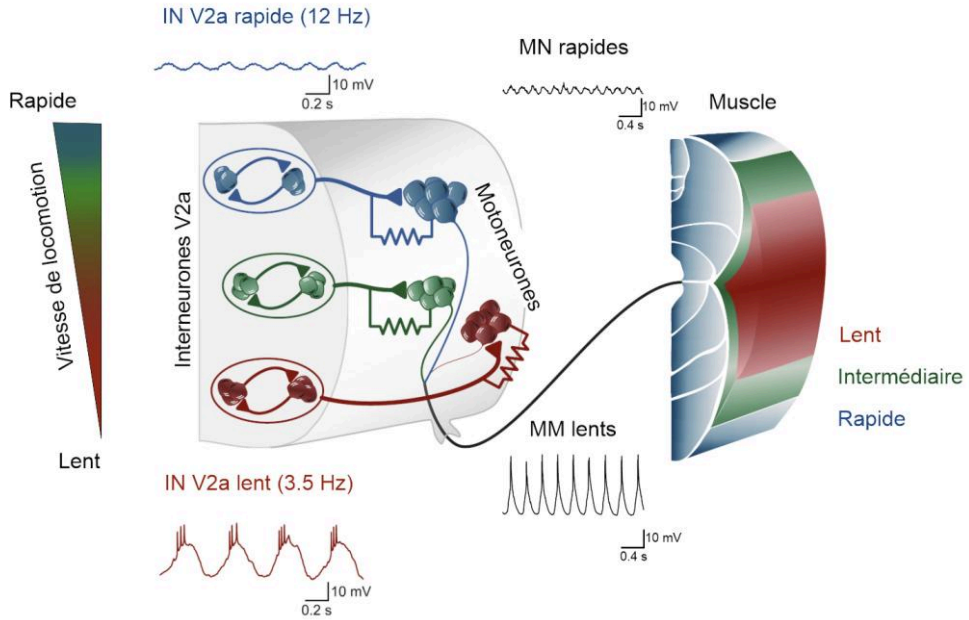


Figure 43| **La diversité des interneurones V2a permet de contrôler la force des mouvements locomoteurs chez le poisson-zèbre adulte**

Schéma de l'organisation en 3 modules des interneurones V2a chez le poisson-zèbre. Les modules d'interneurones V2a sont recrutés différentiellement en fonction de la fréquence de nage et contrôlent les motoneurones et les muscles rapides, intermédiaires et lents. Les interneurones V2a rapides recrutés à des fréquences de locomotion supérieures à 8 Hz, ont un potentiel membranaire oscillant tandis que les V2a lents, recrutés à des fréquences plus basses ont une activité en burst (Adapté de Grillner & El Manira, 2019 et Song et al., 2018).

Interneurones V0

Les interneurones V0 présentent une grande diversité : il existe des interneurones V0v ventraux et les V0d dorsaux. Au stade larvaire, la sous-population d'interneurones V0v est composée des V0v ascendants (UCoDs) qui apparaissent en premier, des divergents (MCoDs) et enfin des descendants (UCoDs). Chez la larve de poisson-zèbre, le sous-type MCoD est impliqué dans la nage lente. Chez le poisson-zèbre adulte, il existe une plus grande diversité fonctionnelle, certains sont actifs à faible vitesse, tandis que d'autres ne sont recrutés qu'à des vitesses intermédiaires ou rapides. Une grande proportion d'interneurones V0v est impliquée dans la coordination de la nage à des vitesses élevées. Pour la nage lente, les interneurones V2a semblent avoir remplacé les MCoDs, suggérant que des changements développementaux impactent la fonctionnalité des V0v (Wilson & Sweeney, 2023).

Les interneurones V0d, sont glycinergiques divergeants (CoBL : glycinergic commissural bifurcating longitudinal), forment des connexions avec les motoneurones controlatéraux et déchargent pendant la nage rapide (Wilson & Sweeney, 2023). Sur des préparations de ME isolées, l'ajout de strychnine dans le bain pour bloquer la transmission glycinergique, transforme l'activité alternée des sorties motrices en une activité synchrone, sans affecter le rythme, suggérant que les interneurones commissuraux glycinergiques assurent l'alternance gauche-droite, comme chez la lamproie (Ljunggren et al., 2014).

d) Le CPG de la marche

Chez les mammifères, le CPG spinal, qui contrôle la locomotion des quadrupèdes, est un réseau distribué avec des centres situés au niveau cervical et lombaire, responsables de la coordination rythmique des mouvements des membres antérieurs et postérieurs respectivement.

Localisation du CPG des membres postérieurs

Le CPG des membres postérieurs a été largement étudié. Des expériences de lésions ou de marquage à la sulforhodamine par exemple, combinées à des préparations de moelles épinières isolées de rats nouveau-nés, ont permis de localiser les réseaux neuronaux responsables de la locomotion. Ces études ont montré que les composants du CPG locomoteurs, ayant la capacité de générer une activité rythmique alternée des membres inférieurs, sont distribués des segments thoraciques bas aux segments lombaires, allant de T11 à L6. Les auteurs observent néanmoins des zones clés pour la rythmogenèse, situées dans la région ventromédiane au niveau des *laminae* VII, VIII et X, des segments thoraciques T12-T13 et lombaires L1-L2. En effet, une activité rythmique a été observée dans seulement 33 % des segments isolés L4-L5/L6. Par ailleurs, lorsque l'activité locomotrice est induite pharmacologiquement sur des préparations d'hémi-moelles, l'activité rythmique alternée entre les racines ventrales ipsilatérales L2 (MN fléchisseurs) et L5 (MN extenseurs), est maintenue, même en l'absence des connexions commissurales. Ainsi, les circuits responsables de l'alternance des muscles fléchisseurs et extenseurs sont situés dans les deux hémi-moelles. Par ailleurs, la lésion au niveau de la commissure médiane ventrale montre que les fibres impliquées dans l'alternance gauche-droite semblent se croiser uniquement dans la commissure ventrale (Cina & Hochman, 2000 ; Kjaerulff & Kiehn, 1996). Dans l'ensemble, ces recherches indiquent que le réseau rythmogène contrôlant les mouvements des membres postérieurs chez le rat nouveau-né, est distribué dans la région ventrale du renflement lombaire, avec un gradient d'activité rostro-caudal (Kiehn, 2016).

Ces connaissances se sont progressivement affinées grâce à des techniques d'optogénétique couplées à des enregistrements de locomotion fictive. L'activation optogénétique des neurones vGlut2^{+} (transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate) sur des

préparations de ME isolées, est capable de générer une locomotion fictive, similaire à celle induite pharmacologiquement **(Figure 44A)**. En revanche, le blocage de la transmission glutamatergique, abolit l'activité induite par la lumière **(Figure 44B, à gauche)**. De plus, la stimulation des neurones Vglut2$^+$ dans la partie dorsale, n'induit pas d'activité rythmique alternée, confirmant que la génération du rythme locomoteur repose sur des interneurones glutamatergiques localisés dans la région ventrale de la ME (Hägglund et al., 2010). Des stimulations optogénétiques ciblées, montrent également que le CPG s'étend des segments bas thoraciques jusqu'à bas lombaires, bien que la capacité des neurones Vglut2$^+$ à générer une activité rythmique rapide et régulière diminue dans les régions caudales L4-L6, comparée aux régions rostrales L1-L2 **(Figure 44C)**. D'autre part, la locomotion peut être induite de manière unilatérale, et la lésion au niveau de la commissure médiane ventrale **(Figure 44E)**, suggère qu'elle n'est pas dépendante d'un réseau bilatéral partagé. Par ailleurs, il est également possible de stimuler uniquement le segment L2 pour induire une activité rythmique de flexion en L2 sans effet en L5, et inversement, indiquant que les activités de flexion et d'extension peuvent fonctionner indépendamment l'une de l'autre **(Figure 44D)** (Hägglund et al., 2013). Ainsi, le CPG de la marche implique des neurones inhibiteurs ipsilatéraux pour l'alternance des muscles fléchisseurs et extenseurs, tandis que les neurones commissuraux coordonnent l'alternance gauche-droite.

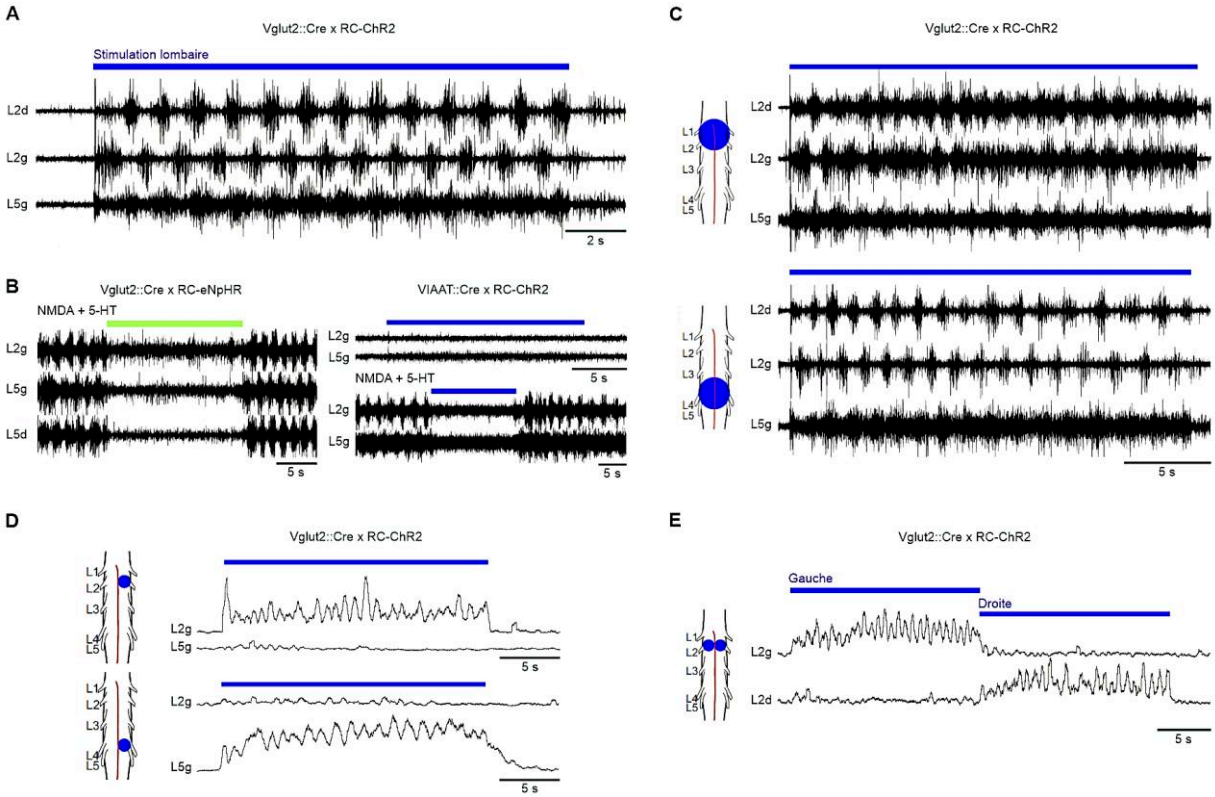


Figure 44| **Distribution des modules rythmogéniques du CPG locomoteur chez la souris**

(A-E) Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (droite et/ou gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite par 8 µM de NMDA et de 7 µM de 5-HT, sur des préparations de ME isolées de souris transgéniques. **(A)** L'activation optogénétique d'interneurones Vglut2$^+$ montre que les interneurones glutamatergiques sont suffisants et nécessaires pour induire la locomotion. **(B)** Leur inhibition lors d'une activité locomotrice en cours, provoque son arrêt (à gauche). Par contre l'activation d'interneurones exprimant le transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs (VIAAT) n'est pas capable d'induire une locomotion fictive, mais leur activation lors d'une activité locomotrice en cours la stoppe (à droite). **(C)** La locomotion fictive peut être induite par l'activation d'interneurones excitateurs Vglut2$^+$ au niveau des segments lombaires rostral et caudal (Ø spot : 0,4-2,5 mm²). **(D)** L'activation restreinte d'interneurones glutamatergiques au niveau rostral, d'un seul côté de la moelle, est capable de déclencher une activité de locomotion fictive exclusivement dans le réseau fléchisseur (L2), tandis que leur activation au niveau caudal, recrute uniquement le réseau extenseur (L5). Les réseaux fléchisseurs L2 et extenseurs L5 peuvent être indépendamment activés. **(E)** La locomotion fictive peut être initiée unilatéralement (Hägglund et al., 2013).

Chez les rongeurs, l'ensemble de ces études suggère, le CPG contrôlant le mouvement des membres postérieurs est localisé dans la partie ventromédiane, de chaque côté de la ME, s'étendant des segments thoraciques bas aux segments lombaires (T12-L6) avec un gradient rythmogène rostro-caudal : les segments rostraux (L1-L2) étant plus excitables que les segments caudaux. Comme pour le CPG de la nage, les interneurones générateurs du rythme chez les mammifères, sont glutamatergiques et projettent ipsilatéralement **(Figure 45)**.

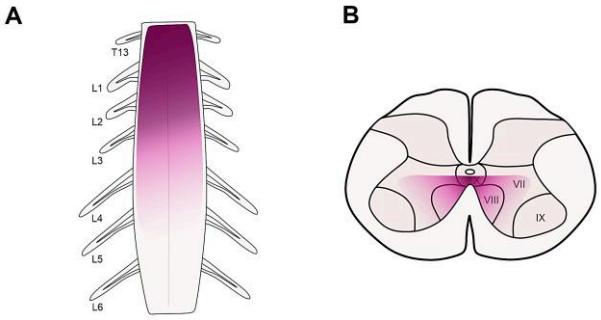


Figure 45 | Localisation du CPG locomoteur chez le rongeur nouveau-né
(Adapté de Verneuil, 2021)

La locomotion est un comportement moteur complexe impliquant l'activation coordonnée de nombreux muscles des membres et du tronc, qui est modulée par le contexte environnemental. Pour produire des mouvements variés, fluides et adaptés à l'activité en cours, les CPGs locomoteurs doivent faire preuve d'une grande flexibilité pour intégrer les informations supraspinales et périphériques. Cette capacité des CPGs, est liée à la diversité des neurones qui les composent et à leur connectivité (El Manira, 2014 ; Grillner & El Manira, 2020).

Développement moléculaire et cellulaire du circuit locomoteur spinal

Chez les vertébrés, l'identité des cellules de la ME est définie pendant le développement selon trois axes : rostro-caudal, dorso-ventral et médio-latéral. Dès les premières étapes du développement, la position rostro-caudale est déterminée par des gradients opposés de facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs, caudalisant) et d'acide rétinoïque (RA, rostralisant). L'axe dorso-ventral est régulé par des morphogènes sécrétés par la plaque du plancher avec Sonic hedgehog (Shh), facteur ventralisant, et par la plaque du toit, avec les protéines TGFβ (Transforming growth factor), telles que les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs : Bone morphogenic proteins) et les Wnts, qui sont des facteurs dorsalisant (Alaynick et al., 2011 ; Lu et al., 2015) **(Figure 46A)**. Ainsi, les morphogènes des plaques du plancher et du toit forment des gradients de concentrations, qui délimitent l'expression de facteurs de transcription spécifiques, entraînant la formation de onze domaines progéniteurs le long de l'axe dorso-ventral du tube neural : 5 ventraux (p0-p3 et pMN) et 6 dorsaux (pd1-6), caractérisés par l'expression d'un code de facteurs de transcription. Au cours du développement, ces cellules progénitrices deviennent matures et migrent latéralement vers leur position finale, donnant naissance à dix populations d'interneurones (ventraux : V0-V3, dorsaux : dI1-dI6) et à une population de motoneurones (MN), chacune définie par une combinaison spécifique de facteurs de transcription (Alaynick et al., 2011; Deska-Gauthier & Zhang, 2019) **(Figure 46B)**. Grâce à la connaissance de ce code de facteurs de transcription, la localisation, la morphologie, les propriétés intrinsèques, la connectivité, et même le rôle de certaines populations cellulaires dans la locomotion, ont pu être caractérisés. La partie ventrale de la ME lombaire contient une grande partie des composants du CPG locomoteur, bien que certaines populations dorsales y participent également.

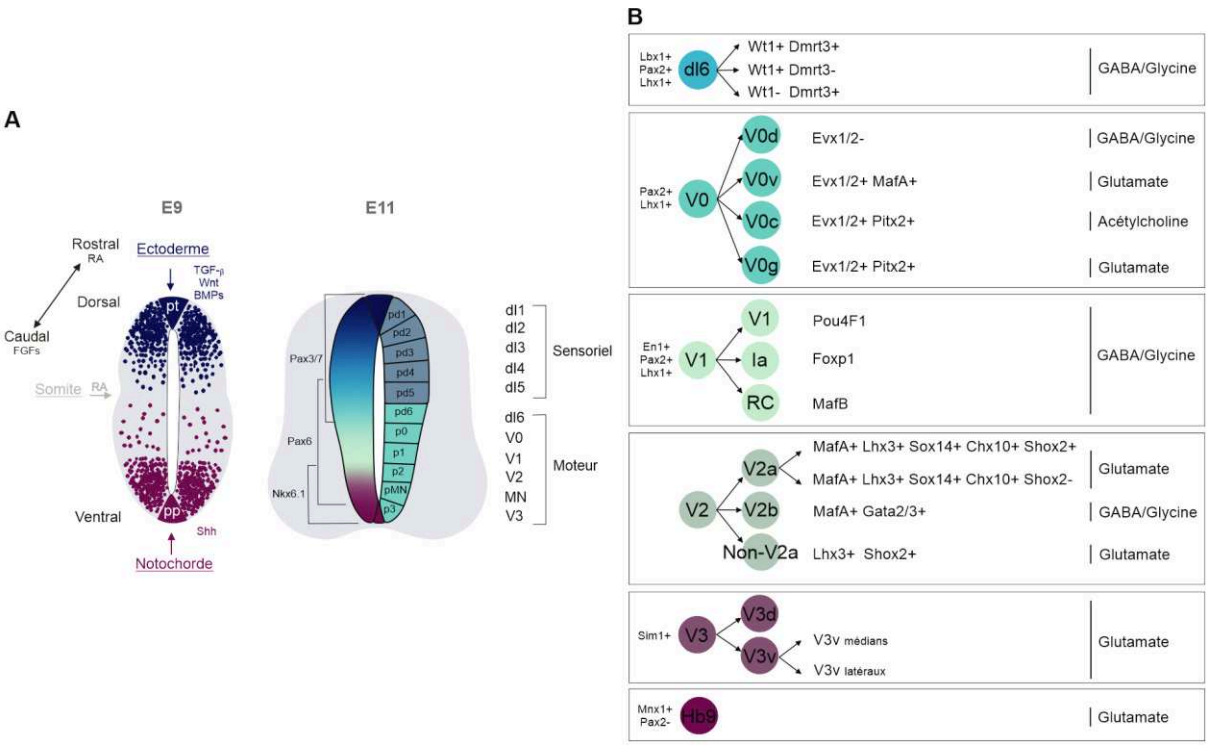


Figure 46 | Développement de la moelle épinière

(A) Représentation schématique de la ME au cours du développement. Des gradients de morphogènes ventraux (Sonic hedgehog : Shh) sécrétés par la plaque du plancher (pp), dorsaux (TGFβ : Transforming growth factor, Wnt et BMPs), sécrétés par la plaque du toit (pt), latéraux (RA : acide rétinoïque) ou rostralisant/caudalisant (RA et FGFs : facteurs de croissance des fibroblastes) vont influencer l'établissement de 11 domaines de progéniteurs : 6 dorsaux et 5 ventraux. Lors de la dernière semaine de développement, 10 classes d'interneurones embryonnaires se distinguent par l'expression de facteurs de transcriptions dont 6 ventraux. **(B)** Classes d'interneurones ventraux et leurs sous-types exprimant un code de facteurs de transcription spécifique.

Des expériences de lésions ont suggéré que le CPG locomoteur chez les mammifères est organisé en deux modules distincts : l'un composé de neurones responsables de la genèse du rythme et l'autre du contrôle du patron locomoteur. Les interneurones glutamatergiques ipsilatéraux jouent un rôle clé dans la genèse du rythme, tandis que les projections des interneurones commissuraux (inhibiteurs et excitateurs) assurent l'alternance gauche-droite des mouvements des membres (McCrea & Rybak, 2008).

Le générateur du rythme locomoteur

Les neurones appartenant au générateur du rythme synchronisent la locomotion et déterminent la cadence du rythme. Comme chez la lamproie ou le têtard, des expériences de locomotion fictive ont montré que les interneurones glutamatergiques ipsilatéraux sont suffisants et nécessaires pour générer une locomotion rythmique chez les rongeurs (Grillner & El Manira, 2020 ; Hägglund et al., 2010 ; Kjaerulff & Kiehn, 1996). Récemment, plusieurs groupes d'interneurones ventraux, rythmiquement actifs pendant la locomotion fictive, ont été identifiés. Leur inactivation ou ablation altère la fréquence, suggérant leur implication dans la génération du rythme locomoteur.

Interneurones non-V2a Shox2^{+}

Les interneurones non-V2a Shox2^{+}, forment une petite population de neurones glutamatergiques ventraux, marqués par l'expression du facteur de transcription Shox2. Ces cellules sont présentes le long de l'axe rostro-caudal et projettent ipsilatéralement. L'analyse de la connectivité synaptique a révélé que les interneurones Shox2 établissent des connexions réciproques, sont électriquement couplés, et contactent des neurones commissuraux ainsi que des motoneurones (préférentiellement fléchisseurs) (Dougherty et al., 2013 ; Dougherty & Ha, 2019). Dougherty et collaborateurs, distinguent les interneurones V2a Shox^{off} (Chx10^{+}

Shox2$^-$), les V2a Shox2$^+$ (Chx10$^+$ Shox2$^+$), dérivant du domaine progéniteur p2, à l'origine des interneurones V2 (Ericson et al., 1997), et les non-V2a Shox2$^+$ (Chx10$^-$ Shox2$^+$). Ils montrent que l'ablation des interneurones V2a Shox2$^+$ (Chx10$^+$ Shox2$^+$) n'affecte pas la locomotion mais augmente la variabilité des décharges. Par contre, l'inhibition optogénétique des interneurones Shox2$^+$, perturbe le rythme locomoteur en diminuant sa fréquence et en augmentant la variabilité des décharges, sans impacter la coordination. (Dougherty et al., 2013; Dougherty & Ha, 2019) **(Figure 47A)**. Ces résultats suggèrent que les interneurones V2a Shox2$^+$ (Chx10$^+$ Shox2$^+$) jouent un rôle dans la variabilité des décharges, alors que les non-V2a Shox2$^+$ (Chx10$^-$ Shox2$^+$) seraient plutôt impliqués dans la genèse du rythme. L'élimination des neurones non-V2a Shox2$^+$ n'abolissant pas complètement le rythme locomoteur, indique qu'ils ne sont pas les seuls acteurs impliqués.

Interneurones Hb9

Les interneurones Hb9, qui expriment le facteur de transcription Hb9, également présent dans les motoneurones, sont situés à proximité du canal central (*laminae* X et VIII), dans les segments lombaires rostraux. Ces neurones glutamatergiques reçoivent des connexions des afférences sensorielles et projettent leurs axones ipsilatéralement vers les motoneurones (Caldeira et al., 2017 ; C. A. Hinckley et al., 2005). Les interneurones Hb9 possèdent des propriétés intrinsèques, appelée propriétés pacemaker médiées par l'activation des courants sodium persistants (INaP). Ainsi, les interneurones Hb9 sont capables de générer des décharges rythmiques de PA en l'absence de transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices (Brocard et al., 2010). Bien qu'ils soient rythmiquement actifs pendant l'activité locomotrice induite pharmacologiquement *ex vivo* (C. A. Hinckley et al., 2005), leur activité arrive après celle des motoneurones. Ainsi, si ces cellules ont été proposées comme composant du CPG locomoteur chez les rongeurs, leur implication reste encore controversée.

Caldeira et collaborateurs ont récemment montré chez des souris Hb9::cre, que le blocage de la neurotransmission glutamatergique, par l'élimination de Vglut2, n'affecte pas le patron locomoteur, puisque l'alternance gauche-droite et fléchisseur-extenseur est maintenue, mais diminue significativement la fréquence de la locomotion fictive (Caldeira et al., 2017) **(Figure 47B)**. Cependant, une étude plus récente utilisant un modèle murin adulte cre-inductible, montre que la délétion de Vglut2 dans les interneurones Hb9, n'a pas d'effet sur la locomotion (Koronfel et al., 2021). Ces différences peuvent notamment s'expliquer par les différents modèles génétiques utilisés. Ces différentes études suggèrent que les interneurones Hb9, pourraient participer dans l'initiation et la modulation du rythme locomoteur chez les rongeurs, bien que des études complémentaires soient nécessaires pour confirmer ces résultats.

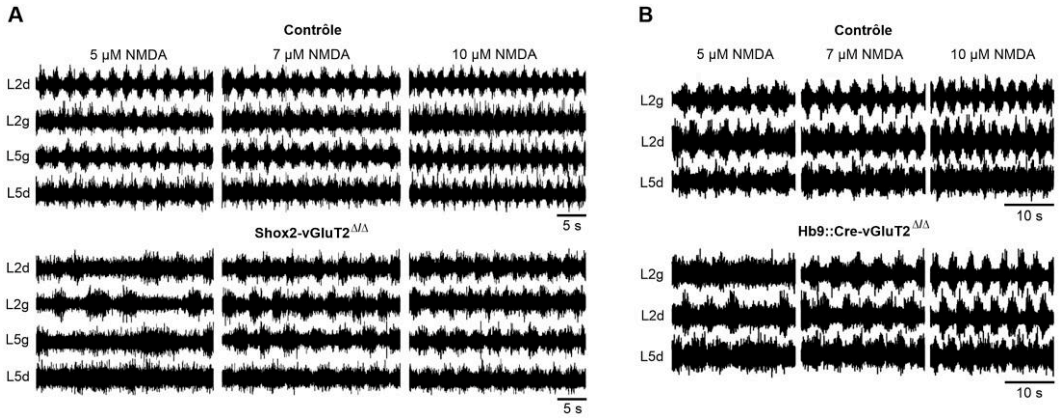


Figure 47 | L'élimination de vGluT2 dans les interneurones Shox2 et Hb9 diminue la fréquence de la locomotion fictive

(A et B) Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (à droite et à gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite par différentes concentrations de NMDA (5, 7 et 10 µM) et de 8 µM de 5-HT, sur des préparations de ME isolées de souris sauvages et de souris transgéniques **(A)** Shox2-vGluT2$^{\Delta/\Delta}$ et **(B)** Hb9::CCre-vGluT2 $^{\Delta/\Delta}$ (Adaptés de Dougherty et al., 2013 et Caldeira et al., 2017).

Il est à noter que la délétion génétique des interneurones dI6 (Dyck et al., 2012 ; Andersson et al., 2012), V1 (Gosgnach et al., 2006) et V3 (Y. Zhang et al., 2008), affecte aussi l'activité rythmique des sorties motrices.

Depuis la découverte du code des facteurs de transcription des neurones spinaux, de nombreuses études ont tenté d'identifier les éléments responsables du rythme locomoteur. Chez la souris, aucune population de neurones glutamatergiques à projection ipsilatérale, n'est nécessaire et suffisante pour produire une activité rythmique, puisque cette dernière persiste malgré la suppression/inhibition de chaque type d'interneurones. Plusieurs populations neuronales pourraient générer le rythme et pourraient compenser la perte de l'une d'entre elles. Les neurones générateurs de rythme pourraient également appartenir à des sous-groupes de différentes classes neuronales, comme pour les neurones Shox2 (Dougherty et al., 2013). Enfin, l'ablation/blocage synaptique d'une population entière d'interneurones excitateurs, à un stade précoce du développement, pourrait déclencher des mécanismes compensatoires, en réponse à la diminution de l'excitabilité intrinsèque de la ME.

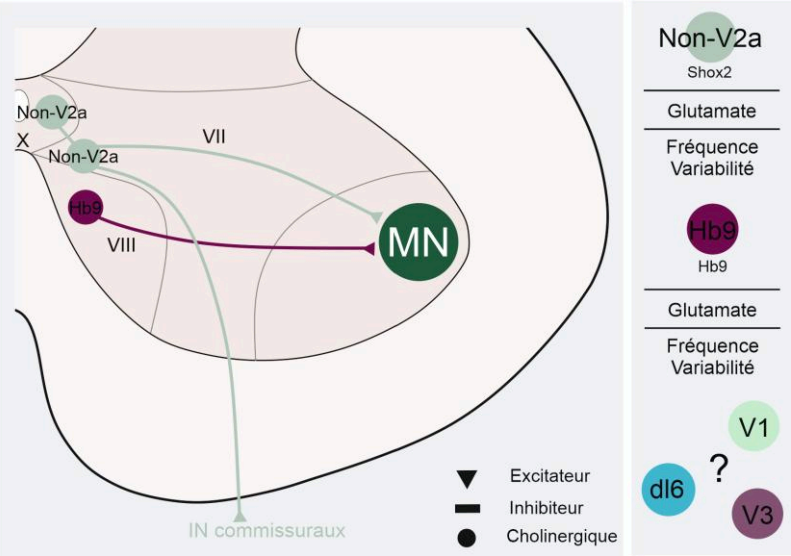


Figure 48 | **Neurones présumés impliqués dans la genèse du rythme**

Le générateur du patron locomoteur

Les neurones générateurs du patron locomoteur, orchestrent l'activation séquentielle des groupes de motoneurones, et assurent ainsi la coordination des mouvements gauche-droite et fléchisseurs-extenseurs.

Alternance fléchisseurs/extenseurs

L'activation et l'inhibition simultanées de groupes de muscles antagonistes sont essentielles pour exécuter un acte locomoteur. Puisque l'alternance flexion-extension est conservée dans une hémi-moelle, il a été suggéré que l''alternance entre les muscles fléchisseurs et extenseurs, pourrait dépendre de l'activité de réseaux inhibiteurs à projection ipsilatérale, (Kjaerulff & Kiehn, 1996 ; Whelan et al., 2000). Une autre étude montre que le blocage des transmissions GABAergique/glycinergique entraîne l'activation simultanée des muscles fléchisseurs et extenseurs, confirmant l'implication d'interneurones inhibiteurs dans l'alternance flexion-extension (Cowley & Schmidt, 1995 ; C. Hinckley et al., 2005).

Interneurones V1

Les interneurones V1 provenant du domaine progéniteur p1, sont caractérisés par l'expression transitoire d'Engrailed 1 (En1) et sont localisés dans la *lamina* VII. Il s'agit d'une population inhibitrice (principalement glycinergique), à projection ipsilatérale vers les *laminae* VII, IX et dans la corne dorsale. Les interneurones V1 sont rythmiquement actifs pendant la locomotion et comptent plusieurs sous-populations. Les cellules de Renshaw et les interneurones Ia, représentant environ 22 % de la population totale (Alvarez et al., 2005 ; Goulding, 2009).

Les cellules de Renshaw coexprimant la calbindine et la parvalbumine, représentent 9 % des interneurones V1. Ils reçoivent des connexions des collatérales des motoneurones, libérant de l'acétylcholine, du glutamate et de l'aspartate et projettent vers les interneurones Ia et les motoneurones (Alvarez et al., 2005 ; Lu et al., 2015). Les cellules de Renshaw forment ainsi avec les motoneurones des connexions réciproques, à l'origine d'une boucle inhibitrice récurrente, et pourraient jouer un rôle dans la régulation de la force des sorties motrices (Deska-Gauthier & Zhang, 2019) (cf section ci-dessous : Contrôle des sorties motrices).

Les interneurones glycinergiques de type Ia, exprimant la parvalbumine, représentent 13 % de la population V1. Ils sont activés par les afférences proprioceptives Ia, provenant des fuseaux musculaires des muscles agonistes (qui fournissent des informations sur l'étirement des muscles) (Feldman & Orlovsky, 1975), et ils reçoivent également des projections des cellules de Renshaw (Alvarez et al., 2005). De plus, ils effectuent des connexions monosynaptiques avec les motoneurones et assurent l'inhibition réciproque entre les motoneurones fléchisseurs et extenseurs. Ces interneurones jouent ainsi un rôle crucial dans la coordination des muscles antagonistes (G. Zhang et al., 2014).

Chez la souris, l'inhibition sélective des interneurones V1 (En1) réduit considérablement la vitesse du rythme locomoteur *ex vivo,* en prolongeant la durée des décharges locomotrices. Cet effet pourrait être expliqué, par l'importance de l'inhibition dans l'arrêt de la décharge des motoneurones. Au vu de ces résultats et du fait que les patrons ne soient pas affectés, les interneurones V1, pourraient contribuer à la modulation des bouffées rythmiques locomotrices, sans affecter les activités fléchisseurs-extenseurs et gauche-droite (Gosgnach et al., 2006) **(Figure 49)**.

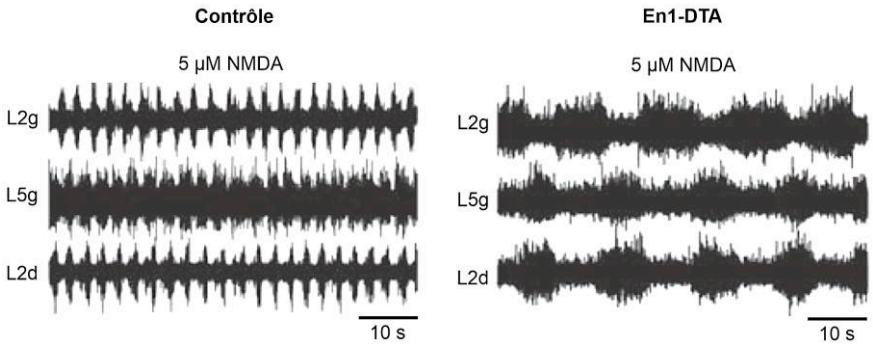


Figure 49 | Les souris mutantes pour les interneurones V1 ont une fréquence de locomotion fictive ralentie

Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (droite et/ou gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite pharmacologiquement par 5µM de NMDA et 10 µM de 5-HT, chez une souris sauvage et une souris transgénique En1-DTA, où les interneurones V1 ont été délétés par la toxine diphtérique (DTA) (Adapté de Gosgnach et al., 2006).

In vivo, des tests de Rotarod montrent que ces mêmes animaux ont des difficultés à marcher et à maintenir leur équilibre à des vitesses élevées, suggérant que ces neurones sont nécessaires pour induire des sorties locomotrices rapides. Ces résultats soulignent le rôle essentiel des neurones V1 chez les mammifères dans la régulation de la durée des cycles du pas locomoteur, et donc de la vitesse de locomotion. Cependant, ils semblent ne pas avoir de

rôle dans la coordination entre les muscles fléchisseurs et extenseurs (Gosgnach et al., 2006), ce qui laisse à penser que d'autres neurones inhibiteurs ipsilatéraux, pourraient être responsables de cette alternance, seuls ou en combinaison avec les interneurones V1.

Aussi, une étude de Bikoff et collaborateurs a révélé que les interneurones V1, sont divisés en sous-ensembles très divers, présentant une très grande hétérogénéité avec l'expression de 19 facteurs de transcription, une distribution structurée le long des axes médio-latéral et dorso-ventral, et des propriétés physiologiques différentes (Bikoff et al., 2016).

Interneurones V2b

Les interneurones V2b appartiennent à la famille des interneurones V2. Ils dérivent des cellules progénitrices Lhx3^{+} et expriment le facteur de transcription Gata2/3. Les interneurones V2b sont localisés dans la *lamina* VII, ils sont inhibiteurs et projettent leurs axones ipsilatéralement vers plusieurs segments caudaux, pour former des connexions directes avec différents groupes de motoneurones, ainsi qu'avec des interneurones cholinergiques V0c et des interneurones localisés dans les *laminae* VII et VIII. Par ailleurs, il semblerait que les interneurones V2b pourraient, comme les interneurones V1, être à l'origine des cellules Ia (J. Zhang et al., 2014).

Lorsque la transmission synaptique inhibitrice des interneurones V2b est bloquée, la locomotion fictive enregistrée sur des hémi-moelles, est en partie synchrone, suggérant qu'en plus des V2b, d'autres interneurones inhibiteurs sécurisent l'alternance fléchisseurs-extenseurs **(Figure 50B)**.

Cependant, lorsque la transmission synaptique des populations V1 et V2b est simultanément bloquée, les racines motrices ventrales L2 et L5 ipsilatérales déchargent toutes de manière synchrone **(Figure 50C)**. De plus, chez ces souris nouveau-nées où l'inhibition médiée par V1 et V2b est absente, une immobilité des 4 membres et des déficits lors du réflexe de retournement, un test qui requiert une séquence de mouvements de flexion et d'extension des quatre membres, sont observés. Ces résultats indiquent que le contrôle des muscles fléchisseurs et extenseurs, essentiel à la locomotion chez les espèces dotées de membres, est une fonction partagée entre les interneurones V2b et V1 (J. Zhang et al., 2014).

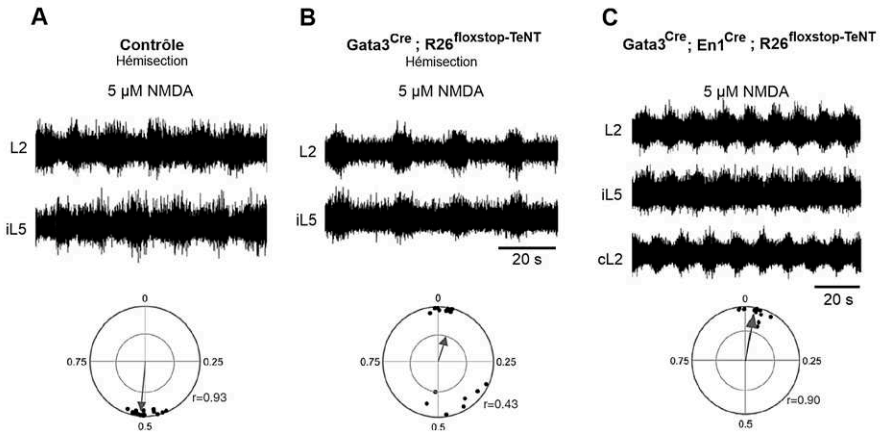


Figure 50 | L'élimination des interneurones V1 et V2b altère la coordination des muscles fléchisseurs et extenseurs

Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (ipsilatérale et/controlatérale) lors d'une activité de locomotion fictive induite par 5 µM de NMDA et 15 µM de 5-HT, sur des préparations de moelles épinières isolées d'une souris sauvage **(A)**, d'une souris transgénique Gata3Cre ; R26floxstop-TeNT, où la transmission synaptique des interneurones V2b a été éliminée **(B)** et d'une souris Gata3Cre ; En1Cre ; R26floxstop-TeNT, chez laquelle, la transmission des interneurones V2b et V1 est abolie **(C)** (Adapté Zhang et al., 2014).

Britz et collaborateurs ont, par ailleurs, révélé que les interneurones V1 innervent préférentiellement les motoneurones fléchisseurs. Leur ablation sélective entraîne une

hyperflexion pendant la phase de transfert. En revanche, les interneurones V2b innervent préférentiellement les motoneurones extenseurs, et leur ablation sélective entraîne une hyperextension pendant la phase d'appui. Ainsi, bien que l'alternance fléchisseur-extenseur soit une fonction partagée par les interneurones V1 et V2b, leurs rôles ne sont pas redondants, chaque classe étant spécialisée dans l'inhibition de muscles spécifiques et antagonistes (fléchisseurs ou extenseurs) (Britz et al., 2015). La production d'un rythme moteur alterné des muscles fléchisseurs et extenseurs repose sur la coordination des activités de deux populations d'interneurones ventraux inhibiteurs à projection ipsilatérale : les interneurones V1 et V2b.

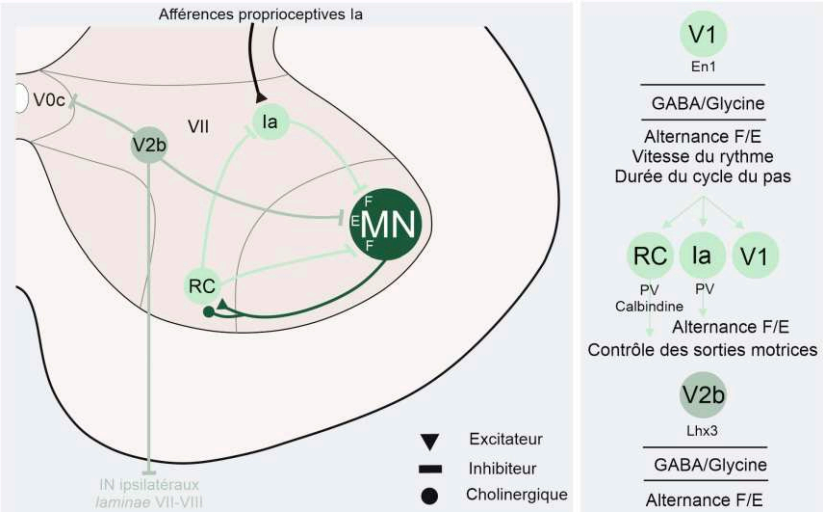


Figure 51 | Neurones présumés impliqués dans l'alternance gauche-droite

Alternance gauche/droite et maintien de la posture

La capacité de la ME à coordonner les contractions musculaires des deux côtés du corps est cruciale pour la locomotion. Pendant la marche et le trot, l'activité gauche-droite des membres est alternée, alors qu'elle devient synchrone lors du galop (Bellardita & Kiehn, 2015). Les interneurones commissuraux, dont les axones traversent la ligne médiane de la ME, joueraient un rôle clé dans cette coordination.

Interneurones V0 : V0v et V0d

Les neurones V0, caractérisés par l'expression précoce du facteur de transcription Dbx1, constituent une classe importante de neurones commissuraux dans la ME ventrale. Cette population est composée de neurones dorsaux inhibiteurs (V0d : Evx1$^-$) et de neurones ventraux glutamatergiques (V0v : Evx1$^+$), qui projettent sur des interneurones ventraux et des motoneurones (Lu et al., 2015).

Chez la souris, l'ablation des interneurones V0 (DbX$^+$) par la toxine diphtérique (DTA), entraine *in vivo,* des mouvements synchrones des membres gauches et droits à toutes les vitesses et un déplacement par sauts **(Figure 52A)** (Bellardita & Kiehn, 2015 ; Lanuza et al., 2004 ; Talpalar et al., 2013). De plus, *ex vivo*, la disparition de l'alternance gauche-droite, est remplacée par des décharges synchrones de toutes les sorties motrices **(Figure 52B, à gauche)**. Par contre, les neurones inhibiteurs V0d semblent nécessaires à l'alternance gauche-droite pour des vitesses de locomotion faibles, puisque lorsqu'ils sont absents, l'alternance est maintenue à des fréquences de locomotion fictive élevées **(Figure 52B, au milieu)** (Talpalar et al., 2013). Lorsque la sous-population V0v est spécifiquement éliminée par la DTA, l'alternance gauche-droite est uniquement altérée lors du trot, et reste intacte aux autres vitesses de locomotion **(Figure 52B, à droite)** (Bellardita & Kiehn, 2015 ; Talpalar et al., 2013).

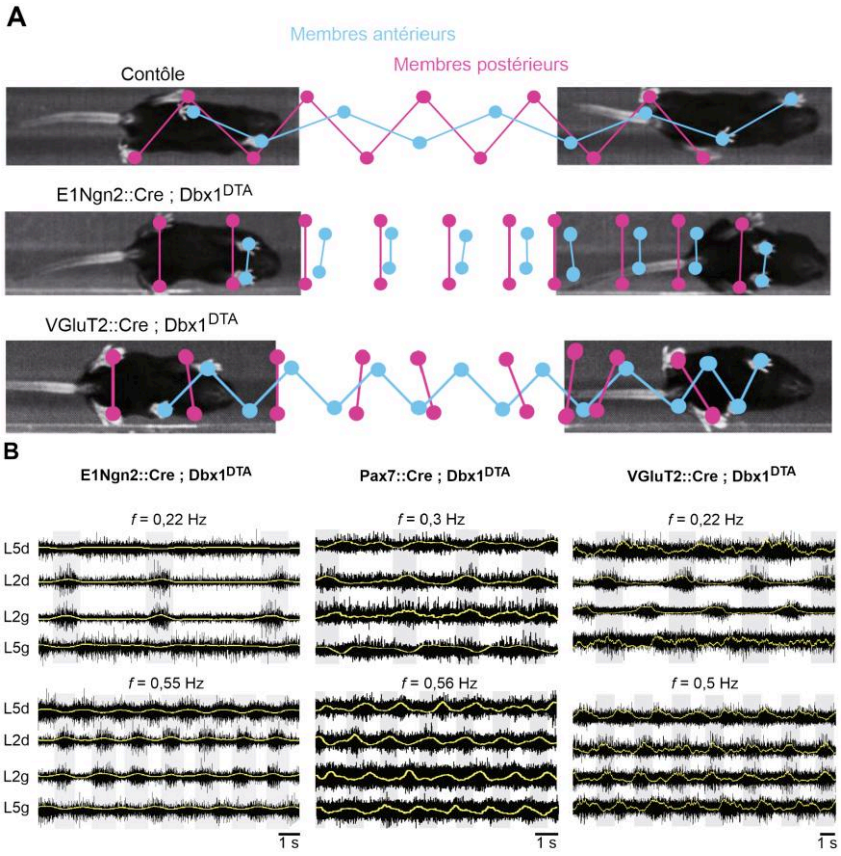


Figure 52 | L'élimination des interneurones V0 altère l'alternance gauche-droite

(A) Patron de locomotion d'une souris contrôle, d'une souris E1Ngn2::Cre ; Dbx1^{DTA}, dans laquelle tous les interneurones V0 (Dbx1^{+}) sont éliminés par la toxine diphtérique (DTA) et d'une souris VGluT2::Cre ; Dbx1^{DTA}, où seuls les interneurones V0v glutamatergiques sont supprimés. **(B)** Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (droite et gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite par différentes concentrations de NMDA et de 5-HT pour obtenir différentes fréquences d'activité locomotrice, sur des préparations de ME isolées de trois souris transgéniques : E1Ngn2::Cre ; Dbx1^{DTA}, où tous les interneurones V0 (Dbx1^{+}) sont éliminés, Pax7::Cre ; Dbx1^{DTA}, où les interneurones V0d sont absents et VGluT2::Cre ; Dbx1^{DTA}, où l'expression des V0v glutamatergiques est abolie (Adapté de Talpalar et al., 2013).

En résumé, les expériences de marche fictive *ex vivo* et de locomotion *in vivo* montrent que les interneurones excitateurs V0v sont responsables de l'alternance gauche-droite à des vitesses élevées, tandis que les interneurones inhibiteurs V0d sont responsables de cette alternance à des fréquences plus basses. Ces observations suggèrent l'implication d'un autre groupe de neurones dans la synchronisation de l'activité entre les côtés gauche et droit, en l'absence des interneurones V0.

Par ailleurs, il a été montré que les neurones V0 sont également impliqués dans le contrôle de la posture, une tâche nécessitant la coordination des muscles entre les côtés gauche et droit du corps, en intégrant des informations sensorielles des membres ipsilatéraux et controlatéraux. Pour étudier ce rôle, Zelenin et collaborateurs ont utilisé le test de retournement et celui de correction de posture. Le test de retournement implique la coordination des muscles du tronc et des membres des côtés gauche et droit et comprend 2 étapes. L'animal effectue dans un premier temps une flexion ventrale du tronc, accompagnée d'une torsion latérale de la partie avant du corps. Ensuite, il effectue une rotation de l'arrière train. L'élimination des interneurones V0 avec la toxine diphtérique allonge la durée totale pour effectuer le test, tandis que la suppression des neurones V0 glutamatergiques (V0$_{glut}$) n'allonge que la deuxième phase. Ces résultats suggèrent que les interneurones V0$_{glut}$ interviennent spécifiquement dans la deuxième phase, tandis que les sous-populations V0d et V0c participent à l'ensemble du comportement de retournement. D'autre part, le test de correction de posture, met en évidence l'importance des mouvements réciproques des

muscles fléchisseurs et extenseurs des membres gauches et droits. Chez les souris KO-V0, ce test révèle une asymétrie posturale, ainsi qu'une incapacité à stabiliser leur posture sur la plateforme en équilibre, contrairement aux souris KO-$V0_{glut}$. Ces résultats suggèrent qu'au moins une des sous-populations V0d ou V0c est impliquée dans la correction de la posture (Zelenin et al., 2021). Ainsi, les interneurones commissuraux V0 semblent jouer un rôle clé dans la stabilisation du corps, en assurant la coordination réciproque des muscles, essentielle à l'activité asymétrique des muscles homonymes.

Interneurones V2 : V2a

Les neurones ventraux V2, marqués par l'expression du facteur de transcription Lhx3, sont majoritairement positionnés dans la *lamina* VII mais peuvent aussi être observés dans les *laminae* X, VI et V. Ils projettent leurs axones de manière ipsilatérale et sont divisés en deux populations : les neurones V2a, exprimant Chx10 sont excitateurs et les neurones V2b, exprimant Gata2/3 sont inhibiteurs (Al-Mosawie et al., 2007 ; Lundfald et al., 2007). Les interneurones V2a $Chx10^+$ sont glutamatergiques, localisés dans la *lamina* VII et présentent un gradient d'expression rostro-caudal du facteur de transcription Chx10. On distingue ainsi les interneurones de type I, qui maintiennent l'expression de Chx10, présents au niveau lombaire et cervical, et ceux de type II, avec une faible expression de Chx10, localisés dans les segments cervicaux. Les interneurones V2a projettent vers les interneurones commissuraux V0 et les motoneurones et ont une activité rythmique pendant des épisodes de locomotion fictive (Dougherty & Kiehn, 2010 ; Zhong et al., 2010).

Chez les souris Chx10::DTA, où les neurones Chx10 ont été délétés par la toxine diphtérique, l'alternance gauche-droite est conservée à faible vitesse, mais une synchronie est observée lorsque la vitesse augmente **(Figure 53A)**. De plus, bien que l'alternance fléchisseur-extenseur soit maintenue, une augmentation de la variabilité de la fréquence et de l'amplitude des décharges est présente **(Figure 53B)**.

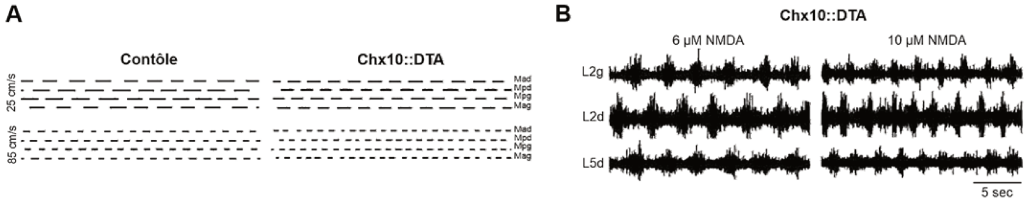


Figure 53| L'élimination des interneurones V2a $Chx10^+$ perturbe l'alternance gauche-droite

(A) Diagramme de la marche des quatre membres, pendant la locomotion sur tapis roulant à différentes vitesses (25 cm/s et 85 cm/s), chez une souris contrôle et chez une souris Chx10::DTA, chez laquelle les interneurones Chx10 sont éliminés par la toxine diphtérique (DTA). La phase d'appui est représentée par les barres noires, tandis que la phase de transfert correspond aux espaces (Mad/g : membre avant droit/gauche et Mpd/g : membre postérieur droit/gauche). **(B)** Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (droite et/ou gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite par différentes concentrations de NMDA (6 µM et 10 µM) et de 5-HT (6 µM et 10 µM) pour obtenir différentes fréquences d'activité locomotrice, sur des préparations de ME isolées de souris Chx10::DTA (Adapté de Crone et al, 2009).

Ces résultats suggèrent que les interneurones V2a jouent un rôle dans la régulation de l'alternance gauche-droite de façon vitesse-dépendante, mais ont peu d'effet sur la rythmogenèse (Crone et al., 2008, 2009 ; Dougherty & Kiehn, 2010 ; Zhong et al., 2010). L'effet de ces neurones ipsilatéraux sur l'alternance gauche-droite pourrait s'expliquer par leurs projections vers les interneurones commissuraux V0, qui modulent l'activité des motoneurones controlatéraux pendant la locomotion (Lanuza et al., 2004).

Interneurones dI6 : Dmrt3 et Wt1

Les interneurones dI6 proviennent de progéniteurs dorsaux, situés au-dessus du domaine p0 et migrent de manière ventromédiale juste avant la naissance, pour s'installer dans les *laminae* VII-VIII (Andersson et al., 2012; Gross et al., 2002). Ils expriment le facteur de transcription Lbx1, sont présents tout le long de la ME et sont majoritairement inhibiteurs,

descendants (Griener et al., 2017) et commissuraux (Goulding, 2009). Les interneurones dI6 forment trois sous-populations distinctes, sur la base de l'expression de facteurs de transcription post-mitotiques : ceux qui expriment Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 3 (Dmrt3), ceux qui expriment Wilms' tumor 1 (Wt1), et ceux qui expriment à la fois Dmrt3 et Wt1 (Griener et al., 2017).

Chez la souris, la majorité des interneurones dI6 sont rythmiquement actifs pendant la locomotion fictive et peuvent être divisés en deux populations, selon leur capacité à osciller. Les interneurones dl6 oscillants, avec une activité faiblement en phase avec les sorties motrices, sont capables d'osciller indépendamment des entrées excitatrices, suggérant une implication dans la génération du rythme locomoteur. Par contre, les interneurones dl6 non-oscillants avec une activité en phase avec les sorties motrices ventrales, n'ont pas la capacité d'osciller de façon intrinsèque et seraient impliqués dans la coordination de l'activité des motoneurones pendant la locomotion, en recevant des commandes du CPG locomoteur. **(Figure 54A)** (Dyck et al., 2012). Cette capacité intrinsèque à osciller est visible en l'absence d'activité au niveau des sorties motrices (pendant des épisodes d'omissions d'activité ; Non-ressetting deletion ; rectangles gris) au cours d'une activité de locomotion fictive, pendant laquelle l'activité d'une partie des dl6 continue à osciller (Griener et al., 2017).

Les interneurones Dmrt3^{+} projettent leurs axones vers des motoneurones des deux côtés de la ME et leur ablation chez la souris altère la coordination ipsilatérale et controlatérale du réseau locomoteur. Les préparations de ME isolée, ont un rythme irrégulier et non coordonné avec une diminution de la fréquence de décharge **(Figure 54B)**. Chez le nouveau-né, cela se traduit par l'absence de mouvements alternés des membres postérieurs et chez l'adulte, par un allongement des foulées et des difficultés à courir à des vitesses élevées (Andersson et al., 2012).

Les interneurones Wt1, majoritairement commissuraux, projettent vers des interneurones impliqués dans la coordination des motoneurones tels que Dmrt3, V1 et V0v. L'inhibition chémogénétique (DREADD) de ces neurones perturbe l'alternance gauche-droite des sorties motrices enregistrées pendant la locomotion fictive **(Figure 54C)** (Haque et al., 2018). L'ensemble de ces résultats indique que les interneurones dI6 constituent un composant essentiel du CPG locomoteur, en jouant un rôle dans plusieurs aspects du comportement moteur.

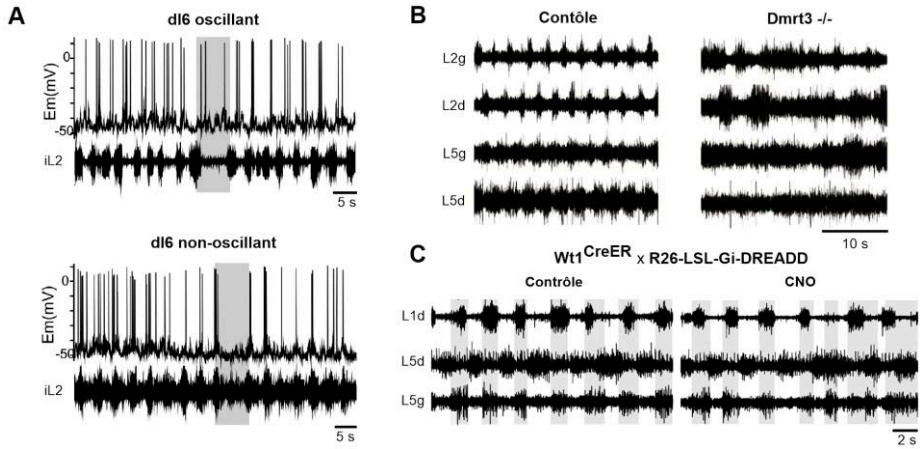


Figure 54 | L'élimination des interneurones dl6 perturbe l'alternance gauche-droite

(A) Activité de deux types d'interneurones dl6 pendant une activité de locomotion fictive (6 µM NMDA et 6 µM 5-HT), suivie par l'enregistrement extracellulaire de la racine ventrale L2 (ipsilatérale à l'interneurone enregistré), avant, pendant et après un épisode d'omission d'activité (rectangle gris ; Griener et al., 2017). **(B et C)** Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 et L5 (droite et/ou gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite pharmacologiquement sur des préparations de ME isolées de souris **(B)** contrôle et Dmrt3-/-, dans laquelle les interneurones Dmrt3 sont absents (6 µM NMDA et 6 µM 5-HT, Andersson et al., 2012), **(C)** ou avant et pendant l'inhibition chémogénétique des interneurones Wt1 par le CNO (5 µM NMDA et 5-15 µM 5-HT ; Haque et al., 2018).

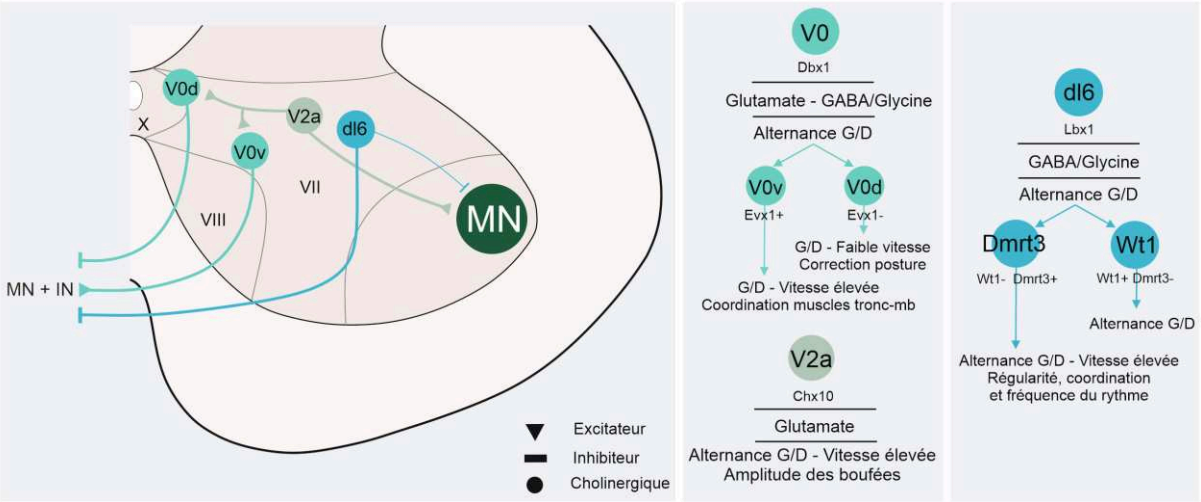


Figure 55 | Neurones présumés responsables de l'alternance gauche-droite

Synchronisation et symétrie des mouvements

Les comportements moteurs tels que la marche et la course chez les vertébrés nécessitent une coordination bilatérale entre les réseaux rythmiques situés dans chaque moitié de la ME. Si l'alternance gauche-droite est importante, certains mouvements doivent rester symétriques et synchronisés. Par exemple, à des vitesses de locomotion élevées, les animaux bondissent pour se déplacer, nécessitant une synchronisation des membres gauches et droits. Pour assurer une démarche stable, il est essentiel que l'activation des muscles extenseurs et fléchisseurs soit bien coordonnée, et que les commandes motrices envoyées aux muscles des membres de chaque côté du corps, soient équilibrées en termes d'amplitude et de durée.

Interneurones V3

Les interneurones V3 proviennent du domaine progéniteur p3 et expriment le facteur de transcription Single-minded homolog 1 (Sim1). Ils sont glutamatergiques et sont localisés dans les *laminae* IV, V, VII et VIII. Bien que la majorité de leurs axones projettent de manière controlatérale, il existe aussi des projections ipsilatérales et bilatérales. Ces neurones contactent des motoneurones ainsi que des interneurones ventraux impliqués dans la locomotion, comme les interneurones inhibiteurs Ia (Parvalbumine^{+}), les cellules de Renshaw (Calbindin-Parvalbumine^{+}) et les interneurones V2 (Lim3^{+}) (Y. Zhang et al., 2008).

Chez la souris, lorsque la transmission synaptique des interneurones V3 est spécifiquement bloquée, la stabilité, la régularité et la cohérence du rythme locomoteur sont fortement altérées. Chez certains mutants Sim1, des concentrations de 10 µM de 5-HT et 5 µM de NMDA, ne sont pas suffisantes pour induire une locomotion fictive stable. De plus, bien que l'alternance gauche-droite soit préservée, le rythme est irrégulier et la durée des décharges motrices des racines L2 varie considérablement. Enfin, tandis que les sorties motrices des deux côtés de la ME sont normalement symétriques en termes de durée, une asymétrie marquée est présente chez les souris mutantes **(Figure 56)**. *In vivo*, ces souris ont une démarche altérée avec une variabilité accrue dans le timing et la durée des phases d'appui et de transfert (Y. Zhang et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les interneurones V3 jouent un rôle mineur dans le maintien de l'alternance gauche-droite, mais sont essentiels pour assurer une décharge rythmique robuste et cohérente des motoneurones contrôlant les muscles fléchisseurs et extenseurs. Ils sont également indispensables pour établir un rythme locomoteur régulier et équilibré en répartissant l'excitation entre les deux hémi-moelles, assurant ainsi un modèle symétrique d'activité locomotrice pendant la marche.



Figure 56 | La suppression de la transmission synaptique des interneurones V3 induit un patron d'activité gauche-droit asymétrique

Enregistrements extracellulaires des racines ventrales L2 (droite et gauche) lors d'une activité de locomotion fictive induite par 5 µM de NMDA et 10 µM de 5-HT, sur une préparation de ME isolée de souris contrôle et de souris SimCre ; R26floxstop-TeNT, où la transmission synaptique des interneurones V3 est supprimée (Zhang et al., 2008).

Les interneurones V3 présentent une hétérogénéité dorso-ventrale dans la ME lombaire et sont divisés en sous-populations dorsale (V3d) et ventrale (V3v), et peuvent effectuer des connexions bilatérales. L'utilisation de la microscopie biphotonique pour libérer du glutamate encagé, a permis à Chopek et collaborateurs de cartographier des microcircuits ipsilatéraux récurrents entre les V3v médians, latéraux et les motoneurones. Ainsi, les V3v médians contactent les V3v latéraux, qui innervent ensuite les motoneurones ipsilatéraux locaux. Ces motoneurones forment à leur tour des connexions glutamatergiques sur ces deux populations d'interneurones, formant un microcircuit de rétrocontrôle positif. Ainsi, les interneurones V3v forment des structures en couches qui pourraient renforcer le traitement de l'information pour garantir la flexibilité dans la production de mouvements locomoteurs (Chopek et al., 2018) (cf section ci-dessous : Contrôle des sorties motrices).

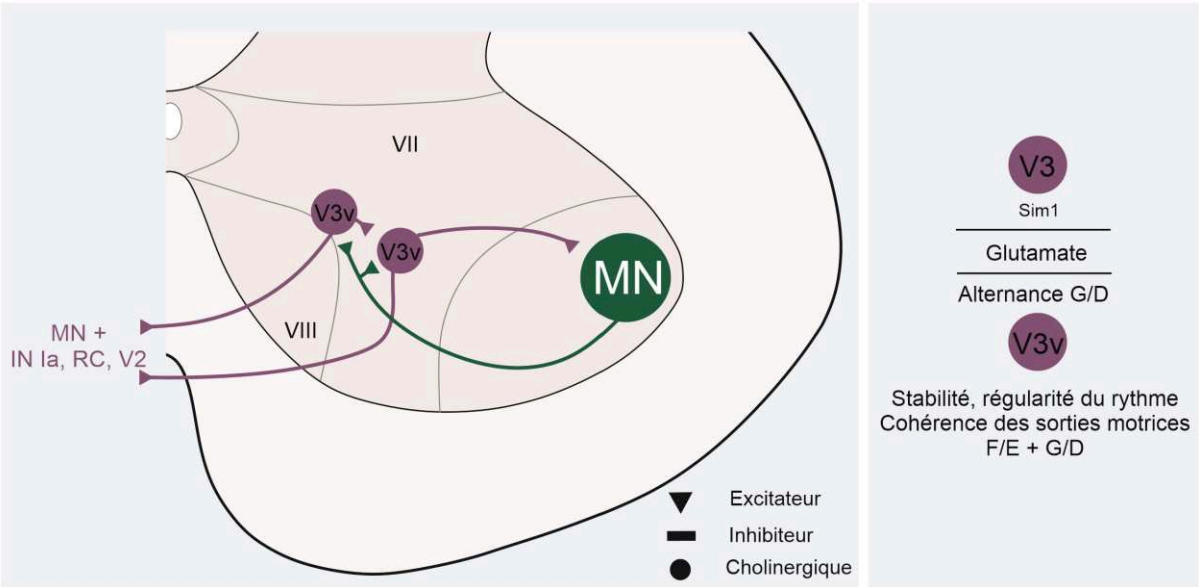


Figure 57 | Neurones présumés responsables de la synchronisation et de la symétrie des mouvements

Contrôle des sorties motrices

Le contrôle précis de l'amplitude des sorties motrices est essentiel, puisque les contractions musculaires doivent être adaptées aux exigences de chaque tâche motrice. Ces adaptations contexte-dépendantes de la locomotion, impliquent des modifications transitoires de la fréquence de décharge des motoneurones.

V0c et V0g

Les interneurones V0c constituent la sous-population la plus étudiée pour leur rôle dans la modulation de la fréquence de décharge des sorties motrices. Les interneurones cholinergiques V0c et glutamatergiques V0g, se situent dans les *laminae* VII et X autour du canal central et expriment de manière transitoire, le facteur de transcription Pitx2. En raison

de l'expression d'Evx1, ils sont classés parmi les interneurones ventraux V0v et représentent moins de 5 % de la population totale des interneurones V0. Au niveau lombaire, les V0c et les V0g sont distribués selon un gradient rostro-caudal : les V0c sont plus nombreux au niveau rostral, tandis que les V0g dominent au niveau caudal (Zagoraiou et al., 2009).

Les interneurones V0c, forment des connexions monosynaptiques ipsilatérales avec les motoneurones, caractérisées par de larges synapses, appelées c-boutons **(Figure 58A)** (Miles et al., 2007; Zagoraiou et al., 2009) et avec les V1 de type Ia (Siembab et al., 2010). Environ 30 % des V0c projettent également du côté controlatéral de la ME. Ces neurones reçoivent des connexions sérotoninergiques du tronc cérébral, ainsi que des connexions GABAergiques et glutamatergiques (boutons vGlut2$^+$ > vGut1$^+$) (Zagoraiou et al., 2009). Les interneurones V0c ont une activité rythmique pendant la locomotion fictive (Zagoraiou et al., 2009; Nascimento et al., 2020), grâce à des entrées excitatrices rythmiques provenant d'interneurones spinaux.

Chez des souris mutantes Pitx2-ChAT (Dbx1::Cre;ChAT$^{fl/fl}$), où la transmission cholinergique est altérée au niveau des c-boutons, les enregistrements électromyographiques (EMG) des muscles fléchisseurs et extenseurs de la cheville (*tibialis anterior* et *gastrocnemius,* respectivement), montrent une perturbation de l'amplitude des activités motrices pendant la nage. En effet, contrairement à la marche, la nage nécessite une force de contraction accrue des muscles extenseurs, se traduisant par une augmentation de l'activité EMG de ces muscles. Chez les souris mutantes Pitx2-ChAT, la transition de la marche à la nage, n'entraine plus d'augmentation de l'amplitude des décharges du *gastrocnémien* **(Figure 58B)** (Zagoraiou et al., 2009). Ainsi, les interneurones V0c modulent l'excitabilité des motoneurones, en ajustant l'amplitude de décharge des sorties motrices et donc la contraction musculaire en fonction des exigences comportementales (tâches nécessitant une activation musculaire plus intense). Quant aux interneurones V0g, leurs fonctions restent encore largement inexplorées.

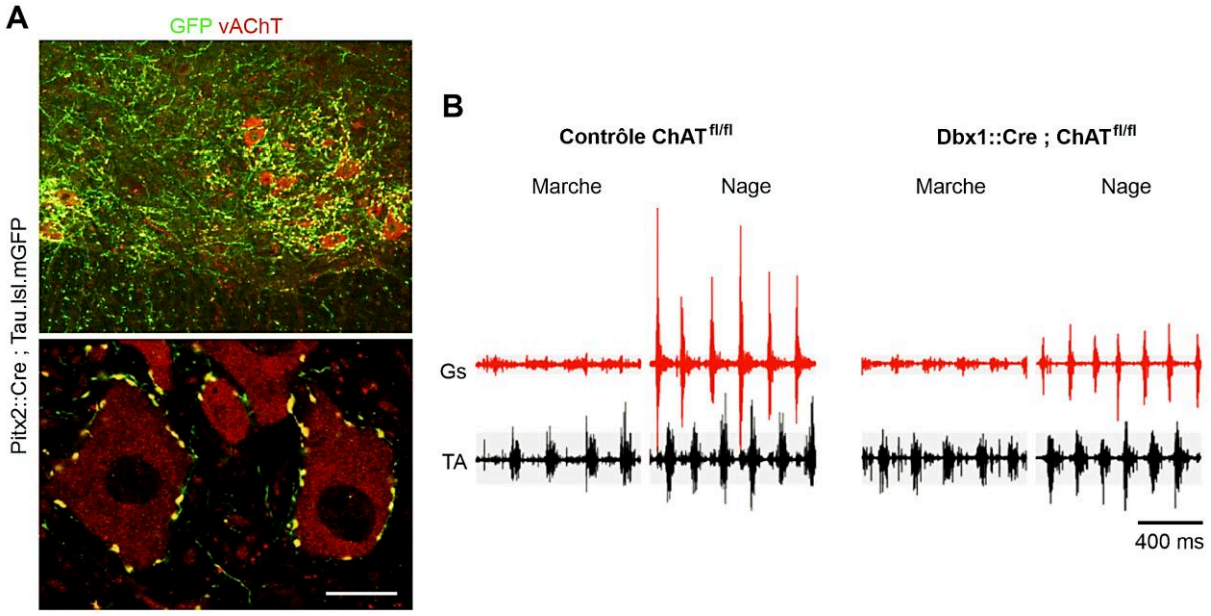


Figure 58 | Les interneurones V0c modulent les sorties motrices de façon tâche-dépendante

(A) Distribution des terminaisons synaptiques des interneurones V0c et V0g dans la ME lombaire de souris Pitx2::Cre;Tau.lsl.mGFP. Des terminaisons GFP$^+$ et vAChT$^+$ sont colocalisées au niveau des c-boutons autour des MN. **(B)** Enregistrements EMG du gastrocnémien (en rouge) et du tibias antérieur (en noir), pendant une activité de marche et de nage, chez une souris contrôle Chat$^{fl/fl}$ et chez une souris Dbx1::Cre ; ChAT$^{fl/fl}$, où la transmission synaptique cholinergique des interneurones V0c est éliminée (Zagoraiou et al., 2009).

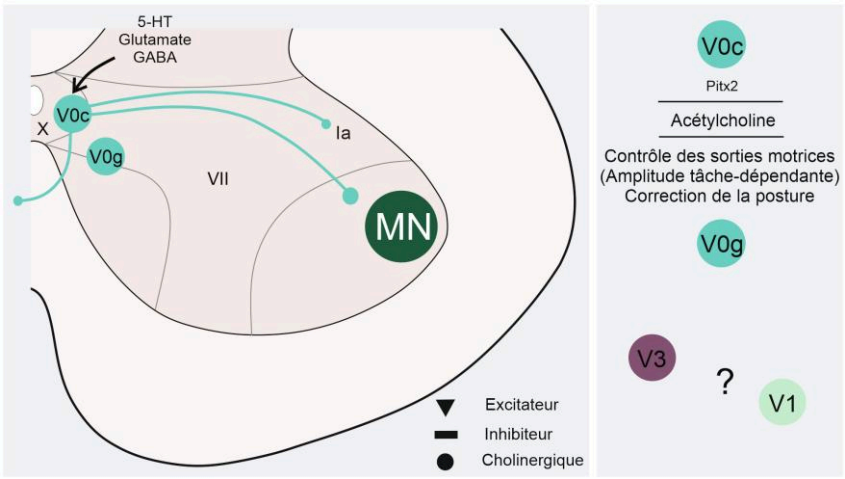
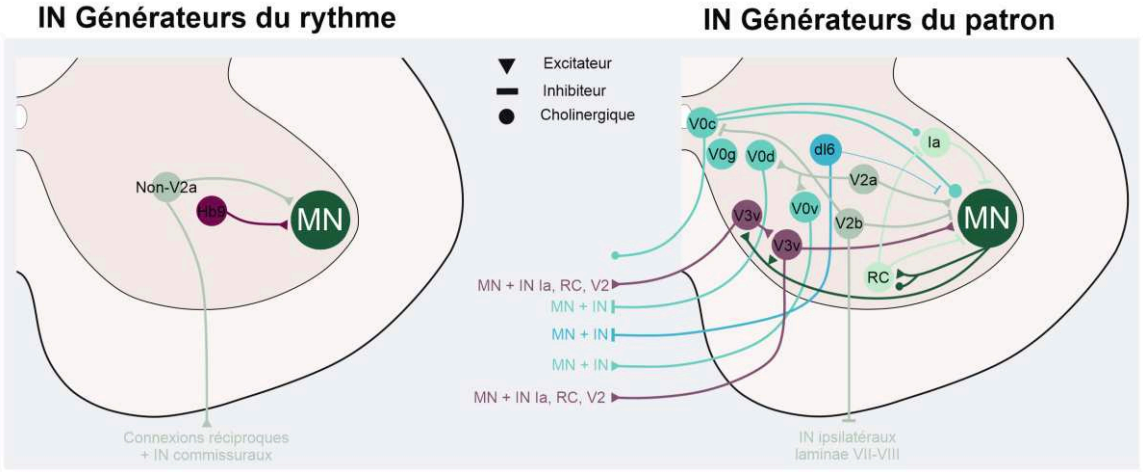


Figure 59 | Neurones présumés responsables du contrôle des sorties motrices



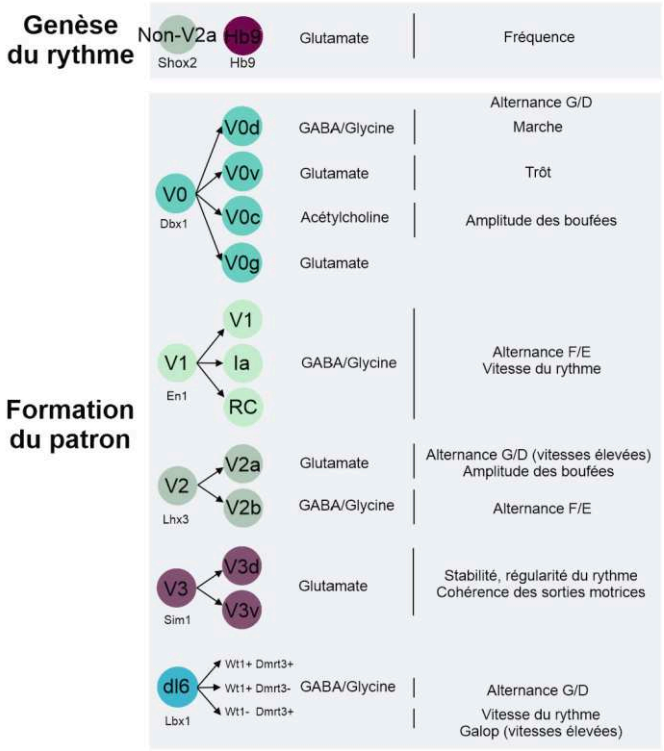


Figure 60| Schéma bilan de l'organisation du réseau spinal locomoteur
Les interneurones de la ME ventrale et leurs sous-types, organisés en circuits générateurs de rythme et de patron locomoteur

Les CPGs peuvent être modulés par les centres supraspinaux, par des interneurones locaux et par des boucles de rétrocontrôle sensorielles provenant de la périphérie, garantissant ainsi l'exécution des mouvements, le contrôle de leur précision, la correction de la position des membres le cas échéant et leur adaptation aux conditions extérieures (Kiehn, 2016 ; Grillner & El Manira, 2020).

4- Rôle des informations sensorielles dans la locomotion chez les vertébrés

Pour survivre, les animaux doivent s'adapter continuellement aux changements de leur environnement, ce qui rend les propriétés de détection et de réponses essentielles. La sensibilité et la plasticité du système sensorimoteur, permettent de faire face à des conditions environnementales en constante évolution (Arber & Costa, 2022).

Au niveau supraspinal, le traitement de l'information entre les ganglions de la base, le cervelet et le tronc cérébral, permet le contrôle du tonus musculaire et des mouvements rythmiques des membres, de façon automatique (Kiehn, 2016). Cependant, les tâches motrices fines et les mouvements coordonnés nécessitent des informations supplémentaires, provenant des rétrocontrôles sensoriel (Akay, 2020 ; Rossignol et al., 2006 ; Tuthill & Azim, 2018). Par exemple, face à un obstacle, l'ajustement de la démarche doit être intentionnelle, afin de guider correctement le mouvement des membres. Pour modifier la démarche, le CPG doit intégrer les informations des efférences provenant du cortex sensori-moteur, du tronc cérébral et du cervelet, ainsi que les informations des afférences sensorielles. Cette intégration permet ainsi d'ajuster la posture et les mouvements de manière rapide et précise, en réponse à des changements externes. Ces ajustements reposent sur des informations sensorielles issues de la périphérie, comme la température, la douleur, le toucher ou la proprioception. Les informations proprioceptives des muscles et de la peau, sont une des plus importantes afférences pour moduler la locomotion (Shadrach et al., 2021).

a) La proprioception

La proprioception, c'est-à-dire la perception de la position du corps et des membres, est assurée par les propriocepteurs (Sherrington, 1907 ; Proske & Gandevia, 2012). Ce sont des neurones mécanosensoriels spécialisés, qui transmettent des informations sur l'étirement et la tension subis par les muscles, les tendons et les articulations. Les informations transmises par les propriocepteurs contribuent aux sensations inconscientes et conscientes et sont nécessaires pour maintenir la posture et effectuer des mouvements coordonnés, comme lors de la marche (Akay et al., 2014).

Les neurones sensoriels propriocepteurs périphériques et leurs rôles

Chez les mammifères, le corps cellulaire des propriocepteurs est localisé dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG) et projettent vers la ME et vers la périphérie, où ils innervent deux récepteurs proprioceptifs, au niveau des muscles squelettiques et des tendons, appelés fuseaux musculaires et organes tendineux de Golgi. Les afférences des fuseaux musculaires innervent les fibres musculaires intrafusales et sont sensibles à l'étirement des muscles (changements de longueur), tandis que les afférences qui innervent les organes tendineux, à la jonction muscle-tendon, sont sensibles à la force de contraction musculaire (changements de tonus). Ainsi les propriocepteurs répondent aux déformations mécaniques de leurs terminaisons afférentes par l'émission de potentiels d'action (Moon et al., 2021).

Les fuseaux musculaires

Les fuseaux musculaires sont des organes proprioceptifs intramusculaires qui intègrent à la fois des composantes sensorielles et motrices. Ils informent le SNC sur des variations de longueur et de vitesse d'étirement des muscles. Chaque fuseau musculaire est composé de plusieurs fibres intrafusales, entourées par une gaine de collagène, appelée capsule externe. Il existe deux types de fibres intrafusales : les fibres du sac nucléaire, caractérisées par leur longueur et leur grand diamètre et les fibres de la chaîne nucléaire **(Figure 61A)** (Stifani, 2014). Ces fuseaux musculaires sont innervés par deux types de terminaisons sensorielles : une terminaison primaire, de la fibre afférente Ia, sensible aux changements dynamiques, augmentant leur fréquence de décharge en fonction de la vitesse d'étirement, et des terminaisons secondaires des fibres du groupe II, qui répondent aux stimuli statiques en codant la longueur d'étirement du muscle **(Figure 61B)**. En plus des neurones sensoriels proprioceptifs, les fuseaux musculaires sont également innervés par des motoneurones somatiques *alpha* (Moon et al., 2021). Ainsi, les afférences Ia du fuseau musculaire, font des connexions monosynaptiques avec, les motoneurones *alpha,* qui innervent les mêmes muscles et les muscles synergiques, tout en recrutant des interneurones qui inhibent les pools de motoneurones antagonistes (Tuthill & Azim, 2018).

Les organes tendineux de Golgi

Situés à la jonction entre les muscles et les tendons, les organes tendineux de Golgi sont composés de fibres de collagène autour desquelles s'enroulent des fibres afférentes de type Ib. Lorsque le muscle se contracte sous l'effet des motoneurones α, cette contraction étire l'organe tendineux de Golgi, ce qui entraîne la compression et l'étirement des terminaisons nerveuses, provoquant ainsi leur dépolarisation **(Figure 61C)** (Moon et al., 2021). Les afférences Ib établissent des connexions avec des interneurones dans la ME, qui inhibent les motoneurones *alpha* des mêmes muscles, tout en activant ceux des muscles antagonistes. Cette action est cruciale pour la régulation de la force musculaire et la prévention des lésions dues à une contraction excessive (Tuthill & Azim, 2018).

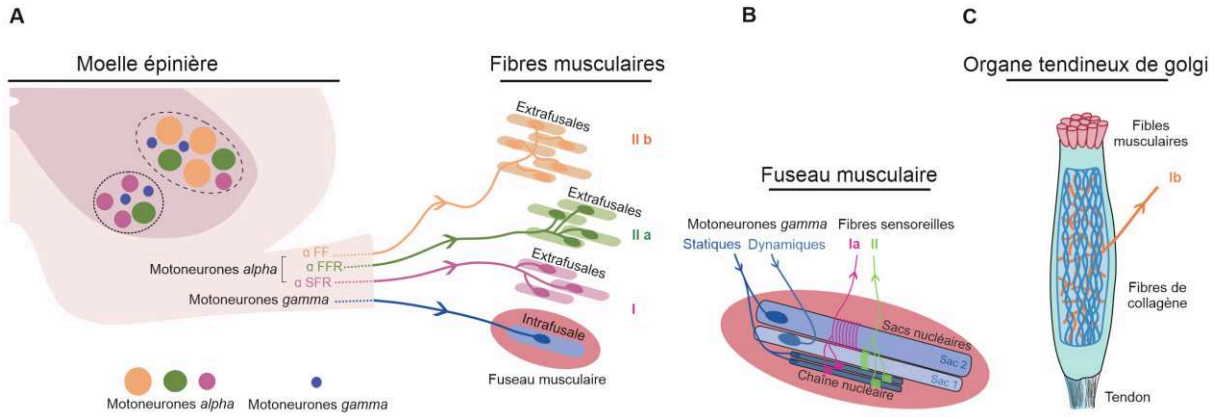


Figure 61| **Schéma des motoneurones, des fibres musculaires et des organes proprioceptifs**

(A) Représentation schématique des sous-types de motoneurones et les fibres musculaires qu'ils innervent. Dans la ME ventrale, les groupes de MNs (cercles pointillées) sont composés de MNs *gamma* (en bleu) et de trois types de MNs *alpha* : αFF (en orange), αFFR (en vert), αSFR (en rose). En périphérie, un muscle est composé de trois types de fibres extrafusales : les fibres musculaires fatigables à contraction rapide (en orange, IIb) sont innervées par des MNs αFF, les fibres musculaires résistantes à la fatigue à contraction rapide (en vert, IIa) sont innervées par des MN alpha αFFR et les fibres musculaires résistantes à la fatigue à contraction lente (en rose, I) sont innervées par des MN αSFR. Les fibres musculaires intrafusales (en bleu) sont exclusivement innervées par des MNs gamma (Adapté de Drouillas, 2022). **(B)** Représentation schématique d'un fuseau musculaire composé de plusieurs fibres intrafusales, entourées par une gaine de collagène, appelée capsule externe. Les deux types de fibres intrafusales : les fibres du sac nucléaire et celles de la chaîne nucléaire sont innervés par une terminaison primaire, de la fibre afférente Ia, et par des terminaisons secondaires des fibres du groupe II (Adapté de Stifani et al., 2014). **(C)** Schéma d'un organe tendineux de Golgi composés de fibres de collagène autour desquelles s'enroulent des fibres afférentes de type Ib.

b) Rôles des fuseaux musculaires et des organes tendineux de Golgi dans la locomotion

Des études chez la souris ont montré que l'ablation génétique des retours proprioceptifs provenant des fuseaux musculaires, perturbe le patron locomoteur. Lorsque les fuseaux musculaires sont défaillants, avec la mutation du gène *Egr3* (*early growth response 3*), l'activité des muscles fléchisseurs de la cheville est prolongée, un phénomène accentué pendant la nage, où le retour proprioceptif des organes tendineux de Golgi est moins impliqué, en raison de la réduction de la charge gravitationnelle. Ainsi, lors de la nage, les souris mutantes Egr3$^{-/-}$, présentent une coordination altérée des pattes arrière, avec une co-activation des muscles antagonistes **(Figure 62A)**. Les auteurs montrent également que les fuseaux musculaires sont essentiels pour les tâches motrices fines, telles que le test de l'échelle, nécessitant de la précision dans le placement des pattes, puisque les souris Egr3$^{-/-}$ montrent une augmentation des erreurs **(Figure 62B)**. Ces résultats soulignent l'importance de l'activité des fuseaux musculaires *via* les afférences sensorielles Ia et II, dans l'activité des muscles fléchisseurs de la cheville, qui permet d'assurer la bonne transition entre les phases de transfert et d'appui (Akay et al., 2014 ; Takeoka et al., 2014).

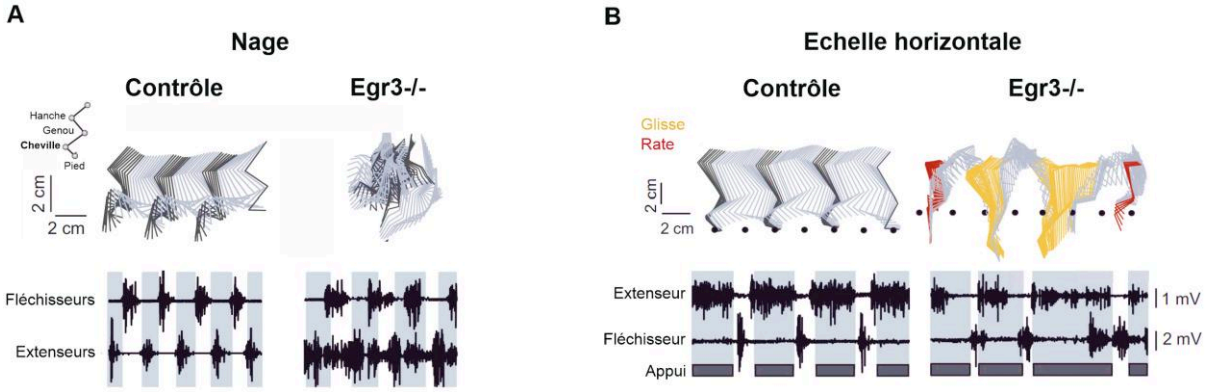


Figure 62 | Les retours des fuseaux musculaires sont essentiels pendant la nage et les comportements moteurs fins

Diagrammes en battons décomposant les mouvements de la patte arrière d'une souris contrôle et d'une souris mutante Egr3$^{-/-}$, où les fuseaux musculaires sont défaillants pendant la nage **(A)** et pendant le test de l'échelle horizontale (espace 2cm, barres grises : phase d'appui) **(B)**, accompagnés des enregistrements EMG respectifs, des muscles fléchisseurs et extenseurs de la cheville (Takeoka et al., 2014).

Par ailleurs, lorsque les activités des fuseaux musculaires et des organes tendineux de Golgi sont toutes les deux abolies, l'activation retardée et séquentielle des muscles fléchisseurs du genou et de la hanche est supprimée, suggérant que l'interaction entre ces deux organes proprioceptifs, est nécessaire pour coordonner les muscles fléchisseurs et extenseurs. Cette combinaison est essentielle pour maintenir une locomotion efficace, puisque les deux types de récepteurs fournissent des retours d'informations distincts mais redondants pour permettre la modulation de l'activité musculaire, et donc la transition entre les phases d'appui et de transfert (Akay et al., 2014). Le canal Piezo2 a été identifié comme étant le principal responsable de la réponse proprioceptive des fuseaux musculaires et des organes tendineux de Golgi. Ce canal cationique non-sélectif, mécanosensible, est fortement exprimé dans les terminaisons des neurones des DRG parvalbumine^{+} (PV : marqueur des neurones sensoriels proprioceptifs). Patapoutian et collaborateurs, montrent que les souris mutantes pour Piezo2 dans les neurones PV, présentent des anomalies de coordination motrice, notamment pendant la marche et lors du test de suspension par la queue, où ils observent une position atypique des membres. Ainsi, Piezo2 apparait comme mécanotransducteur principal des propriocepteurs, essentiel pour la fonction proprioceptive et la coordination motrice chez les mammifères (Woo et al., 2015).

c) *Autres propriocepteurs*

En plus des propriocepteurs contenus dans les muscles, il existe des propriocepteurs au niveau des articulations et des mécanorécepteurs au niveau de la peau. Les récepteurs articulaires sont activés aux extrémités des articulations et codent pour la vitesse et l'angle de la flexion des membres. Lorsque les articulations sont en rotation, les déformations de la peau, sont détectées par des mécanorécepteurs cutanés de quatre types : les corpuscules de Pacini, les terminaisons de Ruffini, les corpuscules de Meissner et les terminaisons de Merkel. Ces neurones sensoriels tactiles sont essentiels pour les tâches motrices telles que la préhension (Proske & Gandevia, 2012).

Bien que les propriocepteurs soient localisés à la périphérie du SNC, ils ont également été identifiés au niveau central dans la ME. Chez la lamproie, la région latérale de la ME contient des cellules sensibles à l'étirement, appelées « edge cells ». Elles peuvent être inhibitrices à projections controlatérales ou excitatrices ipsilatérales. Ce double système, activé par l'étirement, facilite l'alternance de phase entre les côtés gauche et droit pendant la nage. Ainsi, ces cellules, agissent comme des mécanorécepteurs intraspinaux, jouant un rôle essentiel dans la proprioception chez la lamproie (Grillner et al., 1984). Chez le poisson-zèbre adulte, Picton et collaborateurs ont découvert un organe proprioceptif au sein de la ME. Cet organe est formé par des élargissements latéraux des segments spinaux, présents à chaque région intervertébrale le long de la ME **(Figure 63A)**. Ils contiennent des neurones glycinergiques commissuraux, formés tardivement (2-3 semaines après la naissance), qui expriment le facteur de transcription Dbx1 **(Figure 63B)**. Ces cellules détectent les mouvements latéraux du corps *via* l'expression des canaux cationiques non sélectifs mécanosensibles, Piezo2 et établissent des connexions inhibitrices directes avec les interneurones V2a, qui régulent le rythme locomoteur. L'élimination spécifique de ces organes proprioceptifs perturbe la nage, en réduisant la fréquence des battements de la queue et en augmentant la variabilité de l'amplitude des mouvements de courbure (Picton et al., 2021).

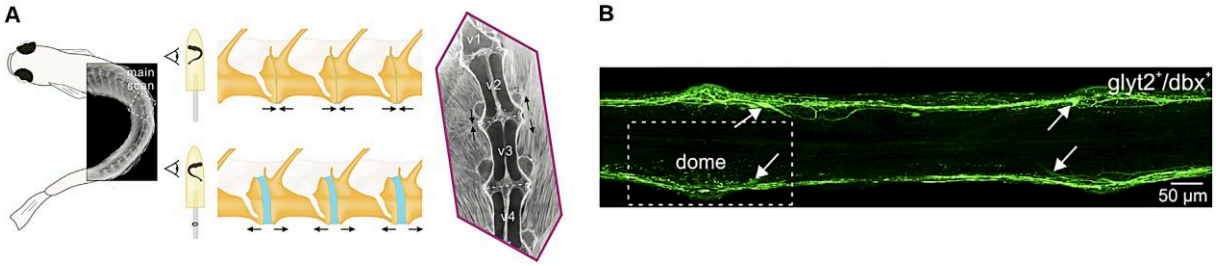


Figure 63 | Un organe proprioceptif intraspinal, sensible aux mouvements des vertèbres

(A) Représentation schématique de la région intervertébrale chez le poisson-zèbre adulte, montrant les disques intervertébral (en bleu) entre les vertèbres, entourant la ME (en blanc), lors d'une compression (en haut) ou d'un étirement des joints (en bas, flèches noires). Scanner montrant 4 régions intervertébrales (V1-4), lors de la torsion du poisson-zèbre : un côté compressé et un côté étiré (flèches noires). **(B)** Image confocale des dômes localisés à chaque région intervertébrale dans une ME de poisson-zèbre Tg(dbx1b:Cre), marquant en vert les neurones glyt2$^+$/dbx1$^+$ (flèche blanche)(Picton et al., 2021).

d) *Modulations sensorielles des sorties motrices en fonction du contexte*

Les informations sensorielles peuvent être générées soit par le mouvement actif des membres ou par la courbure du corps, soit lorsqu'un membre rencontre un obstacle au cours de la locomotion, modifiant ainsi les réponses motrices en fonction du contexte.

Afférences sensorielles musculaires : régulation de la transition de phase pendant le cycle du pas

Chez le chat décérébré, des recherches ont montré que la décharge des muscles de la patte et le positionnement de la hanche pourraient avoir un rôle dans la transition du cycle du pas, entre la phase d'appui et de transfert, c'est-à-dire, lorsque le poids est transféré vers les autres membres. Ces processus médiés par les récepteurs proprioceptifs des muscles et des tendons, favoriseraient la fin de l'activité d'extension et le début de la flexion (Pearson, 2004, 2008).

Pendant la phase d'appui, lorsque le pied est en contact avec le sol, le poids du corps est réparti sur plusieurs pattes. Les afférences Ib sensibles à la tension musculaire, détectée au niveau des organes tendineux de Golgi dans les muscles extenseurs de la cheville, inhibent le centre de commande des muscles fléchisseurs. Simultanément, l'étirement progressif de la hanche est détecté par les terminaisons des afférences sensorielles Ia au niveau des fuseaux musculaires, des muscles fléchisseurs de la hanche, augmentant ainsi l'excitation du centre fléchisseur. À la fin de cette phase, lorsque le poids du corps est transféré, l'inhibition du centre fléchisseur diminue, tout comme l'activation du centre extenseur.

Pendant la phase de transfert, lorsque la patte est en l'air et en flexion, les propriocepteurs des muscles extenseurs de la cheville et des muscles fléchisseurs de la hanche agissent en synergie pour réduire l'inhibition et augmenter l'excitation du générateur de rythme des muscles fléchisseurs, facilitant ainsi, la transition de la phase d'appui à la phase de transfert **(Figure 64A)** (Kiehn & Dougherty, 2013 ; Kiehn, 2016 ; Kriellaars et al., 1994).

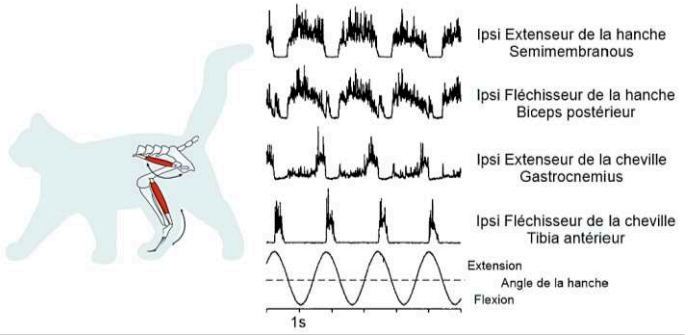


Figure 64| Rôle des informations sensorielles des muscles de la patte dans la transition du cycle du pas

Représentation schématique du système musculaire de la patte arrière d'un chat, accompagné de l'enregistrement EMG des muscles extenseurs et fléchisseurs de la hanche et de la cheville, lors du mouvement passif de la hanche chez un chat décérébré. La transition de la phase d'appui vers la phase de transfert commence lorsque la hanche est complètement étirée (Adapté de Kriellaars et al., 1994).

Afférences sensorielles musculaires : facilitation des processus de récupération post-lésionnels

Après une lésion partielle de la ME, les souris récupèrent certaines fonctions locomotrices au niveau du membre postérieur ipsilatéral à la lésion, grâce à une réorganisation des circuits supraspinaux et intraspinaux. Cette réorganisation repose sur la capacité des populations neuronales à établir de nouvelles connections vers les circuits ipsilatéraux en dessous de la lésion. De façon intéressante, Takeoka et collaborateurs montrent, que chez les souris mutantes Egr3, pour lesquelles, les fuseaux musculaires sont défaillants, la récupération et la réorganisation spontanées de ces phénomènes post-lésionnels, sont absentes. Cela souligne l'importance des afférences proprioceptives, source d'excitation du circuit spinal, non seulement dans le contrôle de la motricité fine, mais aussi dans la facilitation des processus de récupération post-lésionnels (Takeoka et al., 2014).

Afférences sensorielles cutanées

Les informations sensorielles générées lorsqu'un membre en mouvement rencontre un obstacle sont principalement des signaux cutanés, déclenchant ce qu'on appelle un réflexe cutané. La réponse qui en résulte varie en fonction du moment où le stimulus se produit dans le cycle locomoteur. Chez le chat par exemple, une stimulation mécanique (puff d'air) sur le dos de la patte, provoque un réflexe de correction au trébuchement. Si le stimulus apparait pendant la phase de transfert, la réponse au réflexe se traduit par l'activation des muscles fléchisseurs, permettant à la patte de se fléchir et d'éviter « l'obstacle ». En revanche, si le stimulus survient pendant la phase d'appui, il entraine une inhibition suivie d'une excitation des muscles extenseurs ; déjà activés, qui ne permettent pas de corriger le placement de la patte, évitant ainsi la perte d'équilibre de l'animal. Par contre, le stimulus provoque une augmentation de l'activité des muscles fléchisseurs dans la phase de transfert suivante (Forssberg, 1979).

Aussi les recherches menées par Bui et collaborateurs ont mis en évidence l'importance du retour sensoriel cutané dans les tâches motrices, comme la préhension et la locomotion, notamment à travers des interneurones dI3. Ces interneurones expriment le facteur de transcription Isl1 et sont localisés dans les *laminae* V, VI et VII des segments cervicaux et lombaires. Ce sont des interneurones glutamatergiques qui projettent vers les interneurones du CPG et les motoneurones. L'élimination de leur transmission synaptique chez la souris, entraine une perte de la force de préhension des membres antérieurs et postérieurs, observée lors du test de l'échelle horizontale (Bui et al., 2013). Après une transsection complète de la ME de ces animaux, la récupération fonctionnelle de la locomotion est altérée, suggérant que les interneurones dI3, et donc les afférences sensorielles cutanées, sont indispensables à la plasticité du système moteur (Bui et al., 2016).

e) Contrôle des signaux sensoriels

La précision des mouvements fins dépend non seulement, des retours sensoriels mais aussi de leur régulation par des circuit locaux inhibiteurs. Dans la ME, les informations proprioceptives et cutanées sont filtrées par des interneurones GABAergiques, qui exercent une inhibition présynaptique en réduisant la libération de glutamate sur les motoneurones. Ces interneurones, appelés GABApré, sont situés dans la corne dorsale de la ME et forment des synapses axo-axoniques inhibitrices avec les terminaisons des afférences sensorielles (Fink et al., 2014 ; Hari et al., 2022 ; J. Zhang et al., 2017). L'élimination de ces neurones par la toxine diphtérique, entraîne des déficits dans les mouvements de préhension, marqués par des oscillations incontrôlées des membres antérieurs. Ce mécanisme a pour fonction de stabiliser la dynamique sensorimotrice, permettant au SNC de réguler de façon flexible la libération de neurotransmetteurs des afférences sensorielles, sans affecter directement leurs cibles postsynaptiques, et ce, lors de divers comportements moteurs et différentes phases du cycle locomoteur (Fink et al., 2014).

OBJECTIFS

II - OBJECTIFS

Les neurones de contact du liquide cérébrospinal (Nc-LCS), forment une population neuronale unique, conservée chez tous les vertébrés. De par leurs caractéristiques anatomiques et fonctionnelles, les Nc-LCS forment un système sensoriel intrinsèque à la moelle épinière, capable de moduler l'activité locomotrice chez les vertébrés aquatiques. Jusqu'à récemment, peu d'informations existaient concernant leur implication dans le réseau moteur spinal chez les mammifères. Chez les vertébrés, les Nc-LCS spinaux partagent des caractéristiques communes, telles que leur position stratégique à l'interface entre le LCS et le parenchyme, leur morphologie particulière, la présence de cils, leur phénotype GABAergique, ainsi que l'expression du canal PKD2L1, qui leur confère des propriétés mécano- et chémosensibles. Compte tenu de ces similitudes, nous avons émis l'hypothèse que les Nc-LCS spinaux pourraient jouer un rôle central dans la modulation de l'activité motrice chez la souris.

Récemment, en collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri, nous avons montré pour la première fois chez la souris, l'implication des Nc-LCS dans l'habileté motrice et la posture (Gerstmann et al., 2022). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Nakamura et collaborateurs (2023), qui indique un rôle des Nc-LCS dans l'adaptation fréquence-dépendante de l'activité locomotrice. Ainsi, il semblerait que les Nc-LCS pourraient, comme chez le poisson-zèbre, constituer un système sensoriel, capable de détecter et de transmettre des informations intéro- et extéroceptives, voire proprioceptives et de moduler en conséquence le comportement locomoteur chez les animaux quadrupèdes.

L'objectif principal de ce projet de thèse, est de déterminer si les Nc-LCS sont des neuromodulateurs de l'activité motrice spinale chez les mammifères. Pour répondre à cette question, mon projet de recherche s'articule autour de 4 objectifs :

1- Caractériser les propriétés cellulaires des Nc-LCS lombaires

Afin de déterminer si les Nc-LCS lombaires modulent l'activité motrice spinale, il est essentiel d'étudier leurs propriétés intrinsèques. En effet, pour s'intégrer à un circuit, les neurones doivent disposer de la machinerie nécessaire à la réception, à la transmission et à la modulation des informations. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques combinés à des approches pharmacologiques, nous avons recherché l'expression fonctionnelle de canaux voltage-dépendants, de récepteurs ionotropiques et métabotropiques.

2- Elucider leur connectivité fonctionnelle et leur intégration dans le réseau lombaire

Pour vérifier si les Nc-LCS sont des modulateurs de l'activité motrice spinale, nous avons étudié leur intégration au sein du réseau d'interneurones du segment lombaire. Sur le plan anatomique, nous avons ciblé spécifiquement les Nc-LCS par des injections intracérébroventriculaires d'AAV, chez des souris transgéniques permettant d'identifier les populations neuronales selon leur phénotype. Sur le plan fonctionnel, nous avons étudié leurs connectivités pré- et postsynaptiques par l'approche de ChR2-Assisted Circuit Mapping (CRACM), qui permet par des stimulations optogénétiques, de cartographier les connexions entre un Nc-LCS $ChR2^+$ présynaptique et leurs partenaires postsynaptiques.

3- Identifier les partenaires postsynaptiques des Nc-LCS au niveau lombaire

Après avoir étudié la connectivité des Nc-LCS dans le segment lombaire, nous avons cherché à savoir s'ils étaient intégrés au réseau moteur spinal. Pour identifier leurs partenaires postsynaptiques, nous avons utilisé la technique de RT-PCR sur cellule unique. L'analyse de l'expression de certains facteurs de transcription a permis d'identifier les interneurones connectés aux Nc-LCS.

4- Déterminer la modulation de la neurotransmission GABAergiques par les RCPG

Enfin, nous avons étudié si la neurotransmission des Nc-LCS pouvait être modulée par des récepteurs métabotropiques, en analysant la localisation pré- ou postsynaptique de ce mécanisme.

Cette étude mettra en évidence pour la première fois chez les mammifères, la connectivité des Nc-LCS au sein du système moteur et leur potentiel rôle dans la modulation de l'activité motrice lombaire. L'objectif final étant de comprendre comment ces neurones pourraient contribuer à façonner le comportement moteur en intégrant et en propageant les informations sensorielles le long de la moelle épinière. Malgré la complexité et la redondance des réseaux neuronaux, il s'agira de relier l'identité et la densité des connections pré- et postsynaptiques aux déficits comportementaux observés dans les études de Gerstmann et Nakamura et collaborateurs (Gerstmann et al., 2022 ; Nakamura et al., 2023), et de déterminer si des similitudes existent dans la connectivité des Nc-LCS avec celle observée chez le poisson-zèbre.

MATERIEL & METHODES

III - Matériel et méthodes

1- Expérimentation animale et éthique

Les expériences décrites par la suite ont été menées en conformité avec la règlementation en vigueur fixée par la Directive du Conseil de l'Union Européenne (2010/63/UE) et la « Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône » (DDPP13) ; Licence de Projets Nr: APAFIS 44331,2023071917567777 & 33336, 2021101819022439 et Licence OGM pour animaux transgénique et agents viraux Nr: DUO-5214 et 6483, respectivement. Les protocoles utilisés sont en accord avec les règles fixées par le Comité d'Ethique de Marseille, le Comité Local pour la Protection des Animaux et la Recherche. Les animaux ont été hébergés au sein de l'animalerie du laboratoire, sous un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture, dans un environnement enrichi. La température a été maintenue constante à 21°C avec un taux d'humidité entre 40 et 60 %. Toutes les précautions ont été prises pour minimiser le nombre d'animaux utilisé et le stress des animaux pendant l'hébergement, les chirurgies et avant les expériences.

2- Modèles expérimentaux

Des souris issues de la souche sauvage C57Bl6/J (Charles River) et transgéniques PKD2L1-Cre (Pkd2l1^{tm1}(cre) ; Ye et al., 2015), venus-vGAT (visualisation sélective des neurones GABAergiques ; Wang et al. 2009), Choline Acétyl Transferase-Cre (ChAT-Cre : manipulation sélective des neurones cholinergiques ; Chat$^{tm2(cre)Lowl}$) ont été utilisées. Les modèles transgéniques expérimentaux ont été généré par croisement (technologie Cre-Lox) pour exprimer dans les neurones d'intérêts la protéine fluorescente cytosolique tdTomato (*flex*-tdTomato, Gt(ROSA)$^{26Sortm14\ (CAG-tdTomato)Hze}$) ou l'opsine activatrice ChannelRhodopsine 2 (*flex*-ChR2, B6.129S-Gt(ROSA)26Sor $^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze}$/J). L'ensemble des animaux transgéniques proviennent du Laboratoire Jackson. Pour les analyses anatomiques, les animaux ont été générés par infection virale (cf ci-dessous, Matériel et Méthodes, Section 5). Les expériences présentées ont été réalisées sur des animaux des deux sexes entre 2 et 6 semaines pour la caractérisation cellulaire et l'étude de la connectivité pré- et postsynaptique des Nc-LCS, et entre 3 et 5 semaines (+3) pour l'anatomie.

Tableau 1| Modèles transgéniques des animaux utilisés

Modèles	Acronyme
Pkd2l1^{tm1}(cre) x *flex*-tdTomato, Gt(ROSA)$^{26Sortm14\ (CAG-tdTomato)Hze}$	PKD2L1-tdTomato
Pkd2l1^{tm1}(cre) x *flex*-ChR2, B6.129S-Gt(ROSA)26Sor $^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze}$/J	PKD2L1-ChR2
venus-vGAT	vGAT-venus
Chat$^{tm2(cre)Lowl}$ x *flex*-tdTomato, Gt(ROSA)$^{26Sortm14\ (CAG-tdTomato)Hze}$	ChAT-tdTomato

3- Préparation des tranches aigues de moelle épinière

Préalablement à toute expérience, les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale de Meloxicam à 5 mg/kg, 30 minutes avant d'être anesthésiés avec un mélange de xylazine à 15 mg/kg (Rompun Bayer) et de kétamine à 100 mg/kg (Virbac). Une injection locale sous-cutanée de Lurocaïne à 5 mg/kg (Vetoquinol) est réalisée autour de la zone d'incision au niveau de la cage thoracique. Les souris sont perfusées par une injection intracardiaque d'aCSF de coupe à bas Ca^{2+}/haut Mg^{2+}, oxygénée à 0-4°C, **(Tableau 2)** avant d'être décapitées. Après une laminectomie sous une loupe binoculaire, les méninges sont retirées et la partie lombaire est isolée. Le segment lombaire est ensuite positionné dans une gouttière, formée dans un

bloc d'agarose à 4 %. Le bloc est ensuite collé sur une plateforme de coupe pour réaliser des tranches coronales comprises entre 250-300 µm d'épaisseur, à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S). Les tranches sont collectées dans une chambre de récupération contenant de l'aCSF d'enregistrement **(Tableau 2)**, oxygéné (O_2/CO_2 : 95/5%) et maintenu à 35°C dans un bain-marie pendant 15-20 minutes. Après la phase de récupération, la chambre est maintenue à température ambiante et les tranches transférées une à une, après au moins 1 heure de récupération, dans la chambre d'enregistrement pour réaliser les enregistrements électrophysiologiques.

4- Enregistrements électrophysiologiques

Les tranches sont transférées dans la chambre d'enregistrement, positionnée sur la platine d'un microscope droit (Zeiss Axioskop FS). La tranche est maintenue en place à l'aide d'une harpe en platine et perfusée en continue avec de l'aCSF d'enregistrement oxygéné à température ambiante (débit 2,5 à 3 $mL.min^{-1}$). La tranche est éclairée en lumière infrarouge (IR) et observée à l'aide d'un objectif à immersion à eau (x63), en contraste interférentiel (IR-DIC). Les cellules sont visualisées par épifluorescence à l'aide d'un système LED pUltra300 (PrecisExcite, CooLED, Roper ; excitation à 490 nm : YFP ou GFP et 590 nm : tdTomato). Les images sont réalisées à l'aide d'une caméra CCD CoolSnap HQ2 (Photometrics), connectée par une carte d'acquisition numérique (carte d'interface CoolSnap LVDS, Photometrics) à l'ordinateur et pilotée par le logiciel MetaVue (Molecular Devices Inc).

Les enregistrements électrophysiologiques de patch-clamp ont été réalisés en configuration cellule-entière et en mode courant- et voltage-imposé à l'aide de l'amplificateur multiclamp 700B (Molecular Devices Inc). Les signaux sont filtrés (2,4 kHz), numérisés (de 10 à 20 kHz ; digidata 1320A, Molecular Devices Inc) et traités à l'aide du logiciel pCLAMP 11 (Molecular Devices Inc). L'électrode d'enregistrement est amenée à la cellule à l'aide d'un micromanipulateur motorisé (Luigs & Neumann SM-5). Pour réaliser les électrodes d'enregistrement (3-6 MΩ) des capillaires en verre de borosilicate épais (OD : 1,5 mm, ID : 0,86 mm ; Harvard Apparatus) sont étirées en deux temps à l'aide d'une étireuse verticale PC100 (Narishige International Ltd). En fonction des expériences menées, des solutions intracellulaires d'enregistrement spécifiques ont été utilisées (cf Tableau 3). Les solutions sont filtrées (pore 0,22 µM) et maintenues au frais pendant l'expérimentation. De l'AlexaFluor 594 (10 µM, ex. 590 nm/em. 617 nm) ou 488 (10 µM, ex. 496 nm/em. 520 nm) (Invitrogene) a été ajouté à la solution intracellulaire pour visualiser la morphologie de la cellule enregistrée. Les résistances d'accès ou séries (10 à 20 MΩ) ont été contrôlées au cours de chaque expérience et les enregistrements avec une augmentation de plus de 25 % de la valeur initiale, n'ont pas été pris en compte. Pour les enregistrements en potentiel imposé, les résistances d'accès ont été compensées à 70-80 % et le potentiel de jonction n'a pas été corrigé. L'enregistrement de Nc-LCS a été confirmé par l'observation de leur morphologie caractéristique (un soma de petite taille, plus ou moins enchâssé dans la couche de cellules épendymaires du canal central, projetant une large dendrite qui se termine par une protrusion au contact du LCS) en épifluorescence (tdTomato, ChR2 ou Alexa 488/594 hydrazide). La présence de courants spontanés du canal PKD2L1, a également été utilisée comme contrôle.

a) Solutions

Tableau 2 | Solutions extracellulaires d'aCSF

Composition (mM)	aCSF d'enregistrement	aCSF de coupe
NaCl	75	75
NaH_2PO_4	1,25	1,25
$NaHCO_3$	26	33
KCl	3	3
$CaCl_2$	2	0,5
$MgCl_2$	2	7
Glucose	15	15
Acide ascorbique	2	2
Sucrose	/	58
Na-pyruvate	2	2
Myo-inositol	3	3
pH	7,3–7,4	
Osmolarité	300-310 mosmol.kg^{-1}	

Tableau 3 | Solutions intracellulaires

Composition	KCl Chlorure de Potassium	KGlu Potassium-gluconate	CsAc Acétate de césium	CsAc-TEA Tétraéthyl d'ammonium
KCl	130	3	/	/
K-gluconate	/	120	/	/
NaCl	10	5	5	5
CsCl	/	/	3	3
CsAc	/	/	120	100
TEA-Cl	/	/	/	20
$MgCl_2$	2	1	1	1
$CaCl_2$	1	1	1	0.5
EGTA	5	2	10	/
BAPTA	/	/	/	10
HEPES	10			
Phosphocreatine	10			
Mg-ATP	4			
GTP-Na_2	0.2			
pH	pH 7,65	pH 7,35	pH 7,34	pH 7,35
Osmolarité	≈295 mOsmol.Kg^{-1}			

Tableau 4 | Potentiels d'équilibre des ions Na^+, K^+, Cl^- et $Ca2^+$ des solutions intracellulaires

Potentiels d'équilibre (mV) [20-25°C]	KCl Chlorure de Potassium	KGlu Potassium-gluconate	CsAc Acétate de césium	CsAc-TEA Tétraéthyl d'ammonium
E_{Na}	+69	+46	+44	+46
E_K	-97	-94	/	/
E_{Cl}	+5	-65	-59	-64
E_{Ca}	+159	+62	+107	+65

b) *Enregistrement des propriétés passives et des patrons de décharge des Nc-LCS et des interneurones*

Les propriétés intrinsèques (résistance membranaire r_m, constante de temps τ, capacité membranaire c_m), ont été déterminées en mode potentiel imposé (VC), par un saut de potentiel (V_{Step}) de -10 mV (10 ms), à partir d'un potentiel de maintien V_h de -70 mV pour les Nc-LCS et de -90 mV pour les interneurones (IN). Le potentiel de repos membranaire (RMP) a été déterminé en mode courant-imposé (CC), sans injection de courant (mode CC, I=0).

Le patron de décharge a été obtenu en réalisant un protocole d'injection de courant par créneau (Nc-LCS : I_{Step} de -20 pA, 500 ms, Δ10 pA ; IN : I_{Step} de -90 pA, 500 ms, Δ10 pA) en mode CC, à partir de RMP ou à un V_m de -60 mV (injection de courant allant de -10 à -15 pA) pour les Nc-LCS et à partir de la RMP pour les interneurones.

c) *Caractérisation cellulaire des Nc-LCS lombaires*

Pour tenir compte d'une potentielle différence d'expression de canaux ioniques ou de récepteurs en fonction de la taille cellulaire, les amplitudes de courants sont exprimées en densité de courant (I/C_m ; $pA.pF^{-1}$).

Caractérisation des canaux voltage-dépendants

L'expression dans les Nc-LCS de canaux sodiques (Na^+ ; Na_v), potassiques (K^+ ; K_v) et calciques (Ca^{2+} ; Ca_v) voltage-dépendants, a été déterminée en mode potentiel imposé et les conductances ioniques spécifiques ont été pharmacologiquement isolées, en modifiant de manière appropriée la composition de l'aCSF et en utilisant une solution intracellulaire spécifique **(Tableau 3)**. Les courants sodiques, potassiques et calciques voltage-dépendants ont été enregistrés à partir d'un V_h à -80 mV ou -60 mV et induits à l'aide de protocoles spécifiques pour activer les différentes conductances ioniques.

Les canaux sodiques voltage-dépendants ont été activés à partir d'un V_h de -80 mV, à l'aide de V_{Step} de -80 jusqu'à +60 mV (100 ms, Δ10 mV). Les canaux potassiques ont été recrutés à un V_h de -80 mV avec un « pré-saut » à -100 mV (50 ms), pour s'assurer la réactivation complète de l'ensemble des canaux, suivi par un V_{Step} allant de -100 mV à +60 mV (100 ms, Δ10 mV), avant de revenir à -80 mV. Afin d'activer les courants calciques, les Nc-LCS ont été enregistrés soit, avec un protocole de sauts de potentiels, à partir d'un V_h de -60 mV (V_{Step}, -40 mV à +30 mV, 100 ms, Δ10 mV), soit à parti d'un V_h de -60 mV et -80 mV, avec un protocole de rampe (V_h -60 mV : rampe de -60 à +30 mV, 50 ms et 1.8 mV/ms ; V_h -80 mV : pré-saut à -120 mV, 50 ms suivi d'une rampe de -120 à +30 mV, 100 ms et 1.5 mV/ms). A la fin de chaque enregistrement, les conductances étudiées ont été bloquées à l'aide de bloqueurs spécifiques pour confirmer leurs natures.

Caractérisation des récepteurs ionotropiques

Pour déterminer l'expression fonctionnelle de récepteurs synaptiques ionotropiques GABAergiques (R-$GABA_A$), glycinergiques (R-Gly), glutamatergiques (R-Glu) et cholinergiques nicotiniques (R-nACh), les Nc-LCS lombaires ont été enregistrés à un V_h de -80 mV et des agonistes spécifiques ont été appliqués par pression à l'aide d'une pipette de patch (Ø 1 µm), positionnée à 50 µm de la cellule enregistrée et connectée à un système d'application par pression (Toohey Company, Picospritzer). Des solutions d'acide-γ-aminobutyrique (GABA, 1 mM, 30 ms), de glycine (Gly, 1 mM, 100 ms), d'acétylcholine (ACh, 4 mM, 500 ms) et de Glutamate (Glu, 100 µM, 500 ms) ont été appliquées. Pour identifier les sous-types de récepteurs ionotropiques glutamatergiques exprimés par les Nc-LCS, de l'acide amino-méthyl phosphorique (AMPA), du Kainate et de l'acide N-methyl-D-aspartique (NMDA) (100 µM, 30 ms) ont été appliqués. L'application par pression d'ATP-γ-S et de sérotonine (1 mM, 100-500

ms), n'a pas permis de mettre en évidence la présence de récepteurs ionotropiques purinergiques et sérotoninergiques respectivement. Les enregistrements ont été réalisés en présence d'un cocktail d'antagonistes ajouté à la solution d'aCSF d'enregistrement et appliqué par bain, afin de cibler spécifiquement un type de récepteur ionotropique. Dans le but de confirmer la nature du récepteur ionotropique étudié, les agonistes ont été appliqués en présence d'antagonistes spécifiques appliqués par bain.

Tableau 5 | Solutions intracellulaires, extracellulaires et bloqueurs

Expériences	Solutions intracellulaires	Solutions extracellulaires	Bloqueurs
Na_v	CsAc-TEA	aCSF - $CaCl_2$ + 4 mM $MgCl_2$ + 20 mM TEA	0,5 µM TTX (puff)
K_v	KGlu	aCSF - $CaCl_2$ + 4 mM $MgCl_2$ + 0,5 µM TTX	20 mM TEA (bain) 4 µM 4-AP (puff)
Ca_v	KGlu	aCSF + 0,5 µM TTX + 20 mM TEA	200 µM Cadmium (bain et/ou puff)
R-$GABA_A$	KCl	aCSF + 0,5 µM TTX + 20 mM TEA + 1 µM strychnine + 20 µM DNQX	10 µM Gz (bain)
R-Gly	KCl	aCSF + 0,5 µM TTX + 10 µM Gz + 20 µM DNQX	1 µM strychnine (bain)
R-Glu	KCl	aCSF + 0,5 µM TTX + 10 µM Gz + 1 µM strychnine	400 µM DNQX (bain)
R-Ach	KGlu (CC) CsAc (VC)	VC : aCSF + 0,5 µM TTX + 10 µM Gz + 20 µM DNQX + 100 µM Picro. + 10 µM Atropine CC : aCSF + 10 µM Atropine	100 µM D-tubocurarine (bain)
R-ATP-γ-S	KCl	aCSF + 0,5µM TTX	/
R-mAch	CsAc-TEA	aCSF + 0,5 µM TTX + 20 mM TEA	10 µM Atropine (bain)
R-$GABA_B$	CsAc-TEA	aCSF + 0,5 µM TTX + 20 mM TEA + 1 µM strychnine + 20 µM DNQX + 10 µM Gz	2 µM CGP (bain)

Modulation des canaux Ca_v par les protéines couplées aux protéines G

Pour déterminer si les canaux Ca_v postsynaptiques sont modulés par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), les Nc-LCS ont été enregistrés en mode potentiel-imposé avec une solution intracellulaire spécifique. Les tranches ont été perfusées avec de l'aCSF d'enregistrement supplémenté avec 0,5 µM de tétrodotoxine (TTX), et 20 mM de chlorure de tétraethyl-amonium (TEA), pour isoler spécifiquement les courants calciques. Ces courants ont été induits à partir d'un V_h de -80 mV avec un pré- saut à -120 mV (50 ms), suivi d'un V_{Step} à +10 mV. Les courants ont été enregistrés toutes les 20 secondes pendant 5 minutes, avant (contrôle), pendant (agoniste) et après (wash). Les agonistes spécifiques des RCPGs testés ont été appliqués par pression : baclofène (Bcl : 100 µM, 40 s) pour les récepteurs $GABA_B$ (R-$GABA_B$), oxotrémorine-M (oxo-M ; 100 µM, 50 s) ou acétylcholine (ACh : 1 mM, 40 s) pour les récepteurs cholinergiques muscariniques (R-mACh). L'étude de la modulation des courants calciques voltage-dépendants par les récepteurs métabotropiques au glutamate (R-mGlu), avec l'application de glutamate par pression (Glu : 100 µM ou 1 mM, 50 s), n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'une telle modulation.

d) Etude de la connectivité fonctionnelle des Nc-LCS par optogénétique

Pour étudier la connectivité fonctionnelle des Nc-LCS, des souris âgées entre 2 et 6 semaines ont été utilisées et l'approche optogénétique de ChannelRhodopsine-2 Assisted Circuit Mapping (CRACM) a été implémentée (Petreanu et al., 2009). Cette approche permet de cartographier les connexions entre un Nc-LCS et ses terminaisons $ChR2^+$, et un neurone

postsynaptique. Le neurone cible (Nc-LCS ou interneurone) a été enregistré en patch-clamp configuration cellule-entière. L'expression spécifique de la ChannelRhodopsine-2 fusionnée à l'YFP dans les Nc-LCS a été obtenue par croisement de souris PKD2L1-Cre avec des souris soit *flex*-ChR2 (PKD2L1-ChR2), soit *flex*-ChR2 et *flex-tdTomato* (PKD2L1-ChR2-tdTomato). Ainsi, les Nc-LCS ont pu être visualisés grâce à l'expression de l'EYFP fusionnée avec la ChannelRhodopsine-2 (ChR2-EYFP) et/ou avec l'expression de la tdTomato **(Tableau 1)**. Cette étude a été menée pour démontrer la connectivité entre Nc-LCS (projection présynaptique) et vers les interneurones spinaux (connectivité postsynaptique). Les neurones ont été identifiés sous illumination DIC infrarouge (IR-DIC) ou par épifluorescence (YFP et/ou tdTomato) et enregistrés en patch-clamp configuration cellule-entière en mode potentiel- (VC) et courant-imposé (CC). La libération de GABA par les terminaisons synaptiques des Nc-LCS a été photo-évoquée par l'activation de la ChR2 à l'aide de stimulations lumineuses délivrées à travers l'objectif (60x, NA 0.9). L'excitation de la ChR2 a été induite par une lumière d'excitation de 490 nm délivrée à une puissance de 5 $mW.mm^{-2}$ (pUltra 300, PreciseExcite CoolLED) et sur une durée contrôlée par pClamp (pulse TTL). Dans tous les enregistrements, le potentiel de jonction n'a pas été corrigé.

Connectivité présynaptique des Nc-LCS lombaires

La connectivité entre Nc-LCS a été étudiée à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques conduits avec la solution intracellulaire K-gluconate **(Tableaux 3 et 4)** avec un potentiel d'inversion du courant GABAergique (majoritairement porté par les ions chlorure) de ≈-60 mV ($V_{Rev\text{-}GABA}$). La validation de l'approche optogénétique (CRACM) pour s'assurer de l'expression fonctionnelle de la ChR2, a été réalisée en enregistrant des Nc-LCS exprimant la ChR2 en mode VC (présence de photo-courants) et CC (capacité de générer des potentiels d'action ; cf aussi Gerstman et al. 2022). En mode VC, les Nc-LCS ont été enregistrés à V_h -70 mV pour caractériser les propriétés du photo-courant porté par la ChR2, sa voltage-dépendance (V_{Step} de -90 à +10 mV, ΔV : +10 mV, 200 ms à V_h -70 mV) et déterminer le potentiel d'inversion ($V_{Rev\text{-}ChR2}$) du photo-courant (Courant nul à $V_{Rev\text{-}ChR2}$). En mode CC, les Nc-LCS ont été enregistrés au RMP et des pulses de lumière ont été délivrés pour confirmer la génération lumière-dépendante de potentiels d'action (PA). La spécificité de cette technique a été contrôlée en enregistrant des Nc-LCS ($CHR2^-$) dans des tranches de moelle épinière lombaire préparées à partir d'animaux sauvages (C57Bl6/J) pour lesquels les pulses de lumière ne généraient ni photo-courants (VC) ni décharge de PA (CC).

Pour s'affranchir des photo-courants présents dans les Nc-LCS enregistrés, les courants synaptiques ont été photo-évoqués à V_h = 0 mV = $V_{Rev\text{-}ChR2}$ avec des stimulations lumineuses de 10 ms. A ce potentiel, l'activation de la ChR2 dans le Nc-LCS postsynaptique n'entraine pas de photo-courant et les réponses observées correspondent à des courants synaptiques évoqués par la neurotransmission, à partir des terminaisons de Nc-LCS présynaptiques. Pour confirmer la nature GABAergique (phénotype des Nc-LCS) des réponses évoquées, les enregistrements ont été reproduits en présence dans le bain de 10 µM de gabazine et 100 µM de picrotoxine (Gbz et Ptx, BioTechne, UK), des antagonistes des $R\text{-}GABA_A$.

Tableau 6 | Bloqueurs, agonistes et antagonistes

Drogues	Cibles	Concentrations	Application
TTX Alomone labs, Jerusalem, Israel	Na_v	0.5 µM	Bain et Pression
TEA-Cl Sigma-Aldrich	K_v	10-20 mM	Bain
4-AP Sigma-Aldrich	K_v	4 mM	Bain
Cadmium Sigma-Aldrich	Ca_v	200 µM	Bain et Pression
GABA Tocris	R-$GABA_A$	1 mM	Pression
Glycine Sigma-Aldrich	R-Gly	1 mM	
Glutamate Ascent Scientific	R-Glu (NMDA, AMPA, Kaïnate), R-mGlu	0.1-1 mM	
Kaïnate Tocris	R-Kaïnate	100 µM	
AMPA Tocris	R-AMPA	100 µM	
NMDA Tocris	R-NMDA	100 µM	
Acetylcholine Tocris	R-nAch	1-4 µM	
ATP-γ-S Abcam Biochemicals	R-Purinergique	1 mM	
Baclofène Tocris	R-$GABA_B$	100 µM	
Oxotrémorine M Tocris	R-mACh	100 µM	
DCG IV Tocris	R-mGlu du groupe II – R-mGlu 2 et 3	2 µM	
L-AP4 Tocris	R-mGlu du groupe III – R-mGlu 4, 6, 7, 8	100 µM	
NMA Sigma-Aldrich	R-NMDA	10 µM	Bain
5-HT Sigma-Aldrich	R-5HT	10 µM	Bain et pression
Gabazine, SR95531 Ascent Scientific, Bristol, UK	R-$GABA_A$	10 µM	Bain
Picrotoxine Sigma-Aldrich	R-$GABA_A$	100 µM	
Strychnine Sigma-Aldrich	R-Gly & R-nAch	1 µM	
DNQX Tocris, Bioscence, Bristol, UK	R-Glu (NMDA, AMPA, Kaïnate)	400 µM	
D-tubocurarine Tocris	R-nACh	100 µM	
CGP 54626A Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland	R-$GABA_B$	2 µM	
Atropine Sigma-Aldrich	R-mACh	10 µM	
LY341495 Tocris	R-mGlu du groupe II – R-mGlu 2 et 3	1 µM	
MSOP Tocris	R-mGlu du Groupe III – R-mGlu 4, 6, 7, 8	100 µM	

Connectivité postsynaptique des Nc-LCS lombaires

Pour l'étude de la connectivité entre les Nc-LCS et les interneurones moteurs spinaux, les enregistrements ont été réalisés en mode VC et CC, avec la solution intracellulaire de KCl **(Tableau 4)**. Cette solution avec un $V_{Rev\text{-}GABA}$ égal à ≈0 mV, permet l'enregistrement de courants GABAergiques de grande amplitude (force électromotrice élevée, ci-dessous). Les enregistrements ont été menés dans la région ventro-médiane (zone contenant le réseau moteur spinal) de la moelle épinière lombaire et les interneurones potentiellement connectés aux Nc-LCS ont été identifiés par la présence, autour de leur soma, de poncta $ChR2^+$ ou $ChR2^+$/$tdTomato^+$, correspondant aux terminaisons synaptiques des Nc-LCS. Les courants synaptiques ont été photo-évoqués dans les interneurones à un V_h de -90 mV (force éléctromotrice de -90 mV : Vh - $V_{Rev\text{-}GABA}$ = -90 – 0 = -90 mV), avec des stimulations lumineuses de 20 ms à 490 nm. Les enregistrements ont été réalisés en condition contrôle et en présence de 10 µM de gabazine, pour démontrer la nature exclusivement GABAergique de la neurotransmission, ou après l'ajout d'1 µM de strychnine (Sigma-Aldrich), 20 µM de DNQX seuls ou avec 10 µM de gabazine, pour s'affranchir des entrées synaptiques spontanées qui pourraient perturber l'analyse des résultats.

e) Modulation de la transmission synaptique photo-évoquée par les RCPGs

Modulation des courants synaptiques par l'activation de RCPGs

Afin de montrer une potentielle modulation de la transmission synaptique photo-évoquée par les RCPGs, des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) ont été évoqués dans les Nc-LCS ou les interneurones, enregistrés en mode VC à V_h 0 mV ou -90 mV respectivement (cf Matériel et Méthodes, Section 4). Pour ces enregistrements, la résistance série (r_s) n'a pas été compensée et un saut de potentiel de -10 mV (200 ms), a été délivré avant les pulses de lumière afin de s'assurer de la stabilité de r_s au cours de temps. Les cellules pour lesquelles r_s variait de plus de 25 % par rapport à la valeur initiale ont été éliminées lors de l'analyse.

Lorsque qu'une connectivité synaptique fonctionnelle entre Nc-LCS ou entre Nc-LCS et interneurone a été établie, des agonistes spécifiques de plusieurs RCPGs ont été appliqués par pression (cf Matériel et Méthodes, Section 4c), avec une pipette de patch localisée diagonalement à environ 50 µm du soma de la cellule enregistrée. Les IPSCs photo-évoqués ont été induits toutes les 5 secondes et enregistrés avant (contrôle, 4 min, 40 sweeps), pendant (agoniste, 1 min 30, 15 sweeps) et après (wash, 4 min, 40 sweeps) l'application d'agonistes spécifiques des récepteurs métabotropiques R-$GABA_B$ (Baclofène : 100 µM / Antagoniste : CGP : 2 µM), R-mACh muscariniques (oxotrémorine-M : 100 µM / Antagoniste : Atropine : 10 µM), R-5HT (5-HT : 1 mM) et R-mGlu du groupe II, R-mGlu 2 et 3 (DCG IV à 2 µM / Antagoniste : LY341495 : 1 µM) et du groupe III, R-mGlu 4, 6, 7 et 8 (L-AP4 à 100 µM / Antagoniste : MSOP : 100 µM). Les enregistrements ont été réalisés en présence de 20 µM de DNQX et de 1 µM de strychnine dans le bain, en absence ou en présence des antagonistes spécifiques des RCPGs étudiés.

Effet pré-/postsynaptique de la modulation des RCPGs

La localisation pré- ou postsynaptique de la modulation médiée par l'activation de RCPGs a été déterminé par un protocole de double pulse qui consiste à photo-générer deux réponses synaptiques consécutives séparées de 100 ms afin de calculer le « paired-pulse ratio » (PPR). Les amplitudes des réponses synaptiques ont été mesurées pour le premier (P1) et le deuxième (P2) pulse et le PPR calculé en divisant la réponse issue de P2 par celle de P1 (PPR = P2/P1). Une analyse du coefficient de variation ($1/CV^2$, avec CV=σ/µ) et des cinétiques des réponses synaptiques (temps de montée et décours temporel) ont également été

réalisées pour confirmer les résultats du PPR et ainsi résoudre la localisation du mécanisme de modulation observé.

f) Caractérisation des partenaires postsynaptiques par Single-Cell RT-PCR

Récolte des ARN messagers des partenaires postsynaptiques

L'analyse par Singel Cell RT-qPCR (Reverse Transcription q Polymerase Chain Reaction) consiste en fin d'enregistrement, à prélever le cytoplasme des neurones afin de déterminer la présence d'ARN messagers (ARNm) spécifiques d'un type neuronal, pour en connaitre le phénotype. Afin d'éviter toute contamination et éviter la dégradation des ARNm (présence de RNAse), un ensemble de précautions ont été prises à chaque étapes du protocole. Ainsi, une solution intracellulaire de KCl exempte de RNase a été spécialement utilisée. De la préparation des solutions d'aCSF aux enregistrements électrophysiologiques et jusqu'à la récupération du matériel d'intérêt, le port de gants, d'une blouse et d'une charlotte stériles, l'utilisation de matériel nettoyé avec une solution RNaseZAP (Sigma-Aldrich) et l'utilisation d'eau ultra pure (UltraPure distilled water DNase, RNase free, Invitrogen) ont été privilégiés.

Dans ces conditions, les enregistrements de patch-clamp, en configuration cellule entière, sont réalisés avec des électrodes autoclavées (2h à 180°C) et remplies avec 1-2 µL de solution intracellulaire. A la fin des protocoles d'enregistrement, une aspiration progressive du cytoplasme est réalisée, tout en monitorant la stabilité du *seal* ainsi que le processus d'aspiration sous microscope. Après quelques secondes, l'aspiration est stoppée et l'électrode retirée de la tranche. Celle-ci, est rapidement brisée dans un tube PCR exempt de RNases/DNases, contenant 4 µl de tampon de lyse **(Tableau 7)**. Les échantillons sont ensuite vortexés et immédiatement congelés à -80°C, en attente de leurs préparations pour l'analyse par RT-qPCR. Des échantillons contrôles ont été récupérés de la même façon. Les tubes contrôles contenaient du tampon de lyse avec des extrémités d'électrodes remplies de la solution intracellulaire. Ces électrodes étaient soit intactes, soit plongées dans la solution extracellulaire avec ou sans passage dans la tranche de moelle épinière. En plus des interneurones connectés, des interneurones non-connectés et des Nc-LCS ont aussi été récoltés.

Tableau 7 | Composition des solutions utilisées pour l'extraction d'ARNm en single cell

Tampon de lyse 4 µL/cellule	**Mix RT annealing** 0,2 µL/tube	**Mix RT** 5,5 µL/tube	**Mix pré-PCR** 15 µL/tube	**Mix PCR** 19 µL/tube
Triton 0,095% RNaseOUT 1 U/µl dNTP* 2,5µM Oligo-dT30VN* 2,5µM (* ajoutés frais)	LNA-TSO 2,2µM H2O	SuperScript IV buffer 1X DTT 5µM RNaseOUT 1 U/µl SuperScript RT IV 10 U/µl Betaïne 1M $MgCl_2$ 0,625mM	Platinum SuperFi MasterMix 1X IS PCR primer 0,1µM H2O	qPCR master mix 1x - 10µl Amorce F 0,5µM - 1µM Amorce R 0,5µM - 1µM H2O 1µl du produit de RT½

Tableau 8 | Programmes utilisés pour l'extraction d'ARNm en single cell

Programme RT	Programme pré-amplification PCR	Programme PCR
55°C - 10 min 80°C - 10 min	98°C - 30s [98°C - 10s 60°C - 10s 72°C – 6 min] x 22 cycles 72°C – 5 min 10°C - ∞	50°C – 2 min 95°C – 10 min [95°C - 15s Tm = 60°C – 1 min] x 40 cycles

Tableau 9 | Amorces utilisées pour la mesure d'expression des transcrits par PCR

Gènes	Séquences de référence	Amorces Forward	Amorces Reverse	Taille
Lbx1	NM_010691	CTCGCCAGCAAGACCTTTAAGG	GCGTGATTTTCGCCGTTTCTTGG	117
Dmrt3	NM_177360	CCTCGTCCCACCGCGGAGTT	AGTGTTGTCCGTGGAACTGCTG	141
Wt1	NM_144783	GGTTTTCTCGCTCAGACCAGCT	ATGAGTCCTGGTGTGGGTCTTC	128
Dbx1	NM_001005232	GTTCTCTGACGTGCAGCGGAAA	CATGCGTCGATTCTGGAACCAG	142
Evx1	NM_007966	GGCAACCTAGTAGCTCAGACAC	GTAGGACTGCTACCCAGAGCAT	139
Evx2	NM_007967	GCGCCTGGAGAAAGAGTTCTAC	CGCTGCCGTTTGTCCTTCATGC	137
Pitx2	NM_001042502	AGAAATCGCCGTGTGGACCAAC	CCAAAGCCATTCTTGCACAGCTC	123
Chat	NM_009891	GCTTGAATGGAGCGAATCGTTGG	CACCAGGACGATGCCATCAAAAG	113
vGluT2 / Slc17a6	NM_080853	CCTATGCTGGAGCAGTCATTGC	GGCTCTCATAAGACACCAGAAGC	138
Mnx1	NM_019944	CAGCACCTTCCAACTGGACCAG	TTCGGCACTTCCCCAAGAGGTT	113
Lhx3	NM_001039653	AAGGCGGACTACGAAACAGCCA	GCGAAGTGTTGTAGGCGCTCTT	115
Vsx2 / Chx10	NM_007701	CCACCTTCTTGGAAGTGCTGTC	GTCACTGGAGGAAACATCTTCGG	125
Shox2	NM_013665	CTATCCAGACGCTTTCATGCGC	ACTGGCTAGCGGCTCCTATAAG	152
MafA	NM_194350	GCTTCAGCAAGGAGGAGGTCAT	TCTCGCTCTCCAGAATGTGCCG	120
Pax2	NM_011037	AAGCCCGGAGTGATTGGTG	CAGGCGAACATAGTCGGGTT	101
Pkd2l1	NM_181422	AGTGCATTTTCACTCAGTTC	TAGGTGACAAAGTACACAGG	
Actine B	NM_007393	GCCAACCGTGAAAAGATGAC	GAGGCATACAGGGACAGCAC	

RT-qPCR des ARNm

Les tubes sont récupérés au -80°C, et sont directement mis à incuber 3 minutes à 72°C dans un tampon de lyse. Les tubes sont ensuite vortexés et gardés dans la glace, avant d'être incubés 5 minutes à 65°C avec le mix annealing, puis au moins 1 minute dans la glace. Le mix RT est ajouté, le tube vortexé et le programme de rétrotranscription pour générer les ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARNm est lancé. Enfin, le mix PCR est ajouté au tube, vortexé et les ADNc sont pré-amplifiés par PCR **(Tableau 8)**. Dans l'attente de la qPCR, les produits de RT-PCR sont conservés à -20°C.

Mesure de l'expression des transcrits par qPCR en SyberGreen

Une quantité de 1 µl/puit du produit de RT dilué au demi, est ajoutée au mix PCR puis le programme PCR est lancé. Dans un premier temps, l'expression de l'actine comme gène de ménage et des transcrits ChAT, GAD67, vGluT2 et PKD2L1 ont été déterminées, pour identifier les neurones cholinergiques, GABAergiques, glutamatergiques et les Nc-LCS, respectivement. En fonction de la quantité d'expression de l'actine et de la qualité des transcrits testés (contaminations), la recherche de facteurs de transcription spécifiques peut être stoppée ou prolongée pour un échantillon donné. L'actine est systématiquement testée aux côtés de chaque transcrits **(Tableau 9)**. Les mesures ont été effectuées en duplicats, pour s'assurer de la reproductibilité du pipetage. Un contrôle négatif avec de l'eau a été réalisé en parallèle pour chaque expérience.

5- Injections d'AAV

Les Nc-LCS sont les seuls neurones qui affleurent le LCS au niveau du canal central de la moelle épinière et il a été mis en évidence qu'il est possible de les infecter de manière sélective par des injections intracérébroventriculaire de solution virale (AAV1) (Nakamura et al., 2023 ; Crozat et al., 2024 BioRxiv). Afin de mettre en évidence au niveau anatomique, la connectivité entre Nc-LCS et neurones cholinergiques (ChAT) et GABAergiques (vGAT), des souris, ChAT-tdTomato et vGAT-venus, âgées entre 3 et 5 semaines ont été utilisées pour cette procédure. Les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de Méloxicam (5 $mg.kg^{-1}$), 30 minutes avant induction de l'anesthésie par isofluorane. Une fois anesthésiées, les souris sont placées dans un cadre stéréotaxique (Mouse mini-stereotaxic frame, RWD life sciences), maintenues

sous anesthésie gazeuse (isoflurane) et reçoivent une injection locale sous-cutanée de Lurocaïne à 5 mg/kg (Vetoquinol) autour de la zone d'incision. Une craniotomie selon les coordonnées stéréotaxique (AP : 0.0, ML : 1.0 mm ; DV : 1.6 mm), par rapport au point Bregma, pour cibler les ventricules latéraux (VL), a été réalisée avec une fraise motorisée (78001 Microdrill, RWD life sciences, mèche de 1 mm de diamètre). Une injection de 700 nL de particules virales d'AAV1-hSyn-EGFP ou d'AAV1-hSyn-mScarlet $2x10^{13}$ $GC.mL^{-1}$ a été réalisée avec le système Nanoject-III (Drummond Scientifc Company) à une vitesse de 4 $nL.s^{-1}$ au niveau du VL.

6- Histologie et imagerie confocale

a) Préparation des tissus pour l'imagerie confocale

Trois semaines après l'injection intraventriculaire, les animaux ont été anesthésiés selon le protocole classique (cf Matériel et Méthodes, Section 3), avant de réaliser une perfusion intracardiaque avec 20 mL de PBS 0.1M à 37°C, suivi par 20 mL de paraformaldéhyde à 4 % (EMS, 15714S) dans du PBS 0.1M, à 0-4°C, pour la fixation des tissus spinaux. La moelle épinière est isolée par laminectomie et les méninges sont retirées avant une fixation « overnight » à 4°C dans la même solution de fixation, puis rincée avec du PBS 0.1M.

b) Histologie et microscopie confocale

Le segment lombaire de la moelle épinière est inclus dans un bloc d'agarose (low melting point agarose 4 % dans du PBS 0.1M). Le bloc est ensuite collé sur une plateforme de vibratome (HM 650V, Microm, Thermo Scientific) et des tranches coronales de 50 µm sont collectées en coupes flottantes. Après une incubation dans 1.5µg/mL de DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) dans du PBS 0.1M (15 min, RT), les tranches sont rincées avec du PBS 0.1M et montées avec du Vectashield (H-1900-10, Vector laboratories) entre lame et lamelle. Les coupes sont gardées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les images z-stacks à 8 bits ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM700, équipé du logiciel ZEN 2009 (Zeiss), en utilisant un objectif 20x (NA 0,8 ; épaisseur optique de 0,75 µm, zoom=1) ou 63x à immersion dans l'huile (NA 1,4 ; épaisseur optique de 0,8 µm, zoom=1 ou 2). Après acquisition les images ont été traitées à l'aide de FIJI/Image J.

7- Analyses

Enregistrements en patch-clamp configuration cellule entière

Les propriétés intrinsèques ont été déterminées en mode VC, à partir du courant capacitif obtenu en réponse à un saut de potentiel V_{Step} (-10 mV, 10 ms), à partir de V_h -70 mV. La résistance membranaire r_m a été calculé à partir de l'amplitude du courant soutenu à la fin du saut de potentiel ($r_m=V_{Step}/I_m$). La constante de temps τ a été obtenue à l'aide d'un fit exponentiel du décours temporel du courant capacitif et la capacité membranaire (c_m) calculée à partir de r_s et τ ($c_m=\tau/r_s$). Le potentiel de repos (Resting Membran Potential, RMP) des neurones enregistrés a été obtenu juste après le passage en configuration cellule-entière en mode CC à I=0. Le patron de décharge a été analysé avec la fonction « threshold dectection » de Clampfit 11 avec un seuil positionné à 0 mV. La rhéobase, correspondant à l'injection minimale de courant nécessaire pour déclencher un PA et les propriétés de décharge/rythmogéniques ont été analysées à partir d'enregistrements de la décharge de PA induite par des sauts de 500 ms d'injection de courant, à partir de la RMP. Les données électrophysiologiques en mode VC et CC, ont été analysées avec la suite Clampfit 11 (Molecular Devices Inc.) et Microsoft Excel 2019.

Pour les courants médiés par les Na_v et K_v, la relation courant-potentiel pour une conductance donnée, a été construite pour chaque cellule, en mesurant l'amplitude au pic du courant Na^+ et K^+ enregistré pour un V_{Step} donné. Pour les courants médiés par les Ca_v, les courants ont été générés à partir d'un V_h de -60 mV avec un protocole de rampe de potentiel en fonction du temps. La courbe IV a ensuite été obtenue en convertissant les données de la variation du courant en fonction du potentiel. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD, sauf indication contraire.

L'amplitude, le délai, le temps de montrée et le décours temporel des courants photo-évoqués par la première stimulation optogénétique, ont été analysés pour toutes les cellules enregistrées. Seuls les évènements synaptiques avec des cinétiques claires de courant monosynaptique ont été pris en compte. L'amplitude des IPSC a été mesurée au pic du courant et le temps de montée est considéré comme le temps entre le début du décrochement et le pic du courant (de 10 à 90 % au pic du courant). La latence ou délai des réponses synaptiques a été mesurée entre le début de la stimulation optogénétique et le début du décrochement des IPSC moyens (trace moyenne de 8 répétitions). Lorsque les IPSCs présentaient un retour incluant plusieurs réponses synaptiques (polysynaptique), la mesure du décours temporel à l'aide d'un fit exponentiel des réponses synaptiques n'a pas été possible et ces données ont été exclues de l'analyse.

Single cell RT PCR

La quantification relative de l'expression génique a été réalisée par PCR en temps réel ou (qPCR), à partir des valeurs de Ct (cycle seuil) du gène ciblé, normalisées par rapport au gène de contrôle endogène (actineB). En soustrayant la valeur Ct du contrôle endogène à la valeur Ct du gène d'intérêt, dans le même échantillon, on obtient $\Delta Ct = Ct_{actine} - Ct_{gène\ d'intérêt}$, qui s'exprime ensuite sous la forme $2^{-\Delta Ct}$, afin d'obtenir la mesure du niveau d'expression relatif du gène d'intérêt dans l'échantillon. Les valeurs de Ct supérieures à 30 sont considérées comme négatives, c'est-à-dire, que les gènes dont les Ct sont supérieurs à 30 cycles, sont considérés comme non exprimés dans notre échantillon.

8- Statistiques

Les données sont représentées avec des boites à moustaches (boxplots) avec les points individuels pour illustrer la distribution des données. Pour chaque ensemble de données, la médiane (représentée par une ligne horizontale) et les 25ème aux 75ème percentiles (limites inférieure et supérieure de chaque barre, respectivement) sont calculés. Ensuite, la distance interquartile (IQR) est déterminée comme étant la différence entre le 25ème et le 75ème percentile, et les limites des moustaches sont calculées comme étant le 75ème percentile plus 1,5 fois l'IQR et le 25ème percentile moins 1,5 fois l'IQR. Toutes les données supérieures ou inférieures aux moustaches sont représentées comme des points individuels et considérées comme des valeurs aberrantes (cercles sur les graphiques).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism version 9.0.0 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. Comme les valeurs ne sont pas distribuées selon la loi normale, nous avons utilisés les tests statistiques non paramétriques de Wilcoxon ou One-Way ANOVA suivi d'un test de Friedman de comparaisons multiples, sur des valeurs pairées. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD, sauf contre-indication. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

RESULTATS

IV - RESULTATS

A- Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des Nc-LCS lombaires

Les Nc-LCS ont largement été étudiés dans le modèle de larve de poisson-zèbe et chez la lamproie à un niveau intégré. Ces études se sont largement concentrées sur la caractérisation du rôle des Nc-LCS et ont permis de mettre en évidence leur intégration dans le réseau moteur spinal et leur fonction de modulateurs de l'activité de nage. Bien que cruciales, de telles études sont plus compliquées à réaliser chez les mammifères. Ce n'est que récemment que les premiers résultats ont été obtenus *in vivo,* confirmant une fonction des Nc-LCS dans la régulation de l'activité motrice chez la souris (Gerstmann et al., 2022 ; Nakamura et al., 2023).

Toutefois, pour comprendre le rôle d'une population neuronale et en établir la fonction dans le SNC, il est également important d'en caractériser les propriétés fonctionnelles au niveau cellulaire. Ces études, qui ont été menées au niveau bulbaire par les membres de mon équipe d'accueil (Orts-Del'Immagine et al., 2012, 2014; Orts Del'Immagine et al., 2015; Jurčić et al., 2019), ont permis de déterminer les propriétés intrinsèques des Nc-LCS, leur excitabilité (activité et patron de décharge des PA), de caractériser l'activité et la modulation du canal PKD2L1 et d'identifier les différentes conductances ioniques et autres récepteurs qu'ils expriment. L'analyse de ces données est cruciale puisqu'elle permet de mieux comprendre l'activité physiologique des Nc-LCS et d'identifier les canaux ioniques et les récepteurs, notamment synaptiques, qui sous-tendent cette activité et permettent de la réguler.

En collaboration avec les membres de l'équipe, une étude globale sur la caractérisation des Nc-LCS le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière a été effectuée. Dans ce premier chapitre des résultats, je présenterais l'ensemble des données que j'ai obtenues sur la caractérisation cellulaire des Nc-LCS lombaires.

1- Propriétés passives et patron de décharge

Les Nc-LCS lombaires ont des propriétés intrinsèques relativement proches des Nc-LCS de la *medulla* (Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts Del'Immagine et al., 2015), avec une résistance membranaire ou d'entrée r_m élevée (3,6±3 GΩ), une petite capacité membranaire c_m (6,3±2,9 pF), et une constante de temps membranaire τ_m (90±3 µs), caractéristiques d'un soma de petite taille et d'une faible arborisation dendritique (n=193). En mode courant-imposé (CC, I=0), les Nc-LCS ont un potentiel de repos membranaire (RMP) de -52±9 mV (n=34). Ils présentent une faible, voire absente, activité de décharge de PA. L'injection d'un saut de courant de +20 pA pendant 200-500 ms de V_h -60 mV (I_{Step} de -20 pA, 200-500 ms, Δ+10 pA) induit dans 71 % des Nc-LCS enregistrés, une décharge de PA tonique (15/21 cellules) alors que 29 % des Nc-LCS lombaires présentent une décharge avec un PA unique au début du créneau de courant (6/21 cellules). Ces propriétés sont en accord avec celles observées chez la souris (Petracca et al., 2016) et le rat nouveau-né (Marichal et al., 2009).

2- Les Nc-LCS lombaires expriment un ensemble de conductances ioniques voltage-dépendantes

Des études réalisées chez le rat nouveau-né ont montré, l'expression fonctionnelle de canaux sodiques (Na_v) et potassiques (K_v) dans les Nc-LCS (Marichal et al., 2009). Ainsi, nous avons analysé les différentes conductances voltage-dépendantes des Nc-LCS sur des tranches aigues de moelle épinière lombaire de souris entre 2 et 6 semaines, à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques de patch-clamp en mode voltage- ou courant-imposé (VC et CC). L'utilisation de solutions extracellulaires et intracellulaires particulières (cf Tableaux 3,4 et 5 ; Matériel et Méthodes), nous ont permis d'isoler spécifiquement les différents courants.

a) Canaux Sodium voltage-dépendants (Na_V)

Pour étudier les conductances Na^+ chez la souris au niveau lombaire, les conductances sodiques ont été isolées en utilisant une solution intra-pipette à base de césium acétate et de TEA (CsAc-TEA), et une solution extracellulaire d'aCSF sans $CaCl_2$ (pour bloquer les courant), remplacé par 4 mM de $MgCl_2$ et 20mM de TEA, afin de bloquer le courant K^+ sortant.

Les courants sodiques voltage-dépendants (INa_v), ont été évoqués en VC à partir d'un potentiel de maintien V_h de -80 mV avec un protocole d'activation classique, comprenant des sauts de potentiels dépolarisants de -80 à +60 mV (V_{Step} de -80 à +60 mV, 100 ms, Δ+10 mv ; **Figure 65A**). Les courants Na_v obtenus, sont entrants (en accord avec le potentiel d'équilibre calculé E_{Na}=+46 mV, cf Tableau 4 ; Matériel et Méthodes) et présentent une activation et une inactivation rapide. La relation courant-potentiel (*courbe I-V* moyenne ; **Figure 65B**), a été obtenue à partir de l'amplitude du courant Na_v mesurée au pic, pour chaque saut et où l'amplitude des pics des courants Na_v, est rapportée en fonction des sauts de potentiels imposés (V_{Step}). Le courant Na_v s'active à des V_{Step} plus dépolarisés que -40 mV, avec un maximum à 0 mV, et s'inverse à ≈+50 mV (pour E_{Na}=+46 mV, n=11 ; **Figure 65B**). L'application par bain de 0,5 µM de tétrodotoxine (un bloqueur sélectif des Na_V) bloque complètement le courant (**Figure 65A et D**, +TTX, trace pourpre), confirmant l'expression fonctionnelle de courants Na_v TTX-sensibles dans les Nc-LCS lombaires (inhibition de 105,7±6 % ; densité de courant en CTRL -129±63 $pA.pF^{-1}$; amplitude : 590±463 pA, et en TTX 10±7 $pA.pF^{-1}$; n=11 ; **Figure 65C**).

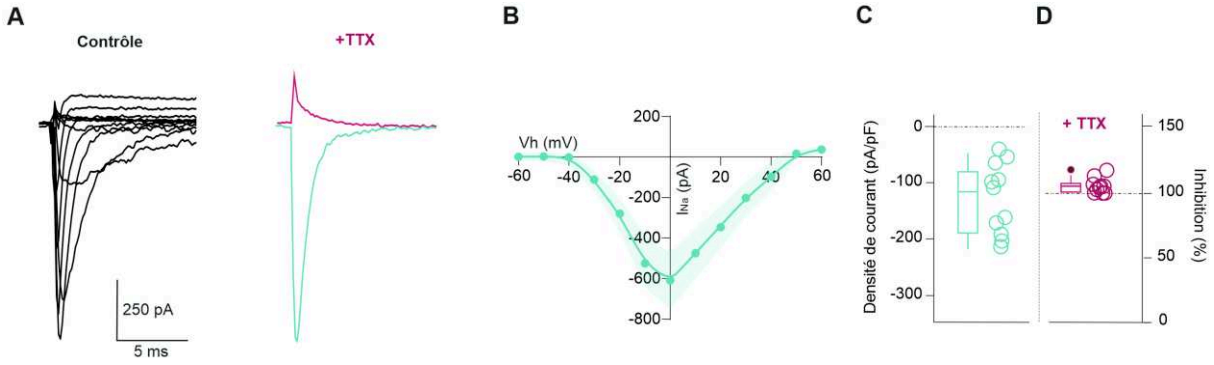


Figure 65 | Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux sodiques voltage-dépendants TTX-sensibles

(A) Traces représentatives d'un enregistrement en cellule entière, obtenues en réponse à un V_{step} de -80 à +60 mV (100 ms, Δ+10 mv), à partir de V_h -80 mV, pour induire des courants Na^+ dans un Nc-LCS, en contrôle (trace noire) et en présence de 0.5 µM de TTX (trace pourpre). **(B)** Relation courant-voltage (courbe *I-V* moyenne) des courants Na^+, obtenue à partir de l'amplitude du courant mesurée au pic pour chaque V_{step} et rapportée en fonction du V_{step} imposé. **(C)** Boxplot de la densité moyenne de courant, mesurée au pic du courant Na^+, en contrôle (trace verte : -129±63 $pA.pF^{-1}$, n=11). **(D)** Boxplot du pourcentage moyen d'inhibition, induit par la TTX sur les courants Na^+ (Inhibition : 105,7±6 %, n= 11).

b) *Canaux Calcium voltage-dépendants (Ca_V)*

Les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) s'activent en réponse à une dépolarisation de la membrane et sont divisés en deux groupes, en fonction de leur sensibilité au potentiel. Les canaux de haut seuil (HVA : high voltage activated), activés par des potentiels plus dépolarisés que -40 mV, comprennent en fonction de leurs propriétés pharmacologiques et biophysiques, les sous type L, N, R et P/Q (Catterall, 2011). Les canaux de bas seuil (LVA : low voltage activated), activés par des potentiels plus négatifs, aux alentours de -70mV, sont dits de type T, pour « Transitoire », car leurs courants s'inactivent rapidement. Précédemment, l'équipe a montré chez la souris que les Nc-LCS bulbaires expriment des canaux Ca_v fonctionnels, principalement des HVA de type N ($Ca_v2.2$) (Jurčić et al., 2019). Par ailleurs, il a été rapporté que les Nc-LCS chez le rat nouveau-né, possèdent des conductances à la fois de haut (HVA) et de bas (LVA) seuil, de type T ($Ca_v3.3$) (Marichal et al., 2009). Un résultat récemment confirmé dans les Nc-LCS thoraciques (Johnson et al., 2023).

Pour étudier les conductances Ca^{2+} chez la souris au niveau lombaire, une solution intra-pipette à base de césium acétate et de TEA (CsAc-TEA) et une solution extracellulaire contenant de la tétrodotoxine (TTX, 0,5 µM un bloqueur des Na_v) et du TEA (20 mM, bloqueur des K_v), ont été utilisées (cf Tableaux 3, 4 et 5 ; Matériel et Méthodes). Les courants calciques ont été évoqués à l'aide de sauts de potentiel successifs (V_{Step} de -40 mV à +30 mV, 100 ms, ΔV +10 mV ; **Figure 66A**) à partir d'un V_h de -80 mV (activation des canaux de type T) ou de -60 mV (inactivation des canaux de type T). Pour s'assurer de la dé-inactivation de tous les Ca_v, le protocole a été précédé d'un pré-saut hyperpolarisant de 50 ms à -120 mV. Le courant Ca_v évoqué présente une phase d'activation rapide, suivie d'une diminution transitoire et enfin, une phase de courant persistant (steady state). Il présente aussi un courant de queue rapide après la repolarisation du potentiel de membrane (trace noire en contrôle ; **Figure 66A**). La présence de Cadmium (Cd^{2+}, 200 µM), un bloqueur sélectif des Ca_v, appliqué par pression (trace pourpre ; **Figure 66A**, $+Cd^{2+}$) bloque complètement le courant évoqué avec une inhibition de 106,0±2 % (en Cd^{2+} : 2±1 $pA.pF^{-1}$ n=10 ; **Figure 66D**). A V_h -60 mV, la courbe *I-V* montre que ce courant s'active à des V_{Step} plus dépolarisés que -30 mV, avec un pic à +10 mV (densité de courant -31±13 $pA.pF^{-1}$, amplitude de -244±162 pA ; n=10 ; **Figure 66B**). L'ensemble de ces données confirme l'expression fonctionnelle de Ca_V dans les Nc-LCS lombaires.

Afin de vérifier l'expression de Ca_v de bas seuil (LVA de type T, Ca_V3), activés pour un V_h plus hyperpolarisé et inférieur à -60 mV, un protocole de rampe a été utilisé. Lorsque les enregistrements sont réalisés à partir d'un V_h de -80 mV, on observe sur la relation courant-voltage **(Figure 66E)** l'apparition, pour des potentiels de membrane inférieurs à -40 mV d'un épaulement caractéristique de l'activation des Ca_V de type T (trace pourpre). L'amplitude moyenne au pic de ce courant est de -51±32 pA pour un potentiel membranaire de -29±7 mV (n=20). Cet épaulement n'est pas observé lorsque le protocole de rampe est enregistré à partir de V_h -60 mV (trace noire), un potentiel membranaire pour lequel les Ca_v de type T sont inactivés (**Figure 66E** ; trace normalisée par rapport à la valeur du pic). La trace en insert représente l'enregistrement du courant Ca_V induit par un protocole de rampe à partir de V_h -80 mV. Ces résultats indiquent que les Nc-LCS lombaires expriment à la fois des Ca_v HVA et des LVA fonctionnels.

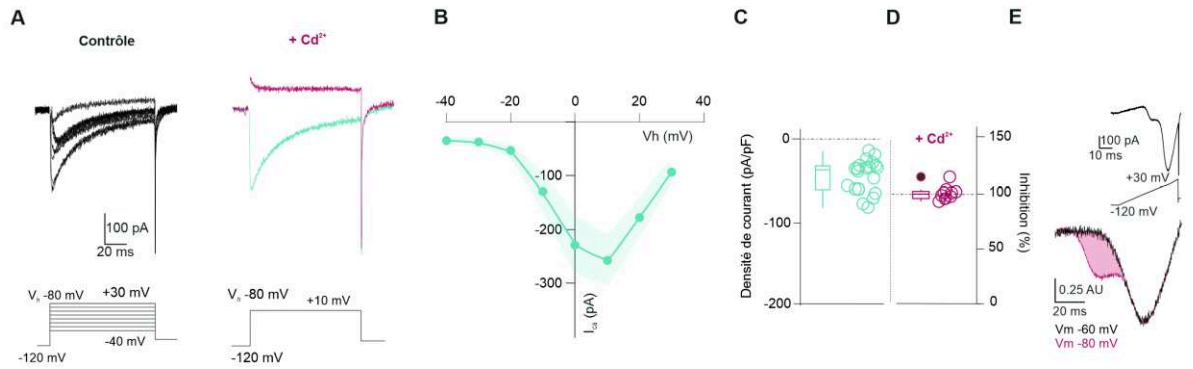


Figure 66 | Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux calciques voltage-dépendants Cd^{2+}-sensibles

(A) Traces représentatives d'un enregistrement en cellule entière, obtenues en réponse à un V_{step} de -40 à +30 mV (100 ms, Δ+10 mv), à partir de V_h -80 mV, avec un pré-pulse à -120 mV, pour induire des courants Ca^{2+} dans un Nc-LCS, en contrôle (trace noire) et en présence de 200 µM de Cd^{2+} (trace pourpre). **(B)** Relation courant-voltage (courbe I-V moyenne) des courants Ca^{2+} enregistrés à V_h -60 mV, en utilisant un protocole de rampe du courant en fonction du temps et converti en courbe I-V. **(C)** Boxplot de la densité moyenne de courant, mesurée au steady-state du courant Ca^{2+}, en contrôle (trace verte : -44±20 pA.pF^{-1}, n=21). **(D)** Boxplot du pourcentage moyen d'inhibition, induit par le Cd^{2+} sur les courants Ca^{2+} (Inhibition : 106,0±2 %, n= 10). **(E)** Trace représentative d'un enregistrement, pendant un protocole de rampe (au-dessus) à V_h -80 mV (trace pourpre) et -60 mV (trace noire). La partie colorée entre les deux traces, correspond au courant LVA (canaux de type T). Les données sont normalisées par rapport au pic et présentées en unités arbitraire (AU) pour plus de clarté.

c) Canaux Potassium voltage-dépendants (K_V)

Chez le rat nouveau-né, Marichal et collaborateurs ont identifié des canaux potassiques voltage-dépendants (K_v) de deux types : des K_v à rectification retardée (I_{KD}) et des K_v de type A (I_A) (Marichal et al., 2009). Afin de déterminer l'expression de ces canaux dans les Nc-LCS lombaires, les conductances K^+ ont été isolées grâce à l'utilisation d'une solution intra-pipette à base de potassium gluconate et d'une solution extracellulaire d'aCSF sans $CaCl_2$, remplacé par 4mM de $MgCl_2$ et 0,5 µM de TTX (cf Tableaux 3,4 et 5 ; Matériel et Méthodes). Dans ces conditions, les enregistrements ont été effectués à V_h -80 mV (pré-step à -100 mV, 100 ms, suivi par un V_{Step} de -40 à +60 mV, 100 ms, Δ+10 mV ; **Figure 67A**). L'amplitude du courant évoqué augmente proportionnellement à l'amplitude de V_{Step}. Dans des conditions contrôles, les courants K_v présentent d'abord une phase transitoire (Pic, *), suivie par une phase persistante (Persistante, # ; **Figure 67A et C**), qui dure pendant toute la durée du saut de potentiel. La courbe *I-V* **(Figure 67B)**, indique que le courant est activé à des V_{Step} plus dépolarisés que -30 mV, il est sortant (en accord au potentiel d'équilibre du potassium, E_K = -94 mV, cf Tableau 4, Matériel et Méthodes) et son amplitude augmente avec l'amplitude de V_{Step}. La densité du courant transitoire est de 855±58 pA.pF^{-1} et celle du courant persistant de 758±53 pA.pF^{-1} à +60 mV (6097±368 pA et 5455±373 pA; n=21, **Figure 67C**).

En accord avec les données de Marichal et collaborateurs (2009), les courants enregistrés suggèrent la présence d'au moins deux types de K_v : un courant rapide transitoire et un persistant, portés par les canaux de type A (I_A) 4-AP sensible et un courant persistant porté par les canaux à rectification retardée (I_{KD}) TEA sensible. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons enregistré les courant K_v et mené une analyse pharmacologique. L'application de TEA (10 mM) réduit l'amplitude du courant K^+ de 65±9 %, pour une densité de courant de 281±17 pA.pF^{-1} (n=17 ; **Figure 67C**). Le courant TEA-sensible (en bleu clair : soustraction digitale du courant enregistré en contrôle, moins celui en TEA, trace pourpre ; **Figure 67C**), présente un front de monté qui accélère avec la dépolarisation et qui est persistant en accord avec les caractéristiques d'un courant I_{KD}. L'ajout de 4-AP (4 mM ; +4-AP), diminue encore le courant de 75±8 % (196±16 pA.pF^{-1}, n=17) et le courant 4-AP sensible (en bleu foncé : soustraction digitale du courant enregistré en TEA moins celui en TEA +4-AP, trace rose ; **Figure 67A et C**), présente une activation et une inactivation rapides, comparable à celle d'un courant de type I_A. En présence de TEA et de 4-AP, un courant résiduel persiste, et correspond vraisemblablement à un courant non-sélectif ou à un courant K^+ de fuite.

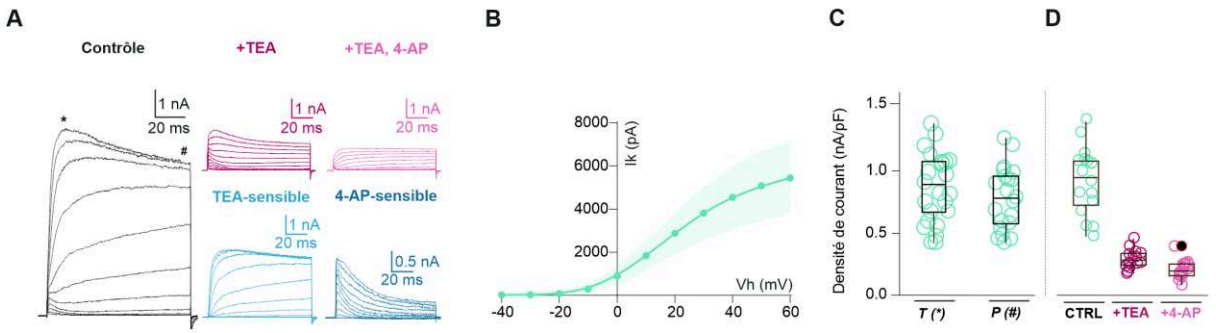


Figure 67 | Les Nc-LCS lombaires expriment des canaux potassiques voltage-dépendants TEA- et 4-AP-sensibles

(A) Traces représentatives, obtenues en réponse à un V_{step} de -40 à +60 mV (100 ms, Δ+10 mv), à partir de V_h -80 mV, pour induire des courants K^+ dans un Nc-LCS, en contrôle (trace noire) et en présence de 10 mM de TEA (trace pourpre) et en présence de TEA et de 4 mM de 4-AP (trace rose). Les courants TEA-sensibles (trace bleue) et 4-AP-sensibles (trace bleu foncé) sont aussi visibles en dessous. **(B)** Relation courant-voltage (courbe I-V moyenne) des courants K^+, enregistrés dans les Nc-LCS lombaires. **(C)** Boxplot de la densité moyenne de courant K^+, mesurée en contrôle au pic du courant transitoire (T,* : 855±58 pA.pF^{-1}) et persistant (P, # : 758±53 pA.pF^{-1}, n=21) (V_{step} +60 mV, à partir de V_h -80mV). **(D)** Boxplot de la densité moyenne du pic de courant K^+ (V_{step} +60 mV, à partir de V_h -80mV), en contrôle (en vert : 856±67 pA.pF^{-1}), en présence de TEA (en pourpre : 281±17 pA.pF^{-1}), et en présence de TEA + 4-AP (en rose : 196±16 pA.pF^{-1}, n=17).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les Nc-LCS lombaires expriment des canaux Na_v et K_v de type I_A et à I_{KD} qui sont à l'origine de la génération de PA. Par ailleurs, les Nc-LCS expriment aussi des Ca_v de type HVA et LVA fonctionnels. Ces expériences, ont été reproduites sur les segments cervical et thoracique et montrent des courants de densité similaires, excepté pour les Ca_v, où une différence significative entre les trois segments a été observée (Crozat et al., 2024 BioRxiv).

3- Les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs ionotropiques fonctionnels

Au niveau bulbaire, les Nc-LCS expriment des récepteurs ionotropiques GABAergiques (R-$GABA_A$), glycinergiques (R-Gly) (Orts-Del'Immagine et al., 2012), glutamatergiques AMPA/Kainate, et cholinergiques de type nicotiniques (R-nACh) fonctionnels (Orts Del'Immagine et al., 2015). Afin de caractériser la présence et la nature des récepteurs ionotropiques dans les Nc-LCS lombaires, des enregistrements en VC ont été réalisés à V_h -80 mV et des agonistes sélectifs des principaux récepteurs ionotropiques appliqués par pression.

a) Récepteurs glycinergiques et GABAergiques

L'application de glycine (1 mM, 100 ms ; **Figure 68A**) et de GABA (1 mM, 30 ms ; **Figure 68C**), induit des courants rapides entrants (E_{Cl}=+5 mV, cf Tableaux 4 ; Matériel et Méthodes) avec une densité de courant de -761±340 pA.pF^{-1} pour la glycine (-3484±851 pA, n=12 ; **Figure 68B**) et de -153±69 pA.pF^{-1} pour le GABA (-901±331 pA, n=12 ; **Figure 68D**). Ces courants sont bloqués en présence de strychnine (Stry,1 µM ; 93.7±4.4 %, n=7) et de gabazine (Gbz,10 µM ; 97.4±1.7 %, n=10), respectivement ; leurs antagonistes spécifiques. Ces résultats suggèrent ainsi que les Nc-LCS lombaires expriment également des R-Gly et des R-$GABA_A$ fonctionnels.

b) Récepteurs glutamatergiques AMPA et Kainate

L'application par pression de glutamate (100 µM, 500 ms), induit des courants entrants similaires à ceux obtenus dans les Nc-LCS bulbaires (Orts-Del'Immagine et al., 2012), c'est-à-dire, de faible amplitude, avec une cinétique lente (-1,9±0,9 pA.pF^{-1} et -10,5±5,6 pA ; en noir), et qui sont bloqués à 88,1±9,2 % par le DNQX (400 µM, trace pourpre, n=7 ; Figure **68E1 et F**). L'application d'AMPA (100 µM, 30 ms ; **Figure 68E2**) et de Kainate (100 µM, 30 ms ; **Figure 68E3**), des agonistes sélectifs des récepteurs glutamatergiques de type AMPA/Kainate génèrent des réponses similaires (-2,4±1,6 pA.pF^{-1}, n=6 et -6,5±4,5 pA.pF^{-1}, n=7 respectivement ; **Figure 68G**), alors que l'application de NMDA (100 µM), n'a pas évoqué de courant. Ces résultats indiquent que les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs

ionotropiques glutamatergiques de type AMPA/Kainate. En mode CC, à V_m -60 mV (injection de courant de +10 à -15 pA), l'activation des récepteurs AMPA/Kainate induit des dépolarisations de 13,4±10,7 mV qui sont rarement en mesure de déclencher des PA, au moins à un potentiel de membrane de -60 mV (n=9 ; **Figure 68J**). Ainsi, tout comme les Nc-LCS bulbaires, ceux de la région lombaire expriment des récepteurs glutamatergiques de type AMPA/Kainate fonctionnels qui présentent toutefois des amplitudes et des cinétiques particulières par rapport à celles observées dans d'autres populations neuronales.

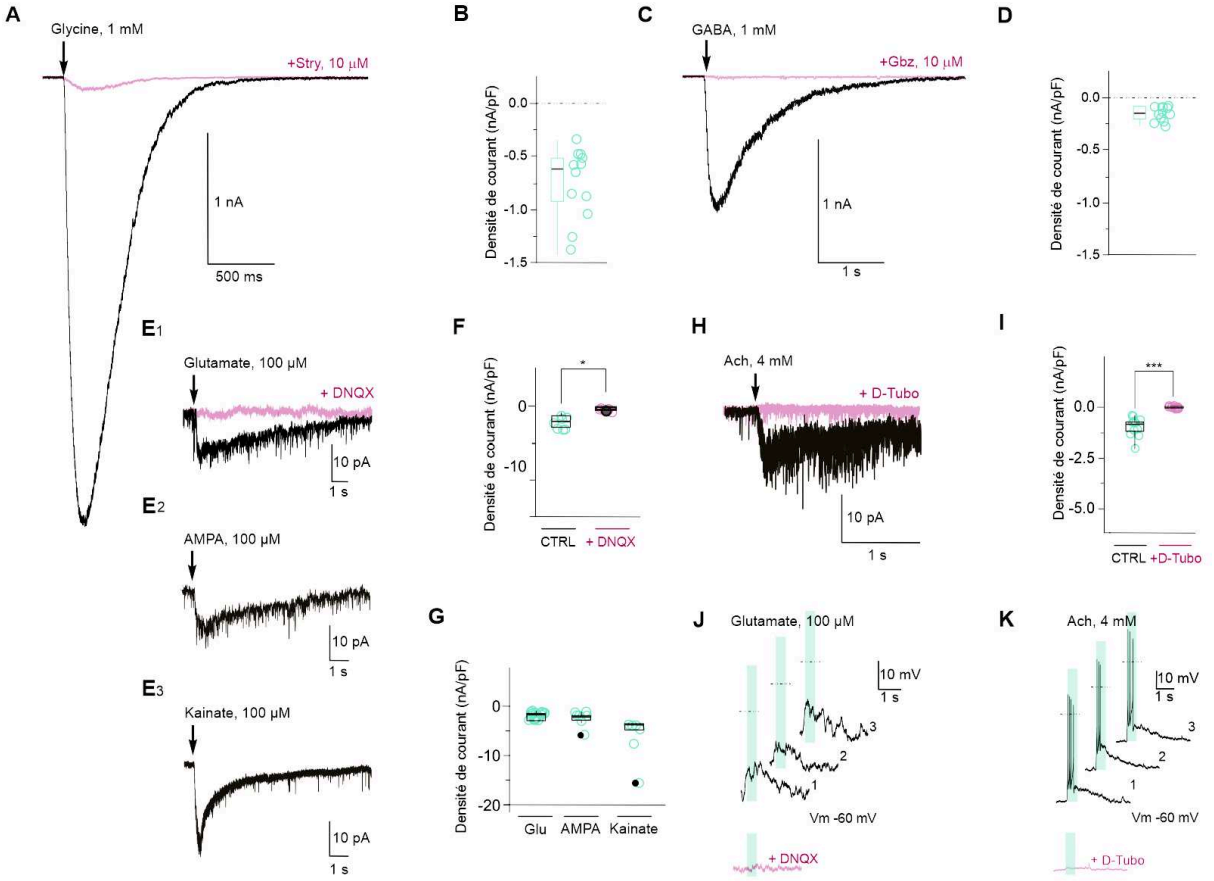


Figure 68| **Les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs ionotropiques R-Gly, R-GABA$_A$, R-Glu et R-nACh fonctionnels**

(A et C) Traces représentatives d'un courant glycinergique et GABAergique, enregistrés en cellule entière, à V_h -80 mV, en réponse à l'application par pression de glycine (1 mM, 100 ms) ou de GABA (1 mM, 30 ms), en absence (trace noire) ou en présence (trace pourpre) de strychnine (10 µM, antagoniste spécifique des R-Gly) ou de gabazine (Gbz,10 µM, antagoniste spécifique des R-GABA$_A$), respectivement. **(B et D)** Boxplot de la densité moyenne du courant glycinergique et GABAergique, enregistré à V_h -80 mV en contrôle (Strychnine : -761±340 pA.pF^{-1}, n=12 ; GABA : -153±69 pA.pF^{-1}, n=12). **(E1-3)** Traces représentatives de courants glutamatergiques, enregistrés en cellule entière, à V_h -80 mV, en réponse à l'application par pression de glutamate (100 µM, 500 ms ; E1), d'AMPA (100 µM, 30 ms ; E2) et de Kainate (100 µM, 30 ms ; E3), en absence (trace noire) ou en présence (trace pourpre) de DNQX (400 µM, antagoniste spécifique des R-Glu). **(F)** Boxplot de la densité moyenne de courant glutamatergique, enregistré à V_h -80 mV en contrôle (-1,9±0,9 pA.pF^{-1}) et en présence de DNQX (-0,23±0,18 pA.pF^{-1} ; Test de Wilcoxon, *p=0,0156 ; n=7). **(G)** Boxplot de la densité moyenne des courants glutamatergique, AMPA et Kainate, enregistrés à V_h -80 mV en contrôle (Glutamate : -1,8±0,7 pA.pF^{-1}, n=17 ; AMPA : -2,4±1,6 pA.pF^{-1}, n=6 et Kainate : -6,5±4,5 pA.pF^{-1}, n=7). **(H)** Traces représentatives du courant cholinergique, enregistrés en cellule entière, à V_h -80 mV, en réponse à l'application par pression d'acétylcholine (4 mM, 500 ms), en absence (trace noire) ou en présence (trace pourpre) de D-tubocurarine (D-Tubo, 100 µM, antagoniste spécifique des R-nACh). **(I)** Boxplot de la densité moyenne de courant cholinergique, enregistré à V_h -80 mV en contrôle (-0,95±0.2 pA.pF^{-1}) et en présence de D-Tubo (0,01±0,02 pA.pF^{-1} ; Test de Wilcoxon, ***p=0,0010 ; n=11). **(J et K)** Traces représentatives des changements de potentiels enregistrés à V_m -60 mV en CC dans un Nc-LCS, en réponse à l'application de glutamate (dépolarisation : +13±11 mV, nombre de PA : 0.4±1.0 ; J) ou d'acétylcholine (dépolarisation : +33±17 mV, nombre de PA : 1.8±1.5 ; K), en absence (trace noire) ou en présence (trace pourpre) de DNQX ou de D-Tubo, respectivement (ligne pointillée : 0 mV ; barre verte : application de l'agoniste respectif).

c) Récepteurs cholinergiques de type nicotinique

Nous avons finalement recherché l'expression de récepteurs cholinergiques de type nicotiniques (R-nACh) fonctionnels dans les Nc-LCS lombaires, par l'application par pression d'acétylcholine (ACh, 4 mM, 500 ms ; **Figure 68H**). Les conditions expérimentales ont été optimisées pour permettre l'enregistrement de courants nicotiniques (solution intracellulaire

à base de césium acétate CsAc-TEA ; cf Tableaux 3,4 et 5 ; Matériel et Méthodes). Les courants cholinergiques évoqués ont une densité de courant de -0,95±0.2 pA.pF^{-1} (-7,5±3 pA, trace noire ; n=11 ; **Figure 68I**) et sont bloqués à 99,9±2,2 %, par la D-tubocurarine, un antagoniste sélectif des R-nACh (D-Tubo, 100 µM, trace pourpre ; **Figure 68I**). En mode CC, à -60 mV (injection de courant de -10 à -20 pA, cf Tableaux 3,4 et 5 ; Matériel et Méthodes), l'application d'Ach induit des dépolarisations de 33,4±16,9 mV, qui déclenchent contrairement au glutamate, des PA dans la majorité des cas (n=6 ; **Figure 68K**).

Chez le rat nouveau-né, Marichal et collaborateurs (2009) ont montré que les Nc-LCS spinaux expriment des récepteurs purinergiques fonctionnels (Marichal et al., 2009). Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans les Nc-LCS lombaires chez la souris.

Ces résultats montrent que les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs $GABA_A$, glycinergiques, glutamatergiques de type AMPA/Kainate et cholinergiques de type nicotiniques fonctionnels. De plus, l'activation des R-nACh est capable de moduler l'excitabilité des Nc-LCS en déclenchant des PA.

4- Modulation des Ca_v par les récepteurs métabotropiques

Les Nc-LCS sont à l'interface entre le LCS, où transitent différentes molécules bioactives (neuropeptides et neurotransmetteurs), et le parenchyme, où ils semblent être intégrés à un réseau neuronal. L'ensemble des signaux environnants les Nc-LCS, est susceptible de moduler leur activité, notamment par l'intermédiaire de récepteurs métabotropiques. L'une des cibles majeures des récepteurs couplés au protéine G (RCPG), sont les Ca_V, dont l'expression fonctionnelle dans les Nc-LCS lombaires vient d'être décrite plus haut.

Pour mettre en évidence l'expression des RCGP activés par le GABA, l'acétylcholine et le glutamate, et pour savoir s'ils modulent l'activité des Ca_V, ceux-ci ont été activés à l'aide d'un saut de potentiel à +10 mV, pendant 100 ms, à partir de V_h -80 mV (pic du courant Ca^{2+}). Avant chaque saut de potentiel, un pré-step hyperpolarisant de 50 ms à -120 mV a été utilisé pour désactiver totalement les sous-types de canaux Ca^{2+}. Ce protocole a été répété toutes les 20 secondes, avant, pendant et après, l'application par pression d'agonistes spécifiques pour un RCPG donné.

a) Récepteurs métabotropiques du GABA (R-$GABA_B$)

Des travaux de l'équipe ont déjà montré, au niveau médullaire la présence de récepteurs métabotropiques $GABA_B$ (R-$GABA_B$), capables de moduler l'activité des Ca_v (Jurčić et al., 2019). C'est pourquoi, dans un premier temps, la modulation des Ca_v par les récepteurs $GABA_B$ (R-$GABA_B$) a été étudiée dans les Nc-LCS lombaires. En condition contrôle, le pic de densité du courant Ca^{2+} (I_{Ca}) est en moyenne de -56±22 pA.pF^{-1} (-338±181 pA) et diminue à -43±18 pA.pF^{-1} (-258±152 pA), pendant l'application de baclofène (Bcl, 100 µM, 40 s), un agoniste sélectif des R-$GABA_B$ (n=12 ; **Figure 69A et C**). L'inhibition médiée par le Bcl au cours du temps, est illustrée **Figure 69B** et atteint en moyenne 25±7 % (n=12 ; **Figure 69D**). L'effet du Bcl est réversible puisque l'amplitude du courant revient à des valeurs similaires à celles observées en contrôle pendant le lavage avec un retour à -48±21 pA.pF^{-1} **(Figure 69C)**. En présence de CGP 54626A (2 µM, un antagoniste des R-$GABA_B$), la densité du courant I_{Ca} est de -66±14 pA.pF^{-1} et l'application de Bcl n'entraine plus d'inhibition d'ICa (-66±15 pA.pF^{-1}, 0±4 % ; n=9 ; **Figure 69C et D**).

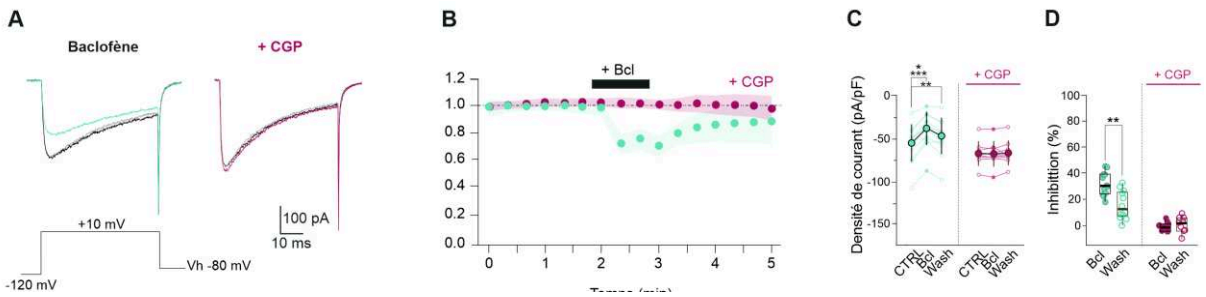


Figure 69 | Les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ sont fonctionnels dans les Nc-LCS lombaires et inhibent les canaux Ca_v

(A) Traces représentatives d'un courant Ca^{2+}, enregistré en cellule entière, à V_h -80 mV, avec un saut de potentiel de +10 mV, en contrôle (trace noire), pendant l'application de baclofène (Bcl, 100 µM, traces verte/pourpre), et après le lavage de l'agoniste (wash, en gris), en absence ou en présence de CGP (+CGP, 2 µM, à droite). **(B)** Amplitude moyenne du pic du courant Ca^{2+} au cours du temps, en absence (trace verte) ou en présence (trace pourpre) de CGP dans le bain. L'application de Bcl pendant 30 s, est matérialisée par la barre noire et les données sont normalisées par rapport à la période « contrôle » avant l'application d'agoniste (SD représenté). **(C)** Boxplot de la densité moyenne de courant Ca^{2+}, avant, pendant et après l'application de Bcl, en absence (vert : -56±22, -43±18 et -48±21 pA.pF^{-1}, n=12), ou en présence de CGP (-66±14, -66±15 et -65±15 pA.pF^{-1}, n=9 ; cercles foncés : mean+SD) (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ****p<0,0001 et **p=0,0066 ; n=12). **(D)** Boxplot du pourcentage moyen d'inhibition, induit par le Bcl sur les courants Ca^{2+}, par rapport à la période de wash, en absence (Inhibition : 32±9 et 16±11 %, n=12), ou en présence de CGP (Inhibition : 0±4 et 1±6 %, n=9) (Test de Wilcoxon, **p=0,0068 ; n=12).

b) Récepteurs métabotropiques de l'acétylcholine (R-mACh)

Nous avons dans un deuxième temps, recherché la présence de récepteurs métabotropiques de l'ACh, les récepteurs cholinergiques muscariniques (R-mACh), et leur possible modulation des I_{Ca}, a été analysé en utilisant le même protocole que décrit précédemment. En condition contrôle, le pic de densité de I_{Ca} est en moyenne de -50±10 pA.pF^{-1} (-233±130 pA), et diminue à -23±5 pA.pF^{-1} (-107±67 pA), pendant l'application d'oxo-M (n=16 ; **Figure 70A et C**). L'inhibition médiée par l'oxo-M au cours du temps est illustrée **Figure 70B** et indique que l'oxo-M induit une inhibition moyenne de 49±2 % (wash : 7±2 %, n=16 ; **Figure 70D**), et son effet est réversible, avec un retour à -44±9 pA.pF^{-1} **(Figure 70B et C)**. En présence d'atropine (2 µM, un antagoniste des R-mACh), la densité du courant I_{Ca} est de -56±9 pA.pF^{-1}, et l'application d'oxo-M n'entraine plus d'inhibition d'I_{Ca} (-44±6 pA.pF^{-1} et -35±6 pA.pF-1 ; inhibition : 21±9 % et 38±8 %, n=6 ; **Figure 70D**).

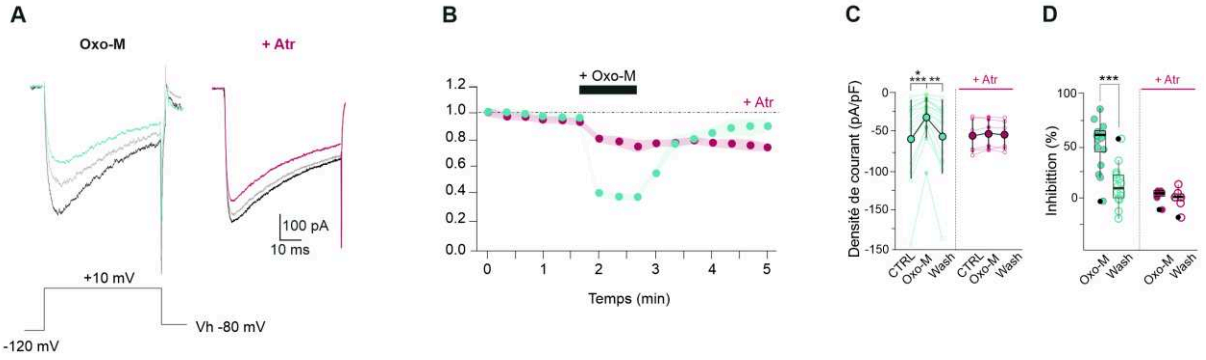


Figure 70 | Les récepteurs métabotropiques mACh sont fonctionnels dans les Nc-LCS lombaires et inhibent les canaux Ca_v

(A) Traces représentatives d'un courant Ca^{2+}, enregistré en cellule entière, à V_h -80 mV, avec un saut de potentiel de +10 mV, en contrôle (trace noire), pendant l'application d'oxotrémorine-M (oxo-M, 100 µM, traces verte/pourpre), et après le lavage de l'agoniste (wash, gris), en absence ou en présence d'Atropine (+Atr, 2 µM). **(B)** Amplitude moyenne du pic du courant Ca^{2+} au cours du temps, en absence (trace verte) ou en présence (trace pourpre) d'Atr dans le bain. L'application d'oxo-M pendant 30 s, est matérialisée par la barre noire et les données sont normalisées par rapport à la période « contrôle » avant l'application d'agoniste (SD représenté). **(C)** Boxplot de la densité moyenne de courant Ca^{2+}, avant, pendant et après l'application d'oxo-M, en absence (en vert : -50±10 pA.pF^{-1}, -23±5 pA.pF^{-1} et -44±9, n=16) ou en présence d'Atr (en pourpre : -56±9 pA.pF^{-1}, -44±6 et -35±6 pA.pF^{-1}, n=6 ; cercles foncés : mean+SD) (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, p<0,0001 et p=0,0044 ; n=16). **(D)** Boxplot du pourcentage moyen d'inhibition, induit par l'oxo-M sur les courants Ca^{2+}, par rapport à la période de Wash, en absence (Inhibition : 49±2 % et 7±2 %, en vert, n=16) ou en présence d'Atr (Inhibition : 21±9 % et 38±8 %, en pourpre, n=6 ; Test de Wilcoxon, ***p=0,0001 ; n=16).

Les Nc-LCS lombaires ne semblent pas exprimer de récepteurs métabotropiques du glutamate (R-mGlu) fonctionnels ou du moins qui moduleraient les Ca_V. En effet, l'application de glutamate (100 µM, 40 s) n'a pas entrainé de diminution du courant I_{Ca}.

Ces études ont permis de caractériser les propriétés des Nc-LCS *in vitro* par l'application de molécules exogènes et montrent que les Nc-LCS lombaires expriment des canaux voltage-dépendants de type Na_v, K_v et Ca_v et des récepteurs ionotropiques GABAergiques (R-$GABA_A$), glycinergiques (R-Gly), glutamatergiques AMPA/Kainate, et cholinergiques de type nicotiniques (R-nACh) fonctionnels. De plus, l'activation des récepteurs métabotropiques R-$GABA_B$ et R-mACh, inhibe les Ca_V postsynaptiques **(Figure 71)**. Ces résultats s'inscrivent dans une étude plus large dans laquelle les propriétés des Nc-LCS spinaux le long de l'axe rostro-caudal ont été analysées. Cette étude a mis en évidence que les Nc-LCS partagent des propriétés fonctionnelles similaires et forment globalement une population neuronale homogène, bien que quelques différences régionales existent (pour plus d'informations, cf Crozat et al., 2024 BioRxiv). Toutefois, il existe dans le LCS un ensemble de molécules bioactives (neurotransmetteur, neuropeptides et métabolites) susceptibles de moduler l'activité des Nc-LCS et notamment de PKD2L1, en conditions physiologiques voir pathologiques. L'un des enjeux à l'avenir sera d'identifier ses molécules et de déterminer dans quelle mesure elles régulent l'activité des Nc-LCS.

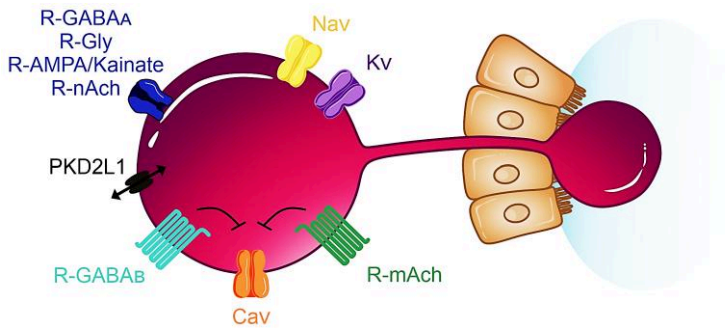


Figure 71| Schéma bilan des canaux et récepteurs exprimés par les Nc-LCS lombaires

B- Caractérisation anatomique et fonctionnelle des partenaires synaptiques des Nc-LCS lombaires

Orts et collaborateurs ont montré que chez la souris, les Nc-LCS bulbaires présentent une activité synaptique GABAergique et glycinergique spontanée. Cependant, ils n'ont pas été en mesure d'enregistrer d'activité synaptique spontanée excitatrice (Orts-Del'Immagine et al., 2012), bien que l'application exogène d'agonistes de ces récepteurs ait démontré leur expression fonctionnelle. Par ailleurs l'analyse de réponses synaptiques évoquées électriquement a permis de démontrer que les Nc-LCS bulbaires reçoivent des entrées synaptiques GABAergiques et glutamatergiques (Jurčić et al., 2019). Au vu de l'expression de récepteurs ionotropiques R-$GABA_A$, R-Gly, R-Glu et R-nACh par les Nc-LCS lombaires, il est cohérant de se demander quelle pourrait être la source de ses différents neurotransmetteurs.

Les larges courants activés par l'application exogène d'agonistes des R-$GABA_A$ et des R-Gly, ainsi que l'enregistrement d'activité synaptique spontanée, laissent supposer un fort contrôle inhibiteur sur les Nc-LCS. De plus, les courants glutamatergiques et cholinergiques bien que de faibles amplitudes, sont capables d'induire une dépolarisation et même de déclencher des PA (forte résistance membranaire des Nc-LCS), suggérant que l'activation des R-Glu et des R-nACh pourrait moduler leur excitabilité.

La compréhension du rôle des Nc-LCS lombaires comme modulateurs de l'activité motrice spinale, passe par l'étude de leur connectivité et vise à démontrer, s'ils sont insérés dans le réseau moteur spinal chez la souris. Cette étude représente un enjeu majeur pour une meilleure compréhension de la fonction des Nc-LCS lombaires chez les mammifères. Elle vise sur le plan anatomique, à caractériser les projections des Nc-LCS au niveau lombaire, et en parallèle, de démontrer que les connexions mises en évidence, sont fonctionnelles. Dans un deuxième temps, il s'agit d'identifier le phénotype de ces partenaires synaptiques. Cette étude a été initiée en collaboration avec l'équipe du Dr N Zampieri et a fait l'objet d'une publication récente. Celle-ci suggère au niveau anatomique, que les Nc-LCS établiraient des connexions récurrentes entre Nc-LCS et projetteraient notamment vers des interneurones du réseau moteur spinal, dont les V0c, V0/dl6-4 et V2a (Gerstmann et al., 2022). Toutefois, l'identité des interneurones au contact des Nc-LCS reste à être caractérisée fonctionnellement.

1- Caractérisation anatomique des partenaires pré- et postsynaptiques

L'étude anatomique de la connectivité des Nc-LCS lombaires s'inscrit dans la continuité de l'étude récemment publiée (Gerstmann et al., 2022) et se base sur l'utilisation de différents modèles de souris transgéniques. Pour identifier les voies de projection des Nc-LCS lombaires, des injections intracérébroventriculaires (ICV) d'AAV1-hSyn-EGFP ou d'AAV1-hSyn-mScarlet, ont été réalisées et permettent de tracer les projections axonales et les terminaisons synaptiques, par l'expression sélective de la synaptophysine (une protéine de la machinerie de la libération vésiculaire) couplée à des protéines fluorescentes (EGFP ou *m*Scarlet).

Les Nc-LCS sont les seuls neurones qui affleurent dans le CC bulbo-spinal et il a été mis en évidence qu'il est possible de les infecter sélectivement par l'injection ICV de virus AAV (Nakamura et al., 2023) et ce, sans avoir recours à une expression Cre-dépendante. Ces résultats ont récemment été confirmés par notre équipe (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Nous avons adapté cette approche dans des modèles de souris vGAT-venus et ChAT-tdTomato. Il est ainsi possible d'exprimer les transcrits EGFP- ou mScarlet-synaptophysine dans les Nc-LCS, chez des souris où les neurones GABAergiques ou cholinergiques sont marqués.

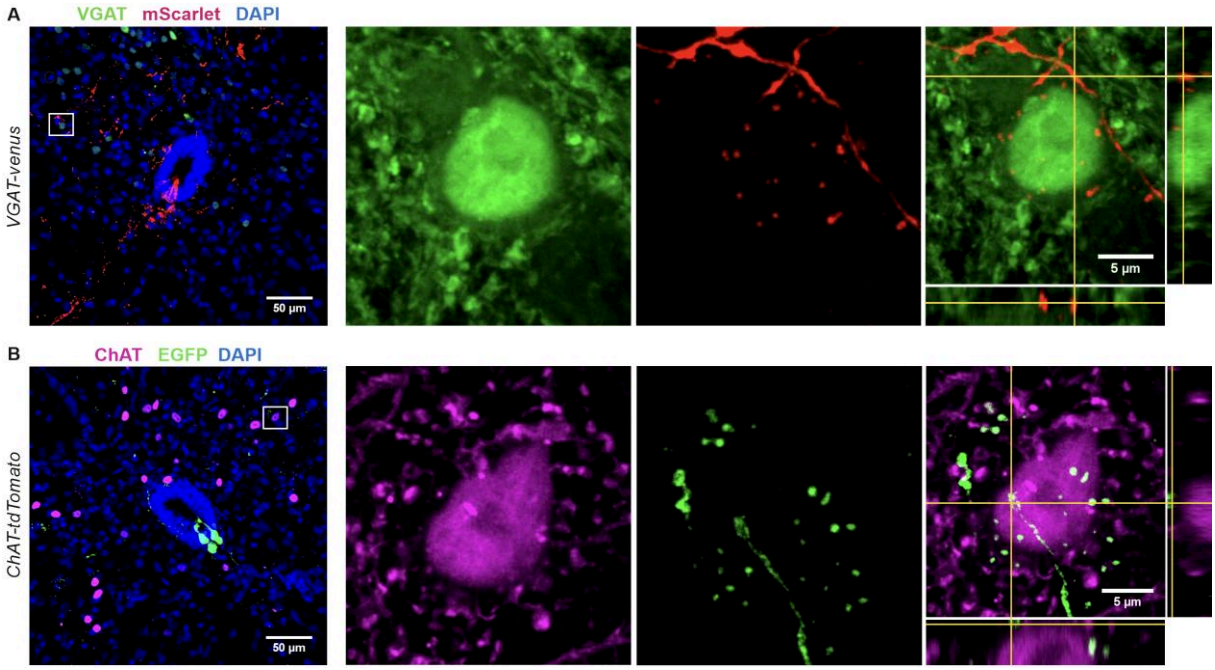


Figure 72| Les Nc-LCS projettent vers des neurones GABAergiques et cholinergiques de la ME lombaire

(A-B) Images (z-stack) en microscopie confocale de tranches coronales de ME lombaires de souris VGAT-venus **(A)** et ChAT-tdTomato **(B)** ayant reçu une injection ICV d'AAV1-hSyn-mScarlet ou d'AAV1-hSyn-EGFP, respectivement (rectangle : partie agrandie : neurone d'intérêt). Chez des souris VGAT-venus, des fibres ou des puncta mScarlet$^+$ (en rouge) sont observés autour du soma de cellules VGAT$^+$ (en vert), situées à dans les régions latérales du canal central (A). Chez des souris ChAT-tdTomato (B), où les neurones cholinergiques sont marqués par la tdTomato (en magenta), des fibres EGFP$^+$ (en vert) peuvent être observées à proximité d'interneurones latéro-médians (B).

Ces expériences ont été réalisées chez des animaux âgés entre 3 et 5 semaines pour assurer une infection des seuls NC-LCS. En effet à des âges plus précoces, la couche de cellules épendymaires bordant le canal central n'est pas étanche et l'infection par les AAV n'est pas sélective. Une autre approche pour permettre une infection sélective des Nc-LCS même chez des souris postnatales consistera à utiliser un système Cre-dépendant avec des constructions virales floxées injectées dans le modèle de souris PKD2L1-Cre. Cette approche n'a pas été développée dans le cadre de mon projet de thèse.

Les résultats montrent l'infection spécifique des Nc-LCS par les AAV1. Notez que l'infection est préférentiellement dirigée vers les Nc-LCS ventraux **(Figure 72A-B)** et dépendrait du sérotype, puisque Yue et collaborateurs ont montré que l'AAV2 est plus spécifique et marque les Nc-LCS tout autour du canal central (Yue et al., 2024). Chez des souris vGAT-venus, des fibres ou des puncta mScarlet$^+$ (en rouge) sont observés autour du soma de cellules GABAergiques vGAT$^+$ (en vert), situées à proximité du CC, dans les régions latérales **(Figure 72A)**. De plus, chez des souris ChAT-tdTomato, où les neurones cholinergiques sont marqués par la tdTomato (en magenta), des fibres EGFP$^+$ (en vert) peuvent être observées à proximité d'interneurones proches du CC **(Figure 72B)**. Ces résultats montrent que les neurones GABAergiques et cholinergiques de la ME lombaire reçoivent des projections des Nc-LCS et sont en accord avec les résultats anatomiques obtenus précédemment, en collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri (Gerstmann et al., 2022). Cette approche sera ultérieurement poursuivie chez des souris où les neurones glutamatergiques sont marqués, afin d'identifier des possibles contacts synaptiques issus des Nc-LCS.

2- Etude de la connectivité fonctionnelle pré/postsynaptique des Nc-LCS

En collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri, la stratégie de traçage neuronal monosynaptique rétrograde, avec le virus de la rage (VR) muté et pseudo-typé (VR-ΔG-EnvA),

chez des souris PKD2L1-cre, a démontré que les Nc-LCS forment un réseau de Nc-LCS interconnectés ascendant (axe postéro-antérieur) (Gerstmann et al., 2022). En parallèle, des analyses d'immunohistochimie et de RNAScope, sur des tranches de ME lombaires dans le modèle de souris PKD2L1-tdTomato, suggèrent des connexions entre Nc-LCS et les interneurones V0c, V0/dl6-4, V2a et potentiellement avec des motoneurones de la MMC (Gerstmann et al., 2022). Il s'agissait de confirmer au niveau fonctionnel ces connexions.

a) Validation du modèle optogénétique et de l'approche CRACM

Pour démontrer la connectivité fonctionnelle entre les Nc-LCS, les modèles de souris transgéniques PKD2L1-ChR2 ou PKD2L1-ChR2-tdTomato (expression de la ChR2 seule ou avec la tdTomato dans les Nc-LCS ; **Figure 73A**) ont été utilisés et la stratégie de ChR2-Assisted Circuit Mapping (CRACM) implémentée (Petreanu et al., 2007). Ainsi, grâce à l'expression sélective de la ChR2 dans les Nc-LCS et leurs terminaisons, il est possible de dépolariser les boutons synaptiques ChR2$^+$ des Nc-LCS par stimulations optogénétiques et de photo-évoquer la libération de GABA. Cette technique permet de cartographier les connexions entre un Nc-LCS ChR2$^+$ présynaptique, et un neurone postsynaptique (Nc-LCS ou interneurone), enregistré par la technique du patch-clamp.

Afin de nous assurer de la sélectivité de cette approche, nous avons validé la stratégie CRACM en vérifiant dans un premier temps la présence dans notre modèle, de photo-courants médiés par l'activation de la ChR2. Les Nc-LCS ChR2$^+$ ont été enregistrés en mode VC à un V_h de -70 mV et des pulses de lumière à 490 nm appliqués pendant 10 ms avec une intensité de 5 mW.mm^{-2}, minimale et suffisante pour activer la ChR2. Dans ces conditions, nous avons observé des courants entrants caractéristiques, qui présentent au début du pulse un front de monté rapide, suivi par une inactivation initiale et un courant persistant présent pendant toute la durée du pulse (**Figure 73B** et cf Figure S1 Gerstmann et al. 2022). L'analyse du photo-courant en fonction du voltage, indique que l'amplitude du courant (principalement porté par le Na^+ et le K^+) diminue pour des sauts de potentiel plus dépolarisés et qu'il s'annule à un potentiel proche de 0 mV ($V_{Rev\text{-}ChR2}$; **Figure 73C**).

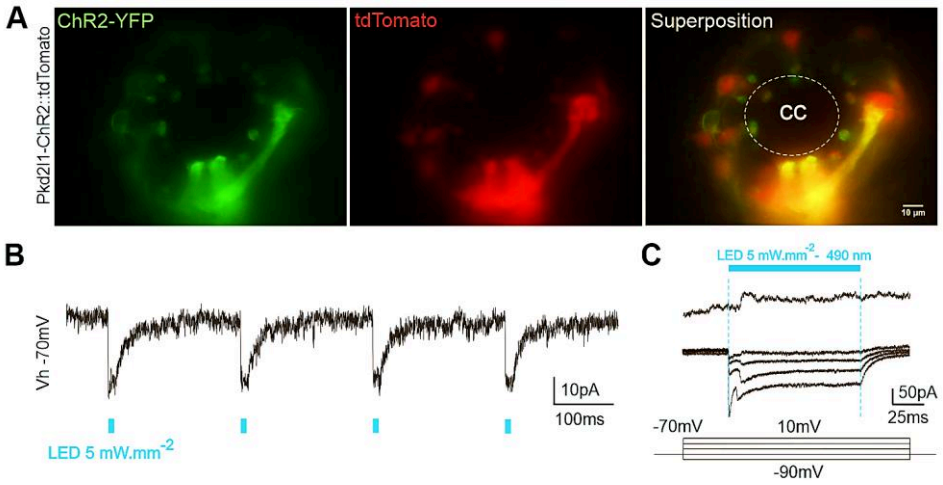


Figure 73| **Les canaux ChR2 sont fonctionnels dans les Nc-LCS de souris PKD2L1-ChR2 entre 3-6 semaines**

(A) Images en épifluorescence de Nc-LCS lombaires ChR2-tdTomato$^+$ autour du canal central (CC) sur une tranche aigue de moelle épinière lombaire (250 µm), de souris PKD2L1-Cre-ChR2-tdTomato, (de gauche à droite : image des Nc-LCS ChR2-YFP$^+$, tdTomato$^+$ et superposition des deux canaux). **(B)** Trace représentative d'un enregistrement en VC, de courants photo-évoqués par l'activation de la ChR2, à V_h -70 mV. L'application de pulse de lumière de 10 ms, induit des courants entrants composés d'une phase rapide d'activation et une phase de plateau, qui dure la durée de la stimulation. **(C)** Traces représentatives du photo-courant médié par l'activation de la ChR2, en fonction du potentiel (V_{Step} à partir de -90 mV, 100 ms, ΔV+20 mV), à partir de V_h -70 mV, en mode VC. Notez la diminution de l'amplitude du photo-courant avec les sauts de potentiels dépolarisants (nul pour 0 mV) et la présence d'un courant qui se développe après le début du photo-courant : courant entrant puis sortant pour des potentiels plus hyperpolarisés ou dépolarisés, respectivement.

Après avoir démontré la présence de photo-courants induits par la ChR2, dans les Nc-LCS ChR2$^+$, il s'agissait de vérifier s'ils étaient en mesure de déclencher des PA dans les Nc-LCS et ainsi à terme, d'induire une neurotransmission (libération de GABA) au niveau des boutons terminaux des Nc-LCS. L'équipe a montré qu'entre 2 et 6 semaines, l'exposition à un pulse de lumière des Nc-LCS ChR2$^+$ enregistrés en mode CC au RMP (≈60 mV), induit des PA pour un pulse de courte durée (10 ms) et le nombre de PA générés augmente avec la durée du pulse de lumière (cf Figure S1 Gerstmann et al., 2022). Ces courants photo-évoqués et la génération de PA sont médiés par l'activation de la ChR2. En effet, ces réponses n'ont pas été observées dans des Nc-LCS, d'animaux sauvages (C57BL6/J) ou d'animaux ChR2$^+$::Cre, enregistrés dans les mêmes conditions, dans des tranches de ME lombaires. Cependant, nous avons remarqué que pour des souris âgées de moins de 15 jours, les photo-courants évoqués dans les Nc-LCS, présentaient une amplitude de -40 pA qui n'était pas suffisante pour déclencher des PA, contre -82 pA entre 3 et 6 semaines. L'observation en épifluorescence de l'expression de la ChR2 dans les Nc-LCS, met en évidence chez des souris de plus de 15 jours, un halo de fluorescence YFP caractéristique et restreint à la membrane (insertion de ChR2-YFP), alors que pour des souris plus jeunes, la fluorescence est diffuse et présente dans le cytoplasme. Ce résultat suggère une expression de la ChR2 à la membrane insuffisante pour induire des photo-courants de grande amplitude et la décharge de PA chez des souris postnatales. Afin de nous assurer d'une expression suffisante de la ChR2 dans notre modèle, les expériences ont été réalisées avec des souris âgées de plus de 2 semaines.

b) Analyse de la connectivité entre Nc-LCS

Comme mentionné précédemment, les données de Gerstmann et collaborateurs (2022), indiquent que les Nc-LCS forment des contacts synaptiques avec les Nc-LCS situés dans des régions plus rostrales et établissent ainsi des connexions présynaptiques ascendantes. Nous avons confirmé ci-dessus, que, dans les modèles transgéniques (PKD2L1-ChR2 ou PKD2L1-ChR2-tdTomato) utilisés, les Nc-LCS expriment la ChR2 et sont capables de générer des photo-courants. Pour étudier la connectivité entre Nc-LCS, il a été nécessaire de s'affranchir des photo-courants dans le neurone enregistré (neurone postsynaptique), pour isoler les seules réponses synaptiques photo-évoquées, à partir des terminaisons des Nc-LCS présynaptiques. La validation du modèle optogénétique indique que le potentiel d'inversion ($E_{Rev\text{-}ChR2}$) du photo-courant est de ≈0 mV. Ainsi, en enregistrant les Nc-LCS à V_h 0 mV, un potentiel pour lequel le photo-courant est nul, et avec une solution intracellulaire de K-Gluconate (E_{Cl}=$V_{Rev\text{-}GABA}$ ≈-60 mV et une force électromotrice pour le chlore de V_h-$V_{Rev\text{-}GABA}$= 0 - (-60) = 60 mV), il est possible d'isoler les seuls courants synaptiques GABAergiques **(Figure 74A)**.

L'application de pulses de lumière de 10 ms à travers l'objectif, évoque à V_h 0 mV, des réponses synaptiques dans 71 % des Nc-LCS enregistrés (22/31), avec une latence de 9,32±3,3 ms (n=16). Ces réponses sont caractérisées par des courants sortants avec une amplitude de 30,8±30,6 pA **(Figure 74B)**. Ils présentent un front de monté rapide et un retour τ exponentiel (decay time 10-90% : 52,6±36,4 ms ; n=16) caractéristique d'un courant synaptique. On constate que l'application répétée de pulses de lumière, induit des réponses synaptiques stables **(Figure 74C1 et C2)** avec un taux d'échec qui passe de 16 à 28 % entre la 1ère et la 4ème stimulation, respectivement (n=16 ; **Figure 74C3**). En revanche, les courants photo-évoqués sont complètement bloqués par l'ajout de gabazine et de picrotoxine (1,96±8,53 pA ; Gbz, 10 µM et Ptx, 100 µM ; inhibition de 95±19 %, n=19) dans le bain, confirmant la nature GABAergique de la neurotransmission, médiée par les R-$GABA_A$ **(Figure 74B et D)** (Test de Wilcoxon, ****p<0,0001, n=19) **(Figure 74E)**.

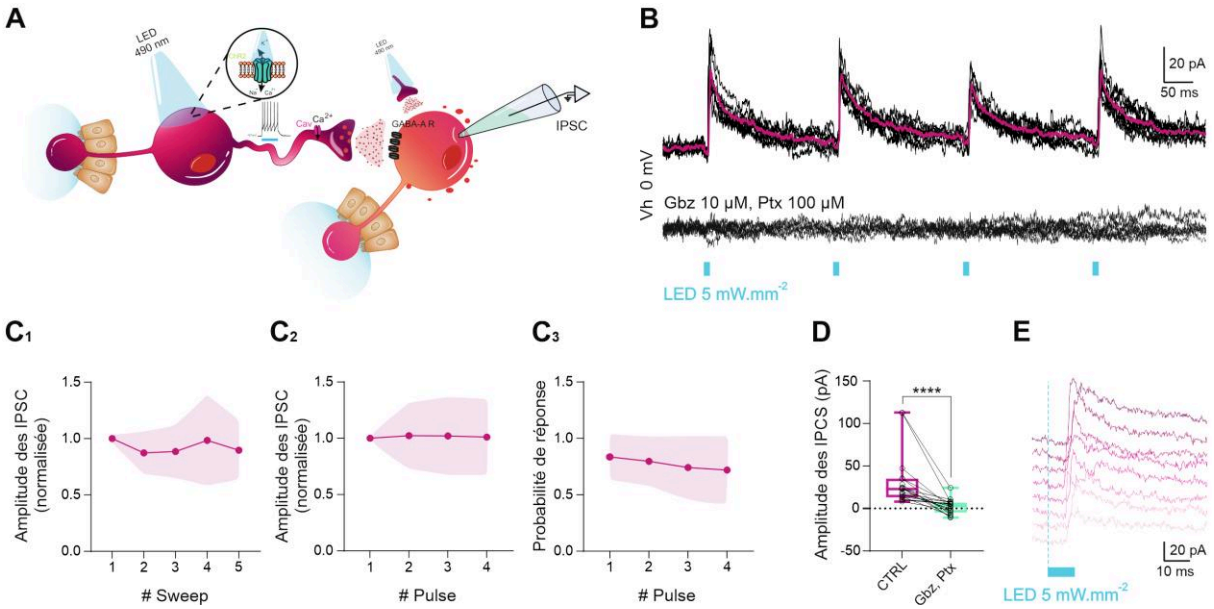


Figure 74 | Les Nc-LCS sont connectés entre eux et établissent des connexions récurrentes

(A) Schéma de la technique CRACM. La lumière stimule le soma ou les terminaisons synaptiques des Nc-LCS ChR2$^+$ présynaptiques et un Nc-LCS est enregistré en patch-clamp. **(B)** Traces représentatives d'un enregistrement en VC, de courants photo-évoqués, à V_h 0 mV. L'application de pulse de lumière de 10 ms, induit des courants sortants qui sont inhibés par l'ajout de Gz et de Ptx. **(C1)** Amplitude normalisée des IPSC photo-évoqués lors de la 1ère stimulation, en fonction des répétitions (sweep ; n=16). **(C2)** Amplitude normalisée des IPSC photo-évoqués pour chaque stimulation (n=16). **(C3)** Probabilité de réponse pour chaque stimulation (n=16). **(D)** Boxplot de l'amplitude des IPSC en contrôle (en pourpre) et en présence de Gbz et Ptx (en vert ; Test de Wilcoxon, ****p<0,0001, n=19). **(E)** Agrandissement de 8 IPSC photo-évoqués.

Pour conclure, les Nc-LCS effectuent des connexions récurrentes ascendantes, à priori avec des Nc-LCS localisés dans des segments rostraux. Par ailleurs, la neurotransmission observée est exclusivement GABAergiques et vraisemblablement monosynaptique, de Nc-LCS vers Nc-LCS. Le fait que 71 % des Nc-LCS soient interconnectés fonctionnellement, corrobore les données anatomiques, qui montrent que 85 % des contacts présynaptiques sur les Nc-LCS proviennent de Nc-LCS localisés dans des segments plus caudaux. Les contacts synaptiques restants proviendraient d'interneurones locaux majoritairement inhibiteurs (Gerstmann et al., 2022), qu'il s'agit à ce jour d'identifier.

c) Les Nc-LCS forment des connexions fonctionnelles avec des interneurones lombaires spinaux

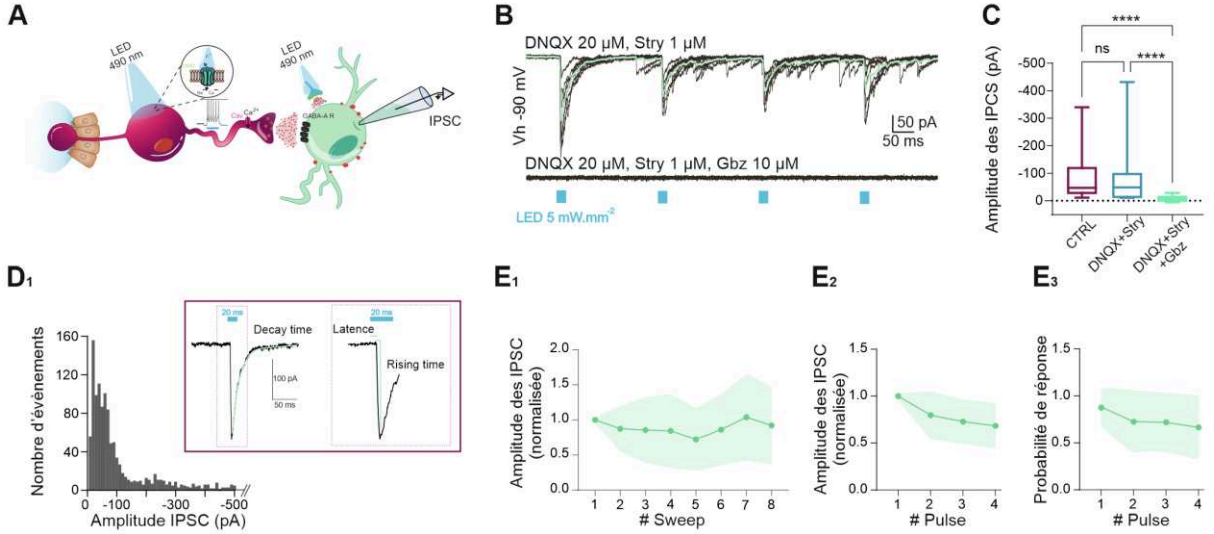
Afin de confirmer les données anatomiques, qui montrent que les Nc-LCS projettent vers des interneurones majeurs du réseau moteur spinal, dont les V0c, V0/dI6-4 et V2a (Gerstmann et al., 2022), la connectivité fonctionnelle entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires a été testée. Pour cela, la stratégie de CRACM a été utilisée, dans le modèle de souris transgénique PKD2L1-ChR2. Les neurones cibles et potentiellement connectés aux Nc-LCS ont été identifiés par la présence de puncta YFP$^+$ autour de leur soma, indiquant la présence de terminaisons synaptiques issues des Nc-LCS. Nous avons également utilisé le modèle de souris PKD2L1-ChR2-tdTomato, qui permet de visualiser par la fluorescence tdTomato les fibres axonales et les boutons synaptiques des Nc-LCS autour d'interneurones cibles, sans activer la ChR2 **(Figure 75A)**.

Ainsi, les neurones d'intérêts ont été enregistrés en patch-clamp en mode VC à un V_h de -90 mV avec une solution intracellulaire à base de KCl et un potentiel d'équilibre pour le chlore $E_{Cl} \approx 0$ mV (ou le courant GABAergique ; $E_{Cl}=V_{Rev\text{-}GABA}$). Ces conditions expérimentales permettent d'avoir une force électromotrice élevée pour les ions chlorures et de favoriser l'enregistrement de courants synaptiques GABAergiques, de plus grande amplitude (force électromotrice : $V_h - V_{Rev\text{-}GABA} = -90 - 0 = -90$ mV). Une fois la configuration cellule-entière

établie, la stimulation à l'aide de pulses de lumière (20 ms - 490 nm - 5 $mW.mm^{-2}$), induit dans le neurone cible enregistré, des courants synaptiques entrants en accord avec E_{Cl} (cf Tableau 4 ; Matériel et Méthodes ; **Figure 75B**). En moyenne, la latence des courants synaptiques était de 11,5±5,4 ms (n=39 ; **Figure 75D2**) et la photoactivation des terminaisons des Nc-LCS a évoqué des réponses synaptiques dans 15 % des interneurones enregistrés (147/982). Ces réponses sont caractérisées par des courants entrants **(Figure 75B)**, avec une amplitude moyenne de -184±294 pA (amplitude minimale et maximale : -12 et -1285 pA) en condition contrôle, et de -151±221 pA après l'ajout de DNQX (20 µM) et de strychnine (1 µM) dans le bain (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ****p<0,0001, n=39 ; **Figure 75C**). L'amplitude des IPSC photo-évoqués, illustrée sur l'histogramme de distribution **(Figure 75D1)**, montre une grande variabilité. La majorité des évènements a une amplitude supérieure à -100 pA, bien qu'ils soient compris entre -6 et -2034 pA. Pour des raisons de clarté, les courants d'amplitude inférieure à -500 pA, n'ont pas été intégrés au graphique.

Les réponses évoquées étaient stables et reproductibles dans le temps **(Figure 75E1)** avec une variation de 8,4 % entre la 1ère et la 8ème stimulation, enregistrées avec un intervalle de temps de 5 s (n=23). Par ailleurs, les enregistrements ont été réalisés en appliquant 4 pulses successifs avec un délai de 200 ms et les réponses présentaient une dépression progressive (n=28 ; **Figure 75E2**) et un taux d'échec qui passe de 13 à 32 % entre la 1ère et la 4ème stimulation, respectivement (n=40 ; **Figure 75E3**).

Les courants photo-évoqués sont complètement bloqués par l'ajout de gabazine, antagoniste des R-$GABA_A$ (Gbz, 10 µM ; -7,94±4,88 pA ; Inhibition : 85 %, n=39 ; **Figure 76B et C**), confirmant la nature GABAergique de la neurotransmission, médiée par l'activation des R-$GABA_A$ (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ****p<0,0001, n=39). La nature GABAergique des réponses synaptiques enregistrées est confirmée par l'analyse des propriétés cinétiques du courant, qui présente un front de montée rapide (10-90% rise time : 2,6±1,3 ms, n=27 ; **Figure 76D3**) et un décours temporel exponentiel τ lent (decay time : 26,0±14,6 ms ; n=26 ; **Figure 76D4**). Pour s'assurer que la neurotransmission évoquée, médiée par les Nc-LCS, est strictement GABAergique, les enregistrements ont également été reproduits en condition contrôle et en présence seulement de gabazine dans le bain. La gabazine (Gbz, 10 µM) bloque significativement les courants photo-évoqués, qui passent d'une amplitude de -27±27 pA à -0,8±0,9 pA, avec une inhibition de 96±4 % (Test de Wilcoxon, *p=0,031 ; n=6 ; **Figure 76F et G**), démontrant la nature purement GABAergique de la neurotransmission.



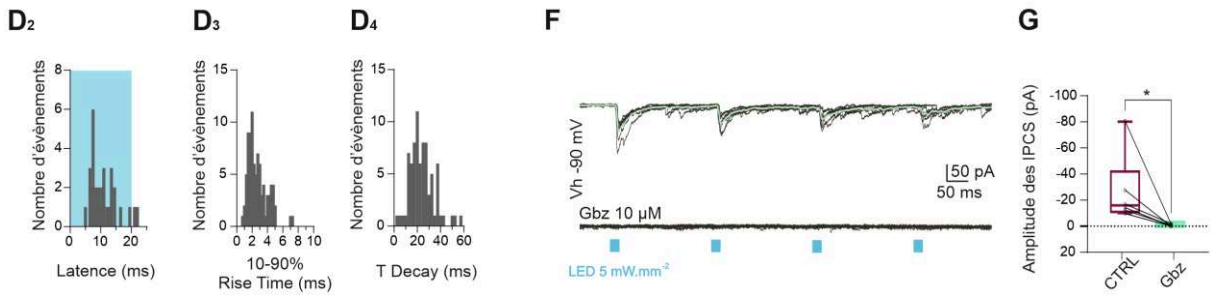


Figure 75| **Les Nc-LCS forment des contacts synaptiques fonctionnels avec des interneurones spinaux**

(A) Schéma représentatif de l'enregistrement en patch-clamp d'un interneurone entouré de boutons synaptiques ChR2$^+$/tdTomato$^+$, par l'approche CRACM. **(B)** Traces représentatives de courants entrants (ECl≈0 mV), photo-évoqués dans un interneurone, enregistré en VC, à V_h -90 mV (20 ms, 5 mW.mm^{-2}, Δ200 ms ; toutes les 5 s), en présence de 20 µM de DNQX et 1 µM de strychnine (en haut) et avec l'ajout de 10 µM de Gbz dans le bain (en bas). **(C)** Boxplot de l'amplitude des IPSC en contrôle (-183,8±293,9 pA, en pourpre), en présence de DNQX et de strychnine (-150,9±221,3 pA, 20 µM et 1 µM respectivement, en bleu) et en présence de Gbz (-7,94±4,88 pA, 10 µM, en vert) (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ****p<0,0001, n=39). Notez que pour des raisons de clarté, les courants d'amplitude inférieures à -500 pA, n'ont pas été intégrés au graphique. **(D1-4)** Distribution de l'amplitude des IPSC (D1 ; -165,92±239,57 pA ; n=39), la latence (D2 ; 11,47±5,43 ms ; n=39), 10-90% rise time (D3 ; 2,59±1,27 ms ; n=27) et le decay time τ (D4 ; 26,03±14,57 ms ; n=26), enregistrées lors du 1er stimulus. **(E1)** Amplitude normalisée des IPSC photo-évoqués lors de la 1ère stimulation, en fonction des répétitions (sweep ; n=23). **(E2)** Amplitude normalisée des IPSC photo-évoqués pour chaque stimulation (n=28). **(E3)** Quantification de la probabilité de réponse pour chaque stimulation (n=40). **(F)** Traces représentatives de courants entrants photo-évoqués dans un interneurone, enregistrés en VC, à V_h -90 mV (ECl≈0 mV), par des pulse lumineux (20 ms, 5 mW.mm-2, Δt 200 ms ; toutes les 5 s), en contrôle (en haut, en vert : trace moyenne de 8 sweeps) et avec l'ajout seul de 10 µM de Gbz dans le bain. **(G)** Boxplot de l'amplitude des IPSC en contrôle (-26,96±27,10 pA ; en pourpre), et en présence de Gbz (-0,75±0,86 pA ; 10 µM, en vert) (Test de Wilcoxon, *p=0,031 ; n=6).

Les réponses synaptiques évoquées dans les interneurones enregistrés persistent en présence de DNQX et présentent un jitter time similaire **(Figure 76A)**, suggérant une connexion directe ou monosynaptique des Nc-LCS sur l'interneurone. Pour confirmer ce résultat, nous avons utilisé un protocole pharmacologique en présence de TTX et 4-AP couramment utilisé avec la stratégie CRACM pour démontrer la nature monosynaptique d'une connexion **(Figure 76B)**. D'abord, les enregistrements ont été réalisés en présence de DNQX et de strychnine, et les IPSC avaient une amplitude de -44 ±41 pA (20 µM et 1 µM respectivement, en bleu ; n=10). L'ajout de TTX (1 µM) dans le bain, a fortement inhibé ces courants synaptiques (-7±3 pA, en rose ; n=10) mais l'ajout de 4-AP, un bloqueur des canaux potassiques, a permis de récupérer certaines réponses synaptique (-17±23 pA, 100 µM, en violet ; n=3/10) (Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ***p=0,002 ; *p=0,022 ; n=10 ; **Figure 76B**).

Sur la base des découvertes anatomiques faites par Gerstmann et ses collaborateurs (Gerstmann et al., 2022), les interneurones ventraux-médians localisés autour du canal central ont été particulièrement ciblés **(Figure 76C)**. Les interneurones connectés aux Nc-LCS sont localisés à une distance, en x de 67±22 µm et en y de 0,54±15 µm (n=118) du canal central, et l'aire de leur corps cellulaire est en moyenne de 161,9±37,6 µm² (n=131 ; **Figure 76D**).

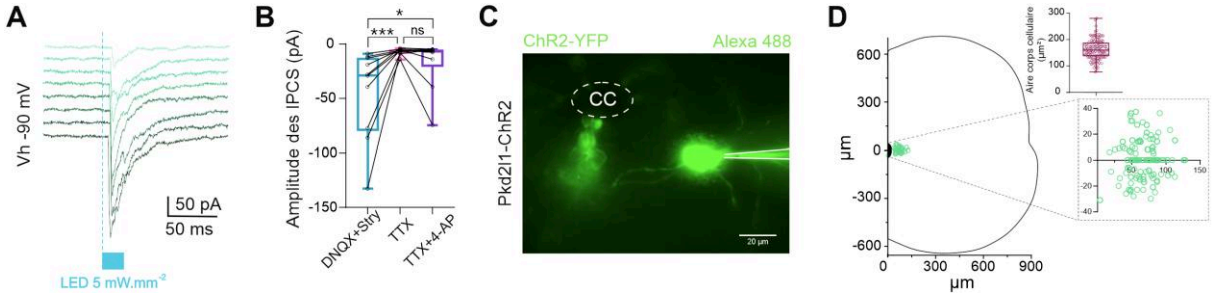


Figure 76| **Les Nc-LCS sont connectés avec des interneurones spinaux au niveau lombaire**

(A) Agrandissement des 8 sweeps du 1er stimulus lumineux. **(B)** Boxplot de l'amplitude des IPSC en DNQX et en strychnine (-44 ±41 pA, 20 µM et 1 µM respectivement ; en bleu), avec l'ajout de TTX (-7±3 pA, 1 µM ; en rose) et en présence de TTX et de 4-AP (-17±23 pA, 1 µM et 100 µM respectivement, en violet ; n=10). Test ANOVA et un test post hoc de comparaisons multiples avec un test de Friedman, ***p=0,002 ; *p=0,022 ; n=10. **(C)** Image en épifluorescence d'Nc-LCS lombaires ChR2$^+$ autour du canal central (CC) et d'un interneurone connecté enregistré en patch-clamp, dyalisé avec de l'Alexa 488 (via l'électrode de patch), sur une tranche aigue de ME lombaire (300 µm), de souris PKD2L1-ChR2. **(D)** Représentation d'une demi-moelle épinière lombaire et la localisation des interneurones enregistrés connectés aux Nc-

LCS (en vert), à une distance de 67±22 µm en x et de 0,54±15 µm en y (n=118) du CC. L'aire de leur soma est en moyenne de 161,9±37,6 µm² (en pourpre, n=131).

Dans leur ensemble, nos résultats indiquent que les Nc-LCS forment des connections synaptiques fonctionnelles avec des interneurones qui sont principalement localisés dans la région ventro-médiane de la ME et dans une zone qui s'étend sur ≈150 µm autour du CC. Dans nos conditions expérimentales, la connectivité apparait faible mais cela peut s'expliquer par la préparation utilisée (cf discussion pour plus de détail) et semblerait être monosynaptique, c'est-à-dire que les Nc-LCS semblent projeter directement sur les interneurones enregistrés. En accord avec leur phénotype GABAergique, l'activation des Nc-LCS induit des courants synaptiques GABAergiques dans les interneurones qui sont reproductibles et présentent une faible dépression dans le temps. L'analyse de la morphologie suggère que les Nc-LCS projettent vers des interneurones de différents sous-types qui présenteraient des propriétés différentes. Dans la section suivante, je présente les données obtenues pour caractériser leurs propriétés.

d) Propriétés des interneurones postsynaptiques aux Nc-LCS

Les propriétés intrinsèques des interneurones connectés ont été déterminées en mode VC à l'aide d'un saut de potentiel de -10 mV pendant 100 ms à partir de V_h -70 mV. La résistance d'entrée ou membranaire r_m était en moyenne de 740±420 MΩ (n=133) et variable entre les différents neurones enregistrés (maximum : 2680 MΩ et minimum : 100 MΩ). Ils possèdent une grande capacité membranaire c_m de 45±17 pF et une constante de temps membranaire τ_m lente de 0,7±0,3 s (n=133 ; **Figure 77A**), en accord avec la taille de leur soma (cf au-dessus). Le potentiel de repos membranaire (RMP) a été déterminé en mode courant-imposé (CC, I=0), et les interneurones présentent en moyenne un RMP de -65±13 mV (n=133). En comparant la valeur de RMP dans la population d'interneurones enregistrés, nos données indiquent qu'ils présentent des valeurs différentes. Finalement, les interneurones moteurs possèdent des propriétés de décharges différentes en fonction de leur phénotype. Afin de déterminer le patron de décharge de PA des neurones enregistrés, les interneurones ont été enregistrés en mode CC au RMP et un créneau de courant à été injecté (I_{Step} de -90 pA, 500 ms, ΔI_{inj}10 pA). L'injection d'un saut de courant de 200 pA, induit la décharge de PA et indique que 68 % des interneurones présentent un patron de décharge dit « retardé » (n=73/107), et 32 % sont « immédiats » (n=34/107 ; **Figure 77A et B**) De plus, 10 % d'entre eux avaient une décharge de PA spontanée et 79 % présentaient un courant Ih, activé par un saut de courant hyperpolarisé. Ces résultats montrent une certaine variabilité **(Figure 77A)**, suggérant la présence de plusieurs populations d'interneurones postsynaptiques aux Nc-LCS.

A

Rm (GΩ)	τ(s)	Cm(pF)	Vm (mV)
0,74±0,4	0,65±0,3	45±17	-65±15

Retardé	Immédiat	Spontanée	PIR	SAG (Ih mV)	
73/107	34/107	13/133	4/133	105/133	8±4

Rin(MΩ)	Rhéo (pA)	Thresh(mV)	Peak AP (mV)	Peak AHP (mV)
556±169	49±24	-30±10	63±12	-33±7

B

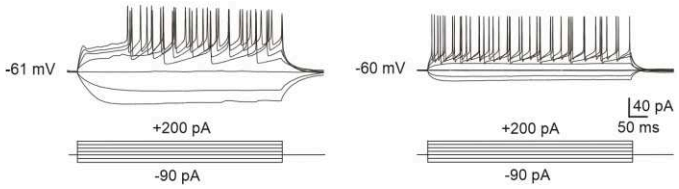


Figure 77| **Propriétés électrophysiologiques des interneurones postsynaptiques**

(A) Propriétés intrinsèques des interneurones spinaux connectés (n=133). **(B)** Traces représentatives des deux types de patrons de décharge enregistrés dans les interneurones connectés : une décharge de PA dite « retardée » (à gauche) et « immédiate » (à droite), enregistrés à RMP ≈ 60 mV, lors de l'injection de sauts de courant (I_{Step} de -90 pA, 525 ms, Δ10 pA).

3- Identification des partenaires postsynaptiques des Nc-LCS par single cell RT-PCR

Les données recueillies et l'analyses des propriétés des interneurones connectés au Nc-LCS indiquent, qu'ils possèdent une morphologie et une localisation autour du canal central différentes, ainsi que des patrons de décharge de PA d'au moins deux types (immédiat et retardé). Ces éléments suggèrent que les Nc-LCS projetteraient vers différentes populations d'interneurones moteurs qu'il est nécessaire d'identifier. Pour déterminer l'identité des partenaires postsynaptiques des Nc-LCS, nous avons ainsi développé une approche par RT-PCR sur cellule unique, qui consiste à récolter le cytoplasme d'interneurones connectés après leurs enregistrements en patch-clamp. Ainsi, une fois la connectivité fonctionnelle avec les Nc-LCS mise en évidence par la stratégie CRACM **(Figure 78A)**, et leurs propriétés intrinsèques enregistrées, le cytoplasme des cellules a été aspiré, et leur profil moléculaire déterminé par RT-qPCR. Après prélèvement du contenu cellulaire, les échantillons subissent une lyse pour récupérer les ARNm. Ceux-ci sont ensuite convertis en ADNc par rétrotranscription, à l'aide d'amorces oligo-dT qui se lient aux queues polyA des ARNm, permettant ainsi à l'enzyme de former des ADNc. L'ADNc est ensuite amplifié par PCR et une qPCR en temps réel permet de quantifier l'expression des transcrits avec des amorces spécifiques **(Figure 78B)** (cf Matériel et Méthodes, Section 4f).

Pour vérifier la qualité du matériel génétique, une première PCR est réalisée pour amplifier d'une part les transcrits de l'actine, comme gène de ménage, et d'autre part de vGluT, GAD67 et ChAT pour caractériser le phénotype glutamatergique, GABAergique et cholinergique des interneurones enregistrés, respectivement (cf Matériel et Méthodes, Section 4f). Pour pallier la variabilité des prélèvements et de la quantité de matériel génétique obtenue, les données recueillies par qPCR ont été normalisées par rapport à la mesure de l'actine. L'expression ou l'absence d'au minimum quatre FT, ainsi que la cohérence des résultats obtenus (expression d'un code de FT précis), ont servies de critères d'inclusion. Par ailleurs, nous avons vérifié la spécificité de notre approche de RT-qPCR sur cellule unique en vérifiant l'absence de transcrit sur des échantillons ne contenant que de l'eau, que de l'aCSF ou des débris aspirés dans la tranche de ME (contrôles négatifs). Par ailleurs, nous avons prélevé le cytoplasme de Nc-LCS et vérifié que les échantillons contenaient des transcrits pour PKD2L1, le marqueur spécifique de cette population neuronale.



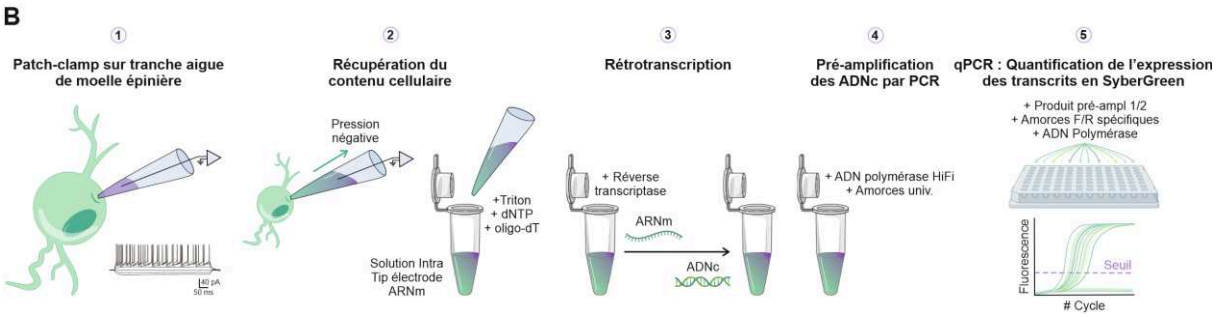
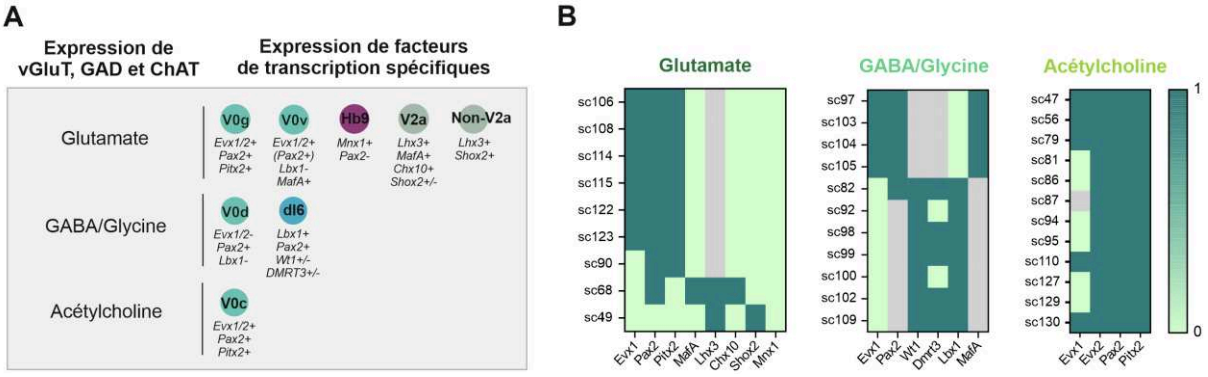


Figure 78| **Procédure de prélèvement des cellules d'intérêt pour l'analyse du profil moléculaire par RT-qPCR**

(A) Images en épifluorescence de Nc-LCS lombaires tdTomato-ChR2$^+$ autour du canal central (CC) sur une tranche aigue de ME lombaire (300 µm), de souris PKD2L1-ChR2-tdTomato. Un interneurone connecté est enregistré en patch-clamp et dyalisé avec l'Alexa Hydrazide 488 *via* l'électrode de patch (de gauche à droite : image des Nc-LCS tdTomato$^+$, ChR2$^+$ et superposition des deux canaux). **(B)** Représentation schématique de l'enregistrement en patch-clamp des cellules d'intérêts, du prélèvement des cytoplasmes, de la rétrotranscription des ARNm en ADNc, de leur pré-amplification et de la quantification de l'expression des transcrits par qPCR en SyberGreen. La représentation graphique des données de PCR en temps réel, avec la fluorescence en fonction du cycle d'amplification permet d'obtenir le Ct. Le Ct (cycle de seuil) correspond à l'intersection entre une courbe d'amplification et une ligne de seuil. Il correspond à une mesure relative de la concentration du transcrit dans la réaction de PCR.

Les interneurones moteurs font partie de populations neuronales glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques et se subdivisent en plusieurs sous-type en fonction de l'expression de facteurs, ou d'une combinaison de facteurs de transcription (cf Introduction, Partie C et **Figure 79A**). Ainsi, une fois le phénotype « majeur » des interneurones identifié, l'étude a été affinée à la recherche de facteurs de transcription (FT) spécifiques des sous-populations d'interneurones moteurs spinaux : V0, Hb9, V2 et dl6. Ces populations ont été ciblées sur la base des résultats anatomiques obtenus dans notre précédente étude, qui indiquait, des connexions possibles entre les Nc-LCS et ces sous-types d'interneurones (Gerstmann et al., 2022).

Cette approche a permis d'identifier le profil moléculaire de 32 des 48 interneurones enregistrés et a mis en évidence que les Nc-LCS sont connectés à des interneurones glutamatergiques (n=9/32, 28 %), GABAergiques (n=11/32, 34 %) et cholinergiques (n=12/32, 38 %). L'analyse de l'expression des FT montre que quatre grands groupes cellulaires se distinguent sur les Heatmaps **(Figure 79B)**. Parmi les 9 neurones glutamatergiques identifiés, un groupe de 7 cellules, exprime les FT Evx1 (+/-), Pax2 et Pitx2 et semble ainsi correspondre à des interneurones V0g. En plus de cette classe d'interneurones, deux autres sous-types minoritaires, ont été identifiés comme appartenant aux interneurones V2, avec la présence des FT Lhx3, MafA et Chx10 pour V2a, alors que l'interneurones Non-V2a exprime Lhx3 et Shox2 **(Figure 79C)**. Les 11 neurones GABAergiques, comptent un groupe de 4 neurones qui expriment les FT Evx1, Pax2 et MafA, correspondant à des interneurones V0v, tandis que les 7 cellules restantes, expriment les FT Pax2 (+/-), Wt1, Dmrt3 (+/-) et Lbx1, apparentées aux interneurones dl6. Enfin, il semble que toutes les cellules cholinergiques soient des interneurones V0c, exprimant les FT Evx1 (+/-), Evx2, Pax2 et Pitx2.



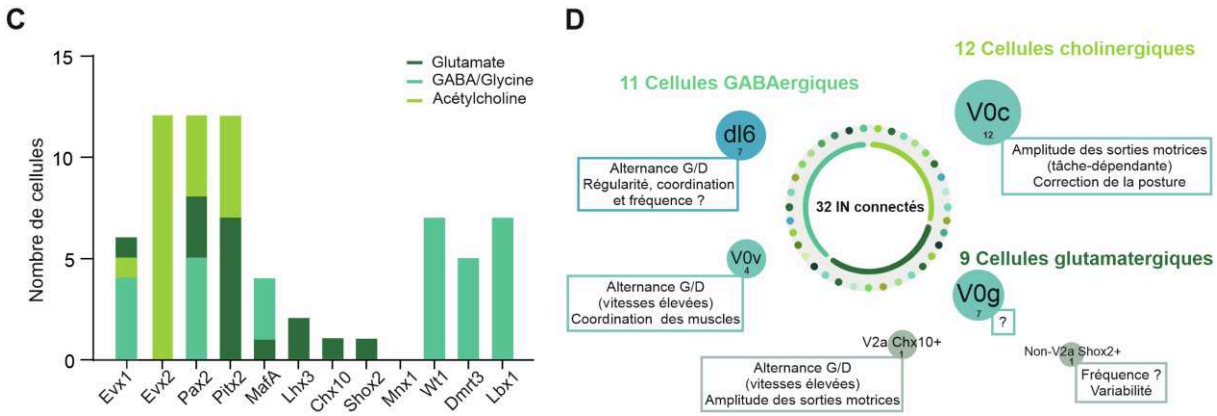


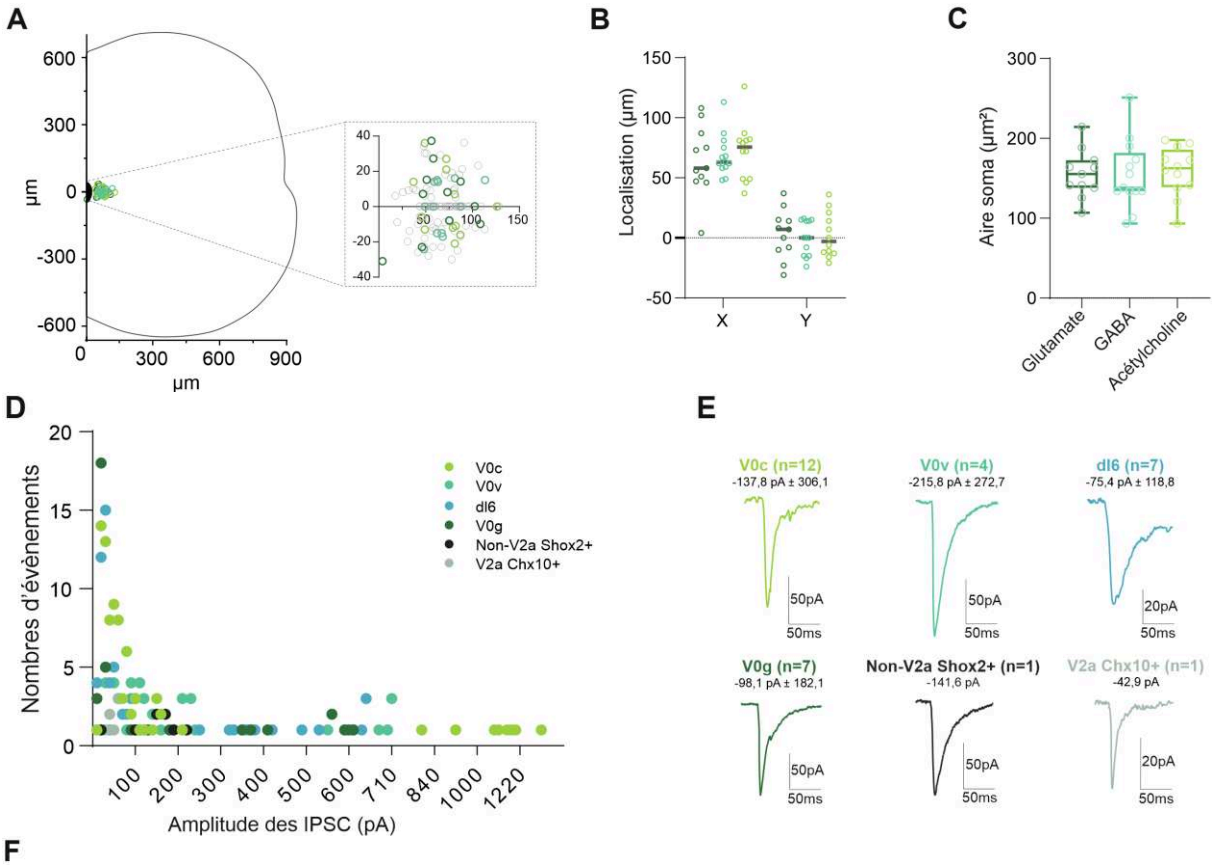
Figure 79| **Les Nc-LCS sont connectés avec des interneurones clés du réseau locomoteur spinal**

(A) Facteurs de transcription recherchés. **(B)** Heatmaps de l'expression de facteurs de transcription (FT) par les interneurones connectés (sc pour single cell), dont le cytoplasme a été récupéré pour une analyse par RT-PCR. Les cellules ont été séparées en fonction de l'expression de vGlut (Slc17a6), de GAD67 et de ChAT. L'expression (en vert foncé=1) ou l'absence d'expression (en vert clair=0) pour un FT donné, pour chaque cellule, sont reportées dans les 3 heatmaps regroupant les interneurones glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques (en gris : FT non testé). **(C)** Représentation graphique du nombre de cellules glutamatergiques (en vert foncé), GABA/glycinergiques (en bleu) et cholinergiques (en vert clair) exprimant les FT recherchés. **(D)** Représentation schématique des interneurones connectés, identifiés par single cell RT-PCR, regroupés en interneurones GABAergiques, cholinergiques et glutamatergiques, ainsi que leurs sous-types respectifs associés à leurs fonctions majeures dans la locomotion (fonctions principalement déterminées à partir de données de locomotion fictive ; cf Introduction Section I C).

Les Nc-LCS semblent connectés à plusieurs populations d'interneurones du réseau moteur spinal : les V0c, V0g, V0v, dl6, V2a et les non-V2a, confirmant ainsi les données anatomiques précédemment obtenues. La majorité de ces neurones appartiennent au CPG locomoteur et participent majoritairement à la formation du patron, avec l'alternance gauche-droite des membres postérieurs, à des vitesses élevées. Les interneurones Non-V2a, qui semblent être impliqués dans la fréquence du rythme locomoteur, sont eux moins connecté aux Nc-LCS **(Figure 80D)**.

Les interneurones connectés aux Nc-LCS sont localisés dans les parties latérales et ventro-médianes de la ME lombaire, à environs 68±24 µm du canal central (cercles gris : IN connectés non-identifiés ; **Figure 80A et B**), et ont un soma d'une surface moyenne de 156±35 µm² **(Figure 80C)**. Les amplitudes des IPSC photo-évoqués, ont été regroupées en fonction du type cellulaire identifié, et la majorité des évènements synaptiques ont un courant d'amplitude de -137±243pA **(Figure 80D et E)**. Les interneurones identifiés présentent une grande variabilité dans l'amplitude des courants enregistrés : V0c (min : -1104 et max : -14 pA ; n=12), V0g (min : -501 et max : -11 pA ; n=7), V0v (min : -617 et max : -36 pA ; n=4) et dl6 (min : -341 et max : -12 pA ; n=7). Il est à noter que cette variabilité puisse ne pas être dépendante du type ou sous-type cellulaire, mais plutôt du taux d'expression de la ChR2 ou du nombre de terminaisons $ChR2^+$ présentes autour du neurone enregistré (cf Discussion). Il s'agira de mener des analyses complémentaires pour adresser ce point spécifique.

Par ailleurs, l'analyse des propriétés membranaires des différents partenaires postsynaptiques identifiés, montre une certaine homogénéité bien qu'une variabilité existe. L'injection de sauts de courants dépolarisants révèle que 83 % (10/12 cellules) des interneurones V0v ont une décharge retardée avec la présence d'un courant Ih (sag), et que les autres populations identifiées ont une décharge mixte, étant soit retardée, soit immédiate **(Figure 80F)**. L'analyse des propriétés intrinsèques et rythmogènes est complexe, puisqu'il est difficile de comparer nos résultats avec d'autres études réalisées sur ces différentes populations, notamment en raison de différentes conditions expérimentales, et de l'âge des animaux utilisés.



	Rm(GΩ)	τ(s)	Cm(pF)	Vm(mV)	Retardée	Immediate	Spontanée	PIR	SAG	Ih(mV)	Rin(MΩ)	Rheobase(pA)	Threshold(mV)	Peak AP(mV)	Peak AHP (mV)
V0c (n=12)	0,69	0,83	54,11	-68,92	10/12	1/12	-	-	11/12	8,87	531,26	58,07	-31,57	62,78	31,55
V0v (n=4)	1,04	0,54	42,80	-55,00	2/4	2/4	-	1/4	2/2	7,17	574,40	25,33	-31,64	69,14	-30,59
dI6 (n=7)	0,54	0,77	42,79	-64,57	3/7	2/7	-	-	6/7	6,42	469,54	51,61	-37,83	65,48	-30,16
V0g (n=7)	0,47	0,60	37,61	-50,86	3/7	3/7	2/7	-	3/7	4,59	546,23	44,06	-18,87	59,39	-31,34
Non-V2a Shox2+ (n=1)	0,87	0,79	67,05	-75,00	1/1	-	-	-	+	8,32	572,20	69,70	-41,90	76,23	-29,98
V2a Chx10+ (n=1)	0,64	0,56	47,08	-42,00	-	-	+	+	+	4,99	587,4	/	/	48,48	-16,33

Figure 80 | **Localisation et propriétés des interneurones spinaux connectés**

(A) Représentation d'une demi-moelle épinière lombaire et la localisation des interneurones enregistrés et connectés aux Nc-LCS (en gris), et ceux identifiées par single cell RT-PCR (en couleur). **(B)** Boxplot de la localisation des interneurones identifiés, à une distance de 68±24 µm du canal central (n=32). **(C)** Boxplot de l'aire du soma des interneurones connectés identifiés, en fonction de la nature de leur neurotransmission (moyenne : 156±35 µm², n=32). **(D)** Représentation graphique du nombre d'évènements reporté en fonction de l'amplitude des IPSC. Les amplitudes des différentes classes d'interneurones identifiées sont visibles par des points colorés, majoritairement regroupées en dessous de -200 pA (moyenne : -137,5±242,6 pA). **(E)** Traces représentatives des IPSC photo-évoqués dans les six classes d'interneurones identifiées, avec leurs amplitudes moyennes respectives. **(F)** Tableau des propriétés électrophysiologiques des sous-types d'interneurones identifiés (PIR : post-inhibitory rebound).

Ainsi, les Nc-LCS semblent être intégrés au réseau locomoteur spinal en contactant plusieurs populations neuronales, impliquées notamment dans la genèse du patron locomoteur. Une telle connectivité reflète une grande complexité, avec l'interaction de différents circuits, où les Nc-LCS pourraient jouer un rôle dans le contrôle sensorimoteur (pendant des tâches motrices fines), le maintien de la posture (Gerstmann et al., 2022), ou dans la locomotion rapide (Nakamura et al., 2023). Une étude récente a répertorié chez le poisson-zèbre et chez la souris, l'ensemble des connexions entre les différents acteurs du CPG locomoteur, et montre que la plupart des interneurones effectuent des connexions multiples avec d'autres interneurones du réseau moteur (Sengupta & Bagnall, 2023).

4- Etude de la modulation de la neurotransmission par les RCPGs

Nos données indiquent que les Nc-LCS forment des connexions récurrentes entre Nc-LCS et projettent vers des interneurones GABAergiques, glutamatergiques et cholinergiques clés du réseau moteur spinal. Ils modulent l'activité de leurs partenaires synaptiques par

l'activation de R-GABA$_A$. Classiquement la libération de neurotransmetteurs et les réponses synaptiques peuvent être modulées par l'activation de récepteurs métabotropiques présents sur les terminaisons présynaptiques ou sur le neurone postsynaptique. Contrairement aux récepteurs ionotropiques qui produisent des courants synaptiques rapides (<10 ms), les récepteurs métabotropiques, couplés aux protéines G, génèrent des réponses plus lentes (de quelques secondes à quelques minutes) et jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique. Les protéines G couplées à un récepteurs (RCPG), sont des GTPases, constituées de sous-unités Gα et Gβγ étroitement liées. Il existe différentes sous-unités Gα. Les Gα_s activent l'adénylate cyclase (AC) pour augmenter la synthèse d'AMPc. Les G$\alpha_{i/o}$ inhibent l'AC et les Gα_q activent la phospholipase C et la libération du Ca^{2+} intracellulaire. Les sous-unités Gβγ peuvent, quant à elles, activer les canaux voltage-dépendants et les canaux GIRK (canaux K^+ à rectification entrante, activés par les protéines G) ou les inhiber (Gassmann & Bettler, 2012).

Le réseau spinal est complexe. Il contient un ensemble de neurones avec des phénotypes différents (GABAergiques, glutamatergiques, cholinergiques mais aussi sérotoninergiques), qui peuvent interagir directement par des connexions synaptiques ou moduler l'activité synaptique de manière homo- et hétérosynaptique, notamment par des contacts axo-axoniques. Comme indiqué plus haut cette modulation de la neurotransmission fait souvent intervenir des RCPGs. Nous avons ainsi reproduit dans le modèle de souris transgéniques PKD2L1-ChR2-tdTomato l'analyse de la neurotransmission photo-évoquée, entre Nc-LCS et avec les interneurones moteurs, puis testé si elle était modulée par l'activation de RCPGs. Des stimulations optogénétiques ont été induites avant (contrôle, 4 min, 40 sweeps ; trace noire), pendant (agoniste, 1 min 30, 15 sweeps ; trace pourpre) et après (wash, 4 min, 40 sweeps), l'application par pression d'agonistes des principaux RCPGs, en absence ou en présence de l'antagoniste spécifique correspondant, dans le bain.

a) Effet des RCPGs sur la connexion récurrente des Nc-LCS

Récepteurs métabotropiques du GABA (R-GABA$_B$)

Les récepteurs métabotropiques R-GABA$_B$, couplés aux protéines G (de type G$\alpha_{i/o}$), sont décrits comme étant des modulateurs des Ca_v au niveau pré- et postsynaptique (cf Résultats, Section IV A-4). Leur activation induit également des courants K^+ de type Kir3 (GIRK : G protein activated inwardly rectifying K^+ channels) (Bettler et al., 2004; Gassmann & Bettler, 2012). Nous avons mis en évidence que les Nc-LCS projettent vers des neurones GABAergiques du réseau moteur spinal et il est envisageable qu'il existe une modulation de cette neurotransmission, par le GABA libéré au niveau de la synapse ou par d'autres neurones GABAergiques projetant sur la terminaison présynaptique.

Des travaux de l'équipe ont montré que les Nc-LCS bulbaires, expriment la sous-unité GABA$_{B1}$ des R-GABA$_B$, que ces récepteurs sont fonctionnels et qu'ils modulent les Ca_v, chez la souris (Crozat et al., 2024 BioRxiv ; Jurčić et al., 2019). Par ailleurs, les auteurs montrent que l'activation des R-GABA$_B$ dans les Nc-LCS bulbaires et spinaux n'a pas d'effet sur les propriétés des PA, induits par un saut de courant dépolarisant, ni sur les propriétés intracellulaires, et n'induit pas d'augmentation du courant de maintien, suggérant une absence des GIRK dans les Nc-LCS (Jurčić et al., 2019 ; Riondel et al., 2024). De plus, les résultats obtenus sur des tranches de ME lombaire (cf Résultats, Section IV A4), confirment ces résultats, puisque l'activation des R-GABA$_B$, par l'application de baclofène (Bcl, 100 µM ; agoniste des R-GABA$_B$), diminue significativement l'amplitude des courants Ca_v au niveau postsynaptique.

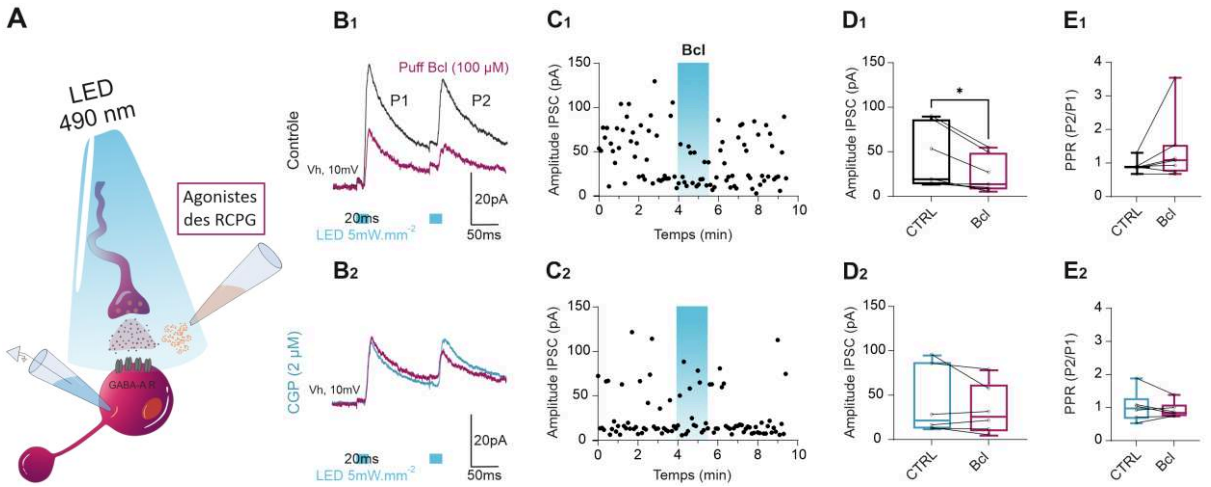


Figure 81| **L'activation des récepteurs GABA$_B$ par le baclofène inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS**

(A) Schéma représentatif de l'approche de CRACM, utilisée pour étudier la modulation de la neurotransmission photo-évoquée entre les Nc-LCS, par l'application d'agonistes des récepteurs métabotropiques. **(B$_{1-2}$)** Traces représentatives de courants sortants photo-évoqués, enregistrés dans un Nc-LCS lombaire en VC à V_h 10 mV (ECl≈-60 mV), par l'application répétée de 2 stimuli lumineux de 20 ms, séparés de 100 ms (5 mW.mm^{-2}, Δt 100 ms ; toutes les 5 s). L'application par pression de baclofène (Bcl, 100 µM ; trace pourpre) a été effectuée en condition contrôle (en haut, B$_1$; trace noire) et en présence de 2 µM de CGP (en bas, B$_2$; trace bleue) dans le bain. **(C$_{1-2}$)** Amplitudes des IPSC au cours du temps : avant, pendant et après l'application par pression de Bcl, enregistrées dans un Nc-LCS lombaire, en VC à V_h 10 mV, en contrôle (haut, C$_1$) et en présence de CGP (en bas, C$_2$). **(D$_{1-2}$)** Boxplot de l'amplitude des IPCS en condition contrôle (en haut, D$_1$; 42±25 pA et 24±21 pA en Bcl) et en présence de CGP (en bas, D$_2$; 42±35 pA et 35±29 pA en Bcl ; n=6), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application de Bcl (Test de Wilcoxon, *p=0,0313 ; n=7). **(E$_{1-2}$)** Boxplot des paired pulse ratio (PPR) en condition contrôle (en haut, E$_1$; 0,99±0,19 et 1,33±0,99 en Bcl, n=7) (Test de Wilcoxon, p=0,0938 ; n=7) et en présence de CGP (en bas, E$_2$; 1,0±0,5 et 0,9± 0,2 en Bcl, n=6), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application de Bcl.

Comme décrit plus haut (cf Résultats, Section IV B2b), nous avons enregistré les Nc-LCS en mode VC à un V_h de 10 mV et photo-évoqué des réponses synaptiques **(Figure 81A)** en utilisant cette fois un protocole de double pulse de lumière (pulse 20 ms avec un intervalle de 100 ms) (Linders et al., 2022), afin de pouvoir calculer le paired-pulse ratio (PPR ; cf Matériel et Méthode, Section II 4e) et déterminer la nature pré- ou postsynaptique d'une potentielle modulation. Les réponses synaptiques (courants sortants ; solution intracellulaire KGlu et E_{Cl}≈-60 mV) ont été enregistrées en contrôle pendant 4 min, avant (40 sweeps toutes les 5 s ; trace noire), pendant et après (Wash, 4 min, 40 sweeps ; **Figure 81B1 et C1**), l'application par pression le Bcl (100 µM pendant 1 min 30, 15 sweeps ; trace pourpre). L'amplitude moyenne des courants synaptiques est de 42±35 pA en contrôle (trace noire, **Figure 81C1 et D1**), de 24±21 pA en présence de Bcl (trace pourpre) et de 35±29 pendant le wash. L'activation des R-GABA$_B$ induit un changement significatif de l'amplitude du courant photo-évoqué, avec une inhibition de 40 % (Test de Wilcoxon, *p=0,0313 ; n=7 ; **Figure 81D1**). En présence de CGP 54626A (2 µM ; antagoniste des R-GABA$_B$; trace bleue ; **Figure 81B2 et C2**), l'amplitude du courant est de 42±35 pA, et l'application de Bcl n'entraine pas d'inhibition significative (en Bcl : 35±29 pA ; 11 %, wash : 38±30 pA, n=6 ; Test de Wilcoxon, p=0,3125 ; n=6 ; **Figure 81D2**). La comparaison du paired-pulse ratio (PPR : amplitude du 2ème courant postsynaptique P2/ l'amplitude du 1er courant postsynaptique P1), avant (0,91±0,19) et pendant l'application de Bcl (1,33±0,99), ne montre pas de changements significatifs du PPR (Test de Wilcoxon, p=0,0938 ; n=7 ; **Figure 81E1 et E2**), ne permettant pas de conclure quant à la localisation du mécanisme de modulation de la neurotransmission. Il est à noter que parmi les cellules enregistrées, 3 répondent à l'application de Bcl par une augmentation du courant, suggérant la présence de 2 groupes cellulaires ou un problème expérimental (3/10 cellules).

Récepteur muscarinique à l'ACh (R-mACh)

Les récepteurs cholinergiques muscariniques (R-mACh) sont des récepteurs métabotropiques, divisés en 5 sous-types (m1-m5), dont les m2 et m4 sont couplés aux

protéines $G\alpha_{i/o}$ inhibitrices, qui entraînent une inhibition des Ca_V (Caulfield, 1993). Il existe dans le réseau spinal un grand nombre de neurones cholinergiques. Nous avons mis en évidence que l'activation des R-mACh module les Ca_V exprimés par les Nc-LCS et que les Nc-LCS forment des connexions synaptiques avec des interneurones cholinergiques. Ainsi nous avons ensuite testé si cette neurotransmission pouvait être modulée par l'activation de R-mACh.

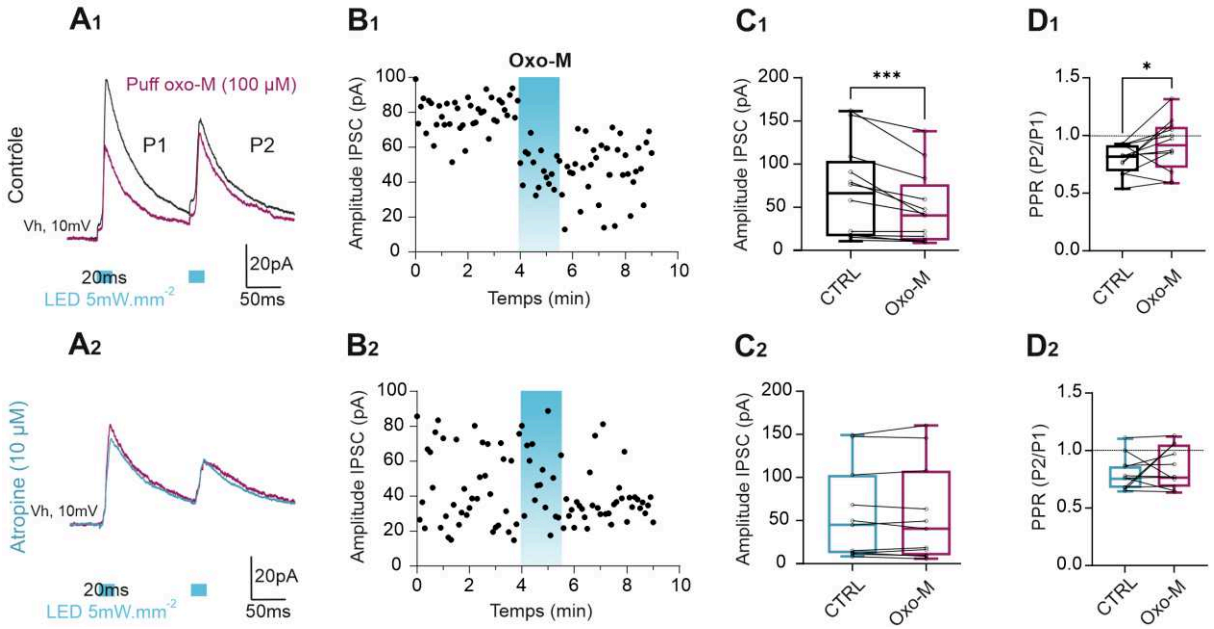


Figure 82| **L'activation des récepteurs mACh par l'oxotrémorine-M inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS**

(A_{1-2}) Traces représentatives de courants sortants photo-évoqués, enregistrés dans un Nc-LCS lombaire en VC à V_h 10 mV (ECl≈-60 mV), par l'application répétée de 2 stimuli lumineux de 20 ms (5 $mW.mm^{-2}$, Δt100, toutes les 5 s). L'application par pression d'oxotrémorine-M (oxo-M, 100 µM ; trace pourpre) a été effectuée en condition contrôle (en haut, A_1 ; trace noire) et en présence de 10 µM d'atropine (en bas, A_2 ; trace bleue) dans le bain. **(B_{1-2})** Amplitudes des IPSC avant, pendant et après l'application par pression d'oxo-M, enregistrées dans un Nc-LCS lombaire, en VC à V_h 10 mV, en contrôle en (en haut, B_1) et en présence d'atropine (en bas, B_2). **(C_{1-2})** Boxplot de l'amplitude des IPCS en condition contrôle (en haut, C_1 ; 68,0±54,2 pA et 49,3±42,0 pA en oxo-M, n=12) et en présence d'atropine (en bas, C_2 ; 56,5±54,2 pA et 56,9±56,5 pA en oxo-M, n=11), avec (en pourpre) ou sans (en noir ou bleu) application d'oxo-M (Test de Wilcoxon, ***p=0,0005 ; n=12-11). **(D_{1-2})** Boxplot des PPR en condition contrôle (en haut, D_1 ; 0,80±0,12 et 0,92±0,22 en oxo-M, n=12) et en présence d'atropine (en bas, D_2 ; 0,8±0,1 et 0,8± 0,2en oxo-M, n=11), avec (en pourpre) ou sans (en noir ou bleu) application d'oxo-M (Test de Wilcoxon, *p=0,045 ; n=12-11).

De la même façon que précédemment, les réponses synaptiques ont été photo-évoquées dans des Nc-LCS enregistrés à V_h 10 mV et l'effet de l'activation des R-mACh a été testé par l'application par pression d'oxotrémorine-M (oxo-M, 100 µM, agoniste sélectif des R-mACh ; trace pourpre **Figure 82A**). En condition contrôle, les IPSC photo-évoqués ont une amplitude de 68,0±54,2 pA (trace noire ; **Figure 82C1**) et de 49,3±42,0 pA, pendant l'application d'oxo-M (trace pourpre, Test de Wilcoxon, ***p=0,0005 ; n=12), avant de revenir à une valeur de 54,4±47,1 pendant le wash **(Figure 82C1)**. L'inhibition médiée par l'oxo-M au cours du temps est illustrée **Figure 82B1** et atteint en moyenne 25,3±16,1 % (n=12) et son effet est réversible. En présence d'atropine (Atr, 10 µM ; antagoniste des R-mACh), l'amplitude du courant est de 56,5±54,2 pA, et l'application d'oxo-M n'entraine pas d'inhibition (56,9±56,5 pA ; n=11 ; **Figure 82A, B et C**). La comparaison du paired-pulse ratio (PPR), avant (0,80±0,12) et pendant l'application d'oxo-M (0,92±0,22), montre une augmentation significative du PPR (Test de Wilcoxon, *p=0,045 ; n=12 ; **Figure 82D1**), bloquée par l'application d'atropine **(Figure 82D2)**, suggérant un effet majoritairement présynaptique de la modulation. Ceci est confirmé par l'analyse du coefficient de variation ($1/CV^2$, cf Matériel et Méthodes Section II 4e) et de la cinétique des IPSC photo-évoqués, puisque l'activation des R-mACh n'affecte ni le decay time ni le rise time (10–90%) (données non présentées). Ces

résultats mettent en évidence une modulation cholinergique dépendante des R-mACh présynaptiques, de la connexion récurrente entre les Nc-LCS.

Récepteur à la sérotonine (R-5HT)

De la même façon, à V_h 10 mV, l'effet de l'activation des récepteurs métabotropiques sérotoninergiques (R-5HT), a été testé par l'application par pression de sérotonine (5-HT, 1 mM ; trace pourpre ; **Figure 83A**). En condition contrôle, les IPSC photo-évoqués ont une amplitude de 58,4±61,0 pA (trace noire) et de 48,1±59,0 pA, pendant l'application de 5-HT (en pourpre, Test de Wilcoxon, *p=0,0031 ; n=7 ; **Figure 83C**). L'inhibition médiée par la 5-HT au cours du temps est illustrée **Figure 83B**, atteint en moyenne 24±17 % (n=7) et son effet est réversible. Par l'analyse du PPR, nous avons également testé le site de cette modulation. La comparaison du PPR avant (0,75±0,18) et pendant l'application de 5-HT (0,77±0,22), ne montre pas de changement du PPR (Test de Wilcoxon, p>0,9999 ; n=7 ; **Figure 83D**), ne permettant donc pas de déterminer la localisation du mécanisme, à la base de cette modulation, suggérant un effet mixte au niveau pré- et postsynaptique. Ces résultats mettent en évidence une neurotransmission sérotoninergique, capable de moduler la connexion récurrente entre les Nc-LCS.

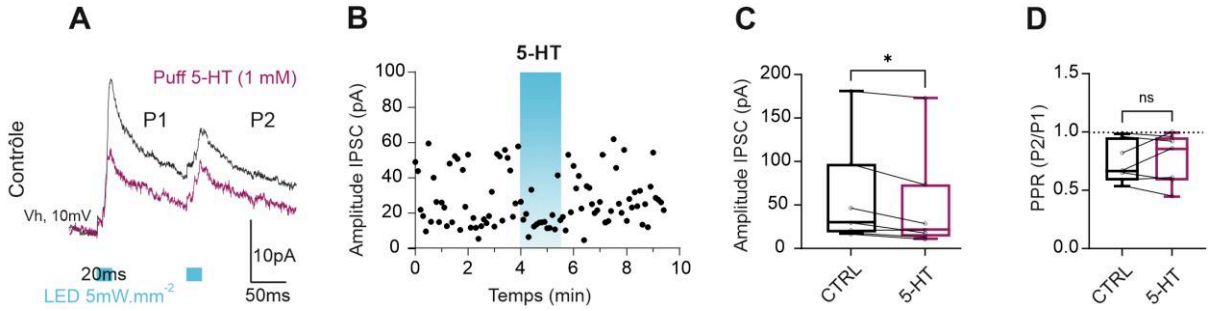


Figure 83| **L'activation des récepteurs 5-HT par la sérotonine inhibe la neurotransmission de la connexion récurrente entre Nc-LCS**

(A) Traces représentatives de courants sortants photo-évoqués, enregistrés dans un Nc-LCS lombaire en VC à V_h 10 mV (E_{Cl}≈-60 mV), par l'application répétée de 2 stimuli lumineux de 20 ms (5 mW.mm^{-2}, Δt100, toutes les 5 s). L'application par pression de 5-HT (1 mM ; trace pourpre) a été effectuée en condition contrôle (trace noire). **(B)** Amplitudes des IPSC avant, pendant et après l'application par pression de 5-HT, enregistrées dans un Nc-LCS lombaire, en VC à V_h 10 mV, en contrôle. **(C)** Boxplot de l'amplitude des IPCS en condition contrôle (58,4±61,0 pA et 48,1±59,0 pA en 5-HT, n=7) (Test de Wilcoxon, *p=0,0031 ; n=7). **(D)** Boxplot des paired pulse ratio (PPR) en condition contrôle, avec (0,77±0,22 ; en pourpre) ou sans (0,75±0,18 ; en noir) application de 5-HT (Test de Wilcoxon, n=7).

b) Effet des RCPGs sur la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires

R-GABA$_B$

Dans le but de déterminer si les R-GABA$_B$ modulent la neurotransmission photo-évoquée entre les Nc-LCS et les interneurones du réseau locomoteurs, des stimulations optogénétiques ont été induites avant (trace noire), pendant (trace pourpre) et après, l'application par pression de Bcl, en absence **(Figure 84B1)** ou en présence dans le bain de 2 µM de CGP (trace bleue ; **Figure 84B2**).

Ainsi, à V_h -90 mV, l'exposition à des pulses de lumière de 20 ms, induit des réponses synaptiques dans les interneurones enregistrés, caractérisées par des courants entrants (solution intracellulaire KCl, E_{Cl}≈0 mV), avec une amplitude de -87,6±73,3 pA en contrôle et de -51,3±69,2 pA en présence de Bcl. L'activation des R-GABA$_B$ induit une diminution rapide du courant photo-évoqué (Test de Wilcoxon, *p=0,016 ; n=7 ; **Figure 84D1**). L'inhibition médiée par le Bcl au cours du temps est illustrée **Figure 84C1**, atteint en moyenne 46,5±33,2 % (n=7), et son effet est progressivement réversé. En présence de CGP (2 µM), l'amplitude du courant est de -174,8±185,1 pA, et l'application de Bcl n'entraine pas d'inhibition significative (-159,0±164,1 pA ; n=9 ; Test de Wilcoxon, p=0,1289 ; n=9 ; **Figure 84D2**). L'analyse du PPR et de son évolution indique une forte augmentation du PPR en présence de Bcl et suggère que

la modulation observée est de nature présynaptique (en contrôle : 0,46±0,27 ; en Bcl : 1,10±0,76 ; Test de Wilcoxon, *p=0,031 ; n=7 ; **Figure 84E1**), confirmé par l'analyse du coefficient de variation (1/CV², cf Matériel et Méthodes Section II 4e) et de la cinétique des IPSC photo-évoqués (données non présentées). L'application de CGP bloque cet effet **(Figure 84E2)**.

Contrairement aux Nc-LCS, les interneurones expriment des canaux GIRK fonctionnels. Au niveau de la corne dorsale, des travaux de l'équipe, en mode VC ont montré la présence d'un courant sortant K^+ dans les neurones du Noyau dorsal du nerf vague (DMNX), d'une amplitude de 23,7±25,2 pA (Jurčić et al., 2019). L'application de Bcl sur les interneurones localisés autour du canal central, a induit en mode VC à V_h -70 mV, un courant sortant compris entre 10 et 16 pA, suggérant la présence de GIRK dans les interneurones. Ce courant n'est plus observé à V_h -90 mV, proche du potentiel d'équilibre du potassium (E_K≈-97 mV), avec la solution intracellulaire KCl utilisée. Puisque les enregistrements des IPSC photo-évoqués dans les interneurones ont été réalisés à V_h -90 mV, l'étude de la modulation de la neurotransmission par les R-$GABA_B$ dans les interneurones, a été poursuivie avec une solution intracellulaire de KCl et non de césium.

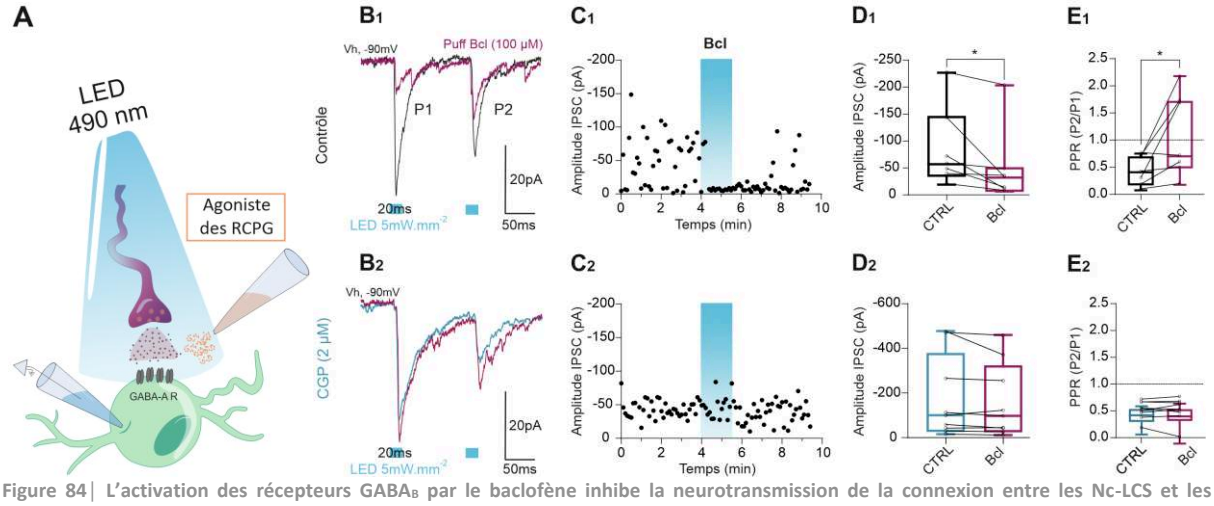


Figure 84| L'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofène inhibe la neurotransmission de la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires

(A) Schéma représentatif de l'approche de CRACM, utilisée pour étudier la modulation de la neurotransmission photo-évoquée entre les Nc-LCS et les interneurones spinaux, par l'application d'agonistes des récepteurs métabotropiques. **(B_{1-2})** Traces représentatives de courants entrants photo-évoqués, enregistrés dans un interneurone en VC à V_h -90 mV (E_{Cl}≈0 mV), par l'application répétée de 2 stimuli lumineux de 20 ms (5 $mW.mm^{-2}$, Δt100, toutes les 5 s). L'application par pression de baclofène (Bcl, 100 µM ; trace pourpre) a été effectuée en condition contrôle (en haut, B_1 ; trace noire) et en présence de 2 µM de CGP (en bas, B_2 ; trace bleue) dans le bain. **(C_{1-2})** Amplitudes des IPSC avant, pendant et après l'application par pression de Bcl, enregistrées dans un interneurone, en VC à V_h -90 mV, en contrôle (en haut, C_1) et en présence de CGP (en bas, C_2). **(D_{1-2})** Boxplot de l'amplitude des IPCS en condition contrôle (en haut, D_1 ; -87,6±73,3 pA et -51,3±69,2 pA en Bcl ; Test de Wilcoxon, *p=0,016 ; n=7) et en présence de CGP (en bas, D_2 ; -174,8±185,1 pA et -159,0±164,1 pA en Bcl, n=9), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application de Bcl. **(E_{1-2})** Boxplot des PPR en condition contrôle (en haut, E_1 ; 0,46±0,27 et 1,10±0,76 en Bcl ; Test de Wilcoxon, *p=0,031, n=7) et en présence de CGP (en bas, E_2 ; 0,5±0,17 et 0,5±0,22 en Bcl), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application de Bcl (Test de Wilcoxon, n=9).

R-mACh

De la même façon, à V_h -90 mV, l'effet de l'activation des R-mACh, a été testé par l'application par pression d'oxo-M à 100 µM (trace pourpre ; **Figure 85A1**). En condition contrôle, les IPSC photo-évoqués ont une amplitude de -139,1±197,8 pA (trace noire), et de -89,1±148,7 pA, pendant l'application d'oxo-M (trace pourpre, Test de Wilcoxon, **p=0,0078 ; n=9 ; **Figure 85C1**). L'inhibition médiée par l'oxo-M au cours du temps est illustrée **Figure 85B1**, atteint en moyenne 33,0±26,0 % (n=9), et son effet est réversible. En présence d'atropine (10 µM) l'amplitude du courant était de -215,4±277,6 pA, et l'application d'oxo-M n'a pas entrainé d'inhibition significative (-236,3±308,6 pA ; Test de Wilcoxon, p>0,9999 ; n=6 ; **Figure 85A2 et C2**). L'analyse du PPR et de son évolution indique également une forte

augmentation du PPR en présence d'oxo-M (en contrôle : 0,51±0,21 ; en Bcl : 0,92±0,69 ; Test de Wilcoxon, *p=0,043 ; n=9 ; **Figure 85D1 et D2**) et suggère que la modulation observée est de nature présynaptique. Ce résultat est confirmé par l'analyse du coefficient de variation ($1/CV^2$, cf Matériel et Méthodes Section II 4e) et de la cinétique des réponses synaptiques (résultats non présentés). Ces résultats mettent en évidence la présence de R-mACh présynaptiques, capables de moduler la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones spinaux.

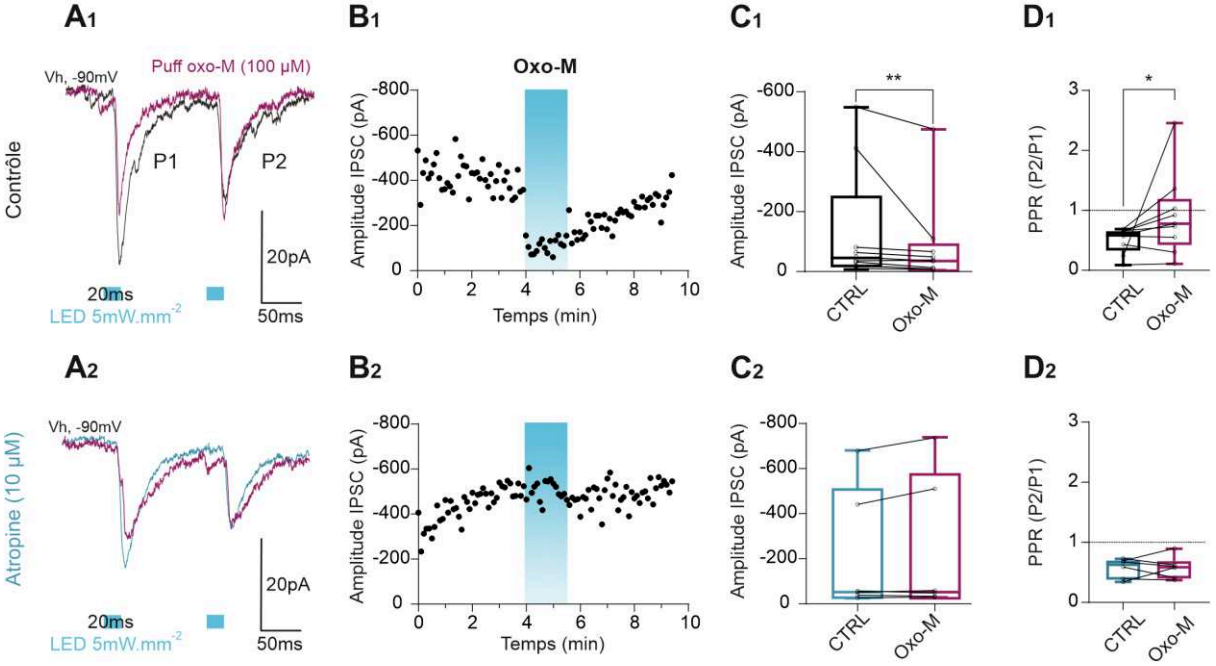


Figure 85| **L'activation des récepteurs mACh par l'oxotrémorine-M inhibe la neurotransmission de la connexion entre les Nc-LCS et les interneurones lombaires**

(A1-2) Traces représentatives de courants entrants photo-évoqués, enregistrés dans un interneurone en VC à V_h -90 mV (ECl≈-60 mV), par l'application répétée de 2 stimuli lumineux de (20 ms, 5 mW.mm-², Δt100, toutes les 5 s). L'application par pression d'oxotrémorine-M (oxo-M, 100 µM ; trace pourpre) a été effectuée en condition contrôle (en haut, A1 ; trace noire) et en présence de 10 µM d'atropine (en bas, A2 ; trace bleue) dans le bain. **(B1-2)** Amplitudes des IPSC avant, pendant et après l'application par pression d'oxo-M, enregistrées dans un interneurone, en VC à V_h -90 mV, en contrôle (en haut, B1) et en présence d'atropine (en bas, B2). **(C1-2)** Boxplot de l'amplitude des IPCS en condition contrôle (en haut, C1 ; -139,1±197,8 pA et -89,1±148,7 pA en oxo-M ; Test de Wilcoxon, **p=0,0078 ; n=9) et en présence d'atropine (en bas, C2 ; -215,4±277,6 pA et de -236,3±308,6 pA en oxo-M, n=6), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application d'oxo-M. **(D1-2)** Boxplot des PPR en condition contrôle (en haut, D1 ; 0,51±0,21 et 0,92±0,69 en oxo-M ; Test de Wilcoxon, *p=0,043 ; n=9) et en présence d'atropine (en bas, D2 ; 0,6±0,16 et 0,6±0,18 en oxo-M, n=6), avec (en pourpre) ou sans (en noir/bleu) application d'oxo-M.

R-5-HT

Nous avons analysé la modulation de la connectivité entre Nc-LCS et interneurones comme indiqué précédemment avec l'activation des R-5HT, par l'application par pression de sérotonine (5-HT, 1 mM). Nos données indiquent qu'il n'existe pas de modulation sérotoninergique des IPSC photo-évoqués, suggérant que les R-5HT n'ont pas d'effet sur la neurotransmission étudiée.

Nos résultats montrent une modulation par les RCPG de la neurotransmission entre Nc-LCS et entre Nc-LCS et interneurones du réseau moteur spinal. Cette modulation fait intervenir des récepteurs R-$GABA_B$, mACh entre Nc-LCS et entre Nc-LCS et interneurones et serait majoritairement localisée au niveau présynaptique. La modulation de la transmission photo-évoquée par les récepteurs à la 5-HT, a été observée uniquement pour la transmission récurrente entre Nc-LCS et sa localisation n'est pas encore déterminée et nécessitera des expériences complémentaires. Par ailleurs, l'étude de la modulation par les récepteurs métabotropiques au glutamate des groupes II et III, est en cours de réalisation.

DISCUSSION

V - Discussion

Les objectifs de mon travail de thèse s'inscrivent dans une étude plus large menée au sein de mon équipe d'accueil et participe à la caractérisation de la fonction des Nc-LCS bulbo-spinaux au sein du SNC comme nouveaux acteurs du système sensoriel intéroceptif. Plus spécifiquement, mon étude s'est consacrée à la région lombaire pour déterminer d'une part, les ***propriétés électrophysiologiques et sensorielles des Nc-LCS*** de ce segment et d'autre part, ***cartographier leur connectivité sur le plan anatomique et fonctionnel,*** avec les Nc-LCS mais surtout avec les interneurones du réseau moteur spinal.

Cette étude et les travaux menés en parallèle dans l'équipe ont permis de mettre en évidence que les Nc-LCS lombaires, et de manière générale les Nc-LCS bulbo-spinaux, possèdent une ***morphologie caractéristique conservée*** chez tous les vertébrés étudiés à ce jour. Ils sont localisés autour du canal central, sur tout l'axe lombaire et préférentiellement dans la région ventrale (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Ils projettent leur axone vers la fissure médiane pour former de longs faisceaux de fibres ascendant vers les régions plus rostrales et forment des plexus de collatérales (Crozat et al., 2024 BioRxiv ; Nakamura et al., 2023).

Au niveau cellulaire, ils partagent des ***propriétés intrinsèques similaires*** aux Nc-LCS bulbo-spinaux, avec une forte résistance et une faible capacité membranaire, leur conférant une excitabilité élevée. Ils expriment les conductances voltage-dépendantes classiques (Na_V, K_V et Ca_V) de neurones, qui sous-tendent la génération des potentiels d'action, ainsi que l'***expression de récepteurs ionotropiques et métabotropiques*** inhibiteurs (R-$GABA_A$, R-$GABA_B$ et R-Gly) et excitateurs (R-AMPA/Kainate, R-nACh et R-mACh), qui suggèrent une modulation synaptique de leur activité au sein du réseau spinal lombaire et de leur signalisation calcique.

Les résultats de l'analyse de leur connectivité confirme et précise les études précédentes sur un rôle des Nc-LCS comme modulateurs de l'activité motrice (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023). Elle démontre que les Nc-LCS forment effectivement un ***réseau récurrent entre Nc-LCS*** mais également identifie pour la première fois leur ***connexion avec des interneurones clés du réseau moteur lombaire***. Enfin, nos résultats mettent en évidence une modulation de ces connexions synaptiques par l'activation de RCPG, suggérant que les Nc-LCS sont ***insérés dans un réseau complexe modulant l'activité motrice*** ; réseau qu'il sera nécessaire de caractériser plus amplement pour identifier, notamment, la connectivité avec les entrées synaptiques issues du système sensoriel proprioceptif.

A- Les Nc-LCS lombaires font partie d'une population homogène de neurones sensoriels intraspinaux

1- Les Nc-LCS, une population neuronale homogène le long du canal central

Chez la souris, les Nc-LCS lombaires, ainsi que les Nc-LCS des autres segments spinaux et bulbaires, partagent des caractéristiques morphologiques, avec les Nc-LCS étudiés chez la plupart des vertébrés. Ils ont une localisation principalement sous-épendymaire, mais on les retrouve également enchâssés entre les cellules épendymaires formant la paroi du canal central de la ME et ils sont principalement (≈60 %) présent dans la région ventrale (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Les Nc-LCS sont distribués autour du canal central tout au long du segment

lombaire avec une densité cellulaire élevée (≈14 cellules/10 µm) et similaire à celle observée au niveau cervical, qui pourrait être mis en rapport avec l'anatomie de ces segments spinaux et leur épaississement caractéristiques (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Enfin, ils possèdent un phénotype GABAergique et expriment le canal PKD2L1 qui représente un marqueur sélectif des Nc-LCS bulbo-spinaux.

Les Nc-LCS lombaires possèdent, à l'instar de l'ensemble des Nc-LCS bulbo-spinaux, une protrusion dans la lumière du canal central au contact du LCS qui leur permettrait, selon l'hypothèse avancée dans la littérature (Vigh-Teichmann & Vigh, 1989), d'intégrer l'information véhiculée par les LCS pour informer le SNC de son statut homéostatique en conditions physiologiques ou pathologiques. On peut envisager que les Nc-LCS lombaires, intègreraient ainsi ces informations circulantes afin de moduler l'activité de leurs partenaires du réseau moteur. Par ailleurs, chez plusieurs espèces de vertébrés il a été mis en évidence la présence dans cette protrusion de vésicules à corps denses suggérant un rôle sécréteur des Nc-LCS, similaire à celui observé au niveau des organes circum-ventriculaires. En effet, des résultats préliminaires au sein de mon équipe d'accueil ont identifié la présence de protéines impliquées dans la machinerie de libération de neuropeptides (chromogranine A et munc 13 ; données personnelles, J Ramirez-Franco), suggérant que les Nc-LCS auraient un rôle de neurones secréteurs. Les études chez la souris ayant principalement été réalisées *in vitro*, l'un des enjeux majeurs dans le futur sera, de déterminer quelles molécules circulent dans les LCS en fonction de l'état d'activité et physiologiques de l'organisme, quels récepteurs sont exprimés par les Nc-LCS leur permettant d'intégrer ces informations. Il s'agira, également, de démontrer si les Nc-LCS possèdent des propriétés sécrétrices, d'identifier les molécules qu'ils libèrent et sous quelles conditions. Cette étude est actuellement menée au sein de mon équipe d'accueil en développant une analyse immunohistochimique et fonctionnelle à l'aide de sondes spécifiques à la libération vésiculaire (FM-143, AAV-*flex*-pHluorin).

En ce qui concerne les projections axonales des Nc-LCS lombaires, nos données et celles d'autres laboratoires indiquent qu'elles projettent vers la région ventrale de la ME au niveau de la fissure médiane, pour former un faisceau bilatéral dense de fibres, majoritairement ascendant, (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023) qui se ramifie dans le tissus spinal pour former des plexus de collatérales, innervant des Nc-LCS rostraux et des neurones du réseau spinal local. Ces ramifications apparaissent plus denses dans la région ventrale de la ME lombaire (Nakamura et al., 2023), soutenant l'hypothèse d'une innervation des interneurones moteurs avec une localisation ventro-médiane (cf ci-dessous).

Que ce soit chez la larve de poisson-zèbre (Djenoune et al., 2017), la lamproie (Jalalvand et al., 2014) ou les Nc-LCS de rongeurs postnataux (Di Bella et al., 2019; Marichal et al., 2009; Petracca et al., 2016), on distingue deux populations de Nc-LCS qui semblent être regroupées au niveau dorso-latéral ou ventral et posséder des propriétés phénotypiques, voire fonctionnelles différentes (cf ci-dessous). Ces différentes populations présentent des projections et des cibles postsynaptiques différentes (Djenoune et al., 2017; Jalalvand et al., 2014). Bien que ces distinctions phénotypiques aient également été observées chez la souris plus âgée, les sous-populations de Nc-LCS ne semblent pas avoir une répartition privilégiée autour du canal central (Orts-Del'immagine et al., 2012 ; Orts-Del'Immagine et al., 2017 ; Riondel et al., 2024). Toutefois, afin de poursuivre la caractérisation du rôle des Nc-LCS, notamment lombaires, et d'avoir une meilleure compréhension de leur connectivité, il est nécessaire de déterminer si, en fonction de leurs propriétés et/ou de leur localisation autour du canal central, les Nc-LCS présentent des cibles postsynaptiques privilégiées. Une telle étude

pourrait être menée en développant des stratégies d'infection virale par voie icv (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Nakamura et al., 2023), mais avec un titre viral faible et un cocktail de virus exprimant des protéines fluorescentes différentes (EGFP, mScarlet, BFP…). Il sera ainsi possible de limiter le nombre de Nc-LCS infectés, d'exprimer de manière aléatoire les protéines fluorescentes dans les Nc-LCS et ainsi faciliter le traçage des voies de projection des Nc-LCS présents dans une région spécifique autour du canal central.

2- Propriétés électrophysiologiques intrinsèques et excitabilité

L'analyse des propriétés passives des Nc-LCS lombaires indique qu'ils possèdent les mêmes caractéristiques cellulaires que celles observées pour les Nc-LCS bulbaires (Jurčić et al., 2019; Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012), ou ceux cervicaux et thoraciques (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Du fait de leur résistance membranaire élevée et de leur faible capacité membranaire, les Nc-LCS lombaires représentent des neurones fortement électrotoniques (compacts électriquement) et excitables.

Par ailleurs, les Nc-LCS lombaires expriment des canaux PKD2L1 fonctionnels, marqueurs spécifiques des Nc-LCS bulbo-spinaux. De manière unique, bien que leur expression semble élevée, sur la base d'analyses au niveau moléculaire et immunohistochimique, leur activation ne génère que des courants unitaires (à l'échelle du canal unique) (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012). Le canal PKD2L1, de grande conductance (≈150 pS) (Chen et al., 1999; Crozat et al., 2024 BioRxiv; Orts Del'Immagine et al., 2015), est cationique non-sélectif et perméable au Na^+, au K^+ ainsi qu'au Ca^{2+}. Il induit des courants de grande amplitude, capables de générer de fortes dépolarisations et il semble permettre des augmentations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Böhm et al., 2016; Jalalvand et al., 2016). PKD2L1 présente une activité spontanée, avec une faible probabilité d'ouverture qui est modulée par des variations extracellulaires du pH ainsi que de l'osmolarité (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012). Par ailleurs, les Nc-LCS lombaires expriment des canaux ASIC sensibles à l'acidification (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Jalalvand et al., 2016; Orts Del'Immagine et al., 2015). On retrouve cette sensibilité au pH extracellulaire dans plusieurs espèces de vertébrés et l'activation des canaux PKD2L1 et ASIC, modulant l'excitabilité des Nc-LCS (cf ci-dessous), suggère que ces récepteurs sensoriels permettent aux Nc-LCS d'intégrer des informations chimiques du milieu environnant et leur prêtent une fonction de neurones chémosensoriels. Enfin, il a été mis en évidence que PKD2L1 ainsi que les canaux ASIC3 (Jalalvand et al., 2016) ont un rôle de mécanorécepteurs en répondant à la variation du flux de LCS ou à la torsion de la ME chez la larve de poisson-zèbre (Sternberg et al., 2018) et la lamproie (Jalalvand et al., 2016). A ce jour, cette propriété mécanoréceptrice n'a pas été démontrée chez la souris, même si des travaux récents semblent indiquer une telle fonction pour les Nc-LCS thoraciques, suite à des stimuli mécaniques de forte amplitude (Johnson et al., 2023). Ces récepteurs sensoriels jouent un rôle central dans l'activité des Nc-LCS, toutefois peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes, les signaux physiologiques et/ou pathologiques régulant leur activité. Notre équipe développe à ce sujet des études dédiées pour mettre en évidence ces mécanismes.

Mis à part pour les études menées chez la larve de poisson-zèbre, les études pour caractériser le rôle de récepteur sensoriel de PKD2L1 et des canaux ASIC, ont été réalisées chez la souris dans des modèles *in vitro* et avec des stimuli exogènes, voire non physiologiques. Il est ainsi indispensable de développer des modèles plus intégrés, voire *in vivo* pour identifier, dans des conditions physiologiques ou pathologiques, les signaux circulant dans le LCS et susceptibles de moduler l'activité de ces canaux. Ces analyses, pour lesquelles de nombreux

verrous technologiques doivent être levés, sont initiées dans mon équipe d'accueil avec le développement d'approches par imagerie (Ca^{2+} avec GCaMP et voltage-sensible avec JEDI) et d'enregistrements électrophysiologiques *in vivo* des Nc-LCS par la technique de patch-clamp.

3- Les Nc-LCS possèdent des canaux sodiques, calciques et potassiques voltage-dépendants

Nous montrons, dans cette étude, que les Nc-LCS lombaires chez la souris âgée entre 3 à 6 semaines, expriment des canaux Na^+ voltage-dépendants transitoires et TTX-sensibles, sans observer de courants Na^+ persistants ni TTX-résistants. Nous avons également enregistré des canaux K^+ voltage-dépendants fonctionnels, dont les canaux à rectification retardée (I_{KD}) et de type A (I_A). Ces courants K^+ sont caractérisés par une phase transitoire rapide, médiée par des courants sensibles au 4-AP, suivie d'une phase persistante sensible au TEA. Ces résultats sont cohérents avec les études réalisées chez le rat nouveau-né, où ces courants Na_v et K_v ont été enregistrés et soutiennent la maturation et la genèse de PA dans les Nc-LCS (Marichal et al., 2009).

Par ailleurs, nos résultats montrent que les Nc-LCS lombaires expriment des canaux Ca_v fonctionnels, similaires à ceux observés chez le rat nouveau-né (Marichal et al., 2009). Cette présence de Ca_V dans les Nc-LCS suggère qu'ils participeraient à une modulation Ca^{2+}-dépendante de leur activité (cf ci-dessous), mais les conséquences de ces entrées calciques n'ont pas été déterminées, à ce jour chez la souris, ni d'ailleurs dans les autres modèles de vertébrés étudiés. Chez la souris, bien que les Nc-LCS bulbaires expriment des canaux Ca_v de haut seuil de type N ($Ca_V2.2$, HVA) majoritairement (Jurčić et al., 2019), les Nc-LCS lombaires, et plus globalement les Nc-LCS spinaux, expriment à la fois des canaux de haut seuil (High Voltage Activated, HVA) et des canaux de bas seuil (Low Voltage Activated, LVA), de type T. Ces courants de type T sont enregistrés pour des potentiels de membrane plus négatifs, comme le montre le « courant d'épaulement », observé lorsque l'activation des Ca_V est induite à partir de V_h -80 mV (Crozat et al., 2024 BioRxiv). Ces courants, qui sont transitoires et activés pour des potentiels de membrane plus hyperpolarisés que -60 mV, pourraient renforcer ou participer à l'excitabilité des Nc-LCS. Ainsi, les Ca_V de type T seraient dé-inactivés par l'arrivée d'entrées synaptiques inhibitrices hyperpolarisant le potentiel de membrane de la cellule, ce qui permettrait en retour un rebond de décharge de PA. Il s'agit du phénomène de « rebound burst », comme classiquement observé dans les neurones thalamiques (Ulrich & Huguenard, 1997). Une étude récente suggère l'expression de Ca_V de type T dans les Nc-LCS thoraciques et que la génération de PA ne dépendrait pas des canaux Na_V, mais de l'activation des Ca_V à haut et à bas seuil. Les premiers génèreraient des PA calciques de grande amplitude, alors qu'avec l'activation des seconds, la dépolarisation serait plus faible. Les auteurs suggèrent que ce phénomène permettrait de coder pour la nature des entrées synaptiques. Par exemple, la transmission purinergique induirait l'activation des canaux T et des PA calciques de faible amplitude, alors que la transmission cholinergique activerait des canaux à haut seuil et de fortes dépolarisations (Johnson et al., 2023). La caractérisation des conditions d'activation des canaux T demande à être approfondie, surtout en considérant la valeur dépolarisée du potentiel de membrane des Nc-LCS et l'absence d'entrées synaptiques inhibitrices spontanées (cf ci-dessous). Des analyses sur des modèles expérimentaux plus intégrés, voire *in vivo* permettraient de répondre à cette question.

L'analyse du potentiel de membrane au repos (RMP) indique que les Nc-LCS lombaires ont un RMP dépolarisé autour de -50 mV, qui est en moyenne proche de celui observé dans les Nc-LCS bulbaires (Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012), mais plus hyperpolarisé que celui des Nc-LCS cervicaux ou thoraciques (Crozat et al., 2024

BioRxivb). Une étude récente de l'équipe, a estimé le RMP des Nc-LCS lombaires en configuration cellule-attachée, une configuration préservant l'intégrité de la cellule, et trouve des valeurs de RMP hyperpolarisées (Riondel et al., 2024), ce qui est en accord avec les résultats de notre étude. Toutefois, nous n'avons pas observé de différences significatives dans les propriétés passives, la densité des conductances ioniques, notamment potassiques ou l'activité du canal PKD2L1 entre Nc-LCS lombaires et ceux des segments thoraciques ou cervicaux, qui expliqueraient le RMP plus hyperpolarisé des Nc-LCS lombaires.

Marichal et ses collaborateurs ont observé trois types de patrons de décharge (dépolarisation lente calcique, décharge phasique/PA unique et décharge tonique) dans les Nc-LCS de rats nouveau-nés. Cette diversité a été attribuée à des différences de densité de courants Na_v et K_v, à l'expression différentielle de marqueurs d'immaturité neuronale, tel que HuC/D, et à des morphologies distinctes. Petracca et collaborateurs (2016) ont indiqué chez les souris nouveau-nées, que les Nc-LCS auraient une double origine. Ils distinguent les Nc-LCS' dérivant des progéniteurs $Nkx6.1^+/Pax6^+$, des Nc-LCS'' provenant des progéniteurs $Nkx2.2^+/Foxa2^+$. A la naissance, les Nc-LCS' sont localisés dans les régions latérales du canal central et ont une décharge tonique, alors que les Nc-LCS'' sont ventraux et ont un patron de décharge avec un PA unique (Petracca et al., 2016). Chez des souris juvéniles, âgées entre 3 et 6 semaines, nous avons observé que 71 % des Nc-LCS lombaires, présentent une décharge tonique, tandis que 29 % montrent un PA unique, sans lien avec la densité des courants Na_v et K_v, ni avec leur localisation autour du canal central. Chez l'embryon de Xénope, Spitzer & Lamborghini ont montré que les neurones de la ME, possèdent des PA lents calciques puis des PA rapides sodiques, au fur et à mesure de leur maturation (Spitzer & Lamborghini, 1976). Un phénomène similaire pourrait se produire chez les Nc-LCS murins, où les Nc-LCS avec un patron de décharge tonique deviendraient majoritaires avec le développement et se « réorganiseraient » autour du canal central. Ainsi, cette évolution pourrait s'expliquer par une maturation progressive de certains Nc-LCS avec le temps, notamment par l'expression des canaux K^+ dépendant du Ca^{2+} (IK_{Ca}), impliqués dans l'hyperpolarisation du potentiel membranaire après le PA (AHP : after hyperpolarisation), nécessaires à la levée d'inactivation des canaux Na^+ et la génération d'un nouveau PA (Russo & Hounsgaard, 1999). Une étude dédiée aux Nc-LCS au cours du développement apparaît nécessaire pour analyser cet aspect.

En parallèle du volet développemental, la maturation des Nc-LCS et l'apparition d'une décharge tonique des PA, observée dans les Nc-LCS les plus matures, pourraient également être dues à une activité plus importante des canaux PKD2L1. En effet, des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que les canaux PKD2L1 jouent un rôle crucial dans l'activation des Nc-LCS, en générant des dépolarisations suffisamment importantes pour déclencher des PA et ainsi agir comme générateur de PA. Cette même étude indique chez les souris KO PKD2L1, une diminution de la fréquence de décharge des PA spontanée et évoquée, ainsi qu'une augmentation de la proportion de Nc-LCS présentant une décharge à PA unique dans les Nc-LCS bulbaires (Orts Del'Immagine et al., 2015). Pour approfondir le rôle du canal PKD2L1 comme marqueur de la maturité neuronale des Nc-LCS et de son rôle dans la « maturation » du patron de décharge des PA, il serait intéressant, d'analyser la densité de ces canaux dans différentes populations de Nc-LCS autour du canal central et à différents stades du développement. Par ailleurs, il a été montré dans des systèmes d'expression hétérologues, que certains partenaires moléculaires de PKD2L1 influencent son activité. Par exemple, dans des ovocytes en culture, la protéine RACK1 interagit avec PKD2L1 pour assurer son insertion à la membrane, réduisant ainsi son courant (Yang et al., 2011). Des travaux préliminaires de l'équipe, ont révélé l'expression de RACK1 dans les Nc-LCS spinaux de souris adultes. Enfin, PKD2L1 peut s'associer aux protéines PKD1 qui régulent son activité et Petracca et

collaborateurs (2016) ont mis en évidence l'expression de l'isoforme PKD1L2 qui pourrait assurer cette fonction. Des expériences supplémentaires, en fonction du développement et de la localisation des Nc-LCS le long et autour du canal central sont nécessaires. Des approches d'analyse moléculaire, à l'échelle de la cellule unique et de de co-immunoprécipitations, pour étudier l'expression de PKD2L1 et son interaction, avec de potentielles protéines accessoires, permettraient d'adresser le rôle de ce canal dans l'excitabilité des Nc-LCS.

Notre étude indique que les Nc-LCS lombaires expriment des canaux Ca_v fonctionnels et l'activité de ces-derniers est souvent modulée par l'activation de RCPG. Nous avons étudié dans les Nc-LCS lombaires, s'il existait une telle modulation des Ca_V et l'impact potentiel sur l'activité des Nc-LCS et la signalisation calcique. Conformément aux résultats obtenus sur des tranches de tronc cérébral chez la souris (Jurčić et al., 2019), nous avons montré que les canaux Ca_v des Nc-LCS lombaires, sont inhibés après l'activation des récepteurs métabotropiques R-$GABA_B$ et R-mACh, probablement *via* une liaison directe de la sous-unité Gβγ des protéines G (Ikeda, 1996). Nous observons dans notre étude, une modulation GABAergique et cholinergique des Ca_V. Les R-$GABA_B$ sont couplés aux protéines $G_{i/o}$ et il existe cinq isoformes de R-mACh, de m1 à m5, et seuls les isoformes m2 et m4 sont couplées aux protéines $G_{i/o}$. Ainsi, bien que nous n'ayons pas utilisé d'agonistes spécifiques de ces deux récepteurs, nous pouvons en déduire que les sous-types m2 et/ou m4 sont responsables de l'inhibition des canaux Ca_v observés dans les Nc-LCS lombaires. Aucune inhibition des courants portés par les Ca_v, n'a été détectée après l'activation des récepteurs métabotropiques glutamatergiques (R-mGlu), suggérant soit l'absence de ces récepteurs dans les Nc-LCS spinaux, soit l'expression de sous-types de R-mGlu, qui ne seraient pas impliqués dans la modulation des Ca_V chez la souris.

4- Expression de récepteurs synaptiques essentiels à l'intégration des Nc-LCS au réseau locomoteur spinal

Situés à l'interface entre le LCS et le parenchyme spinal, les Nc-LCS lombaires semblent intégrés dans les réseaux neuronaux spinaux et nécessitent l'expression de récepteurs synaptiques pour interagir avec leurs partenaires. Nous avons ainsi recherché dans les Nc-LCS l'expression de récepteurs synaptiques classiques. Dans cette étude, nous montrons que les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs fonctionnels aux neurotransmetteurs inhibiteurs, tels que les récepteurs glycinergiques (R-Gly) et GABAergiques (R-$GABA_A$ et R-$GABA_B$), ainsi qu'aux neurotransmetteurs excitateurs glutamatergiques AMPA/Kainate (R-Glu) et cholinergiques nicotiniques et muscariniques (R-nACh et R-mACh). Ainsi, les Nc-LCS lombaires disposent de la machinerie nécessaire à une communication synaptique et à leur intégration dans un réseau neuronal spinal ou intraspinal, qu'il reste à caractériser. Des résultats similaires ont été obtenus chez la lamproie (Jalalvand et al., 2014 ; 2016b), le rat (Corns et al., 2015; Marichal et al., 2009), et la souris au niveau bulbaire (Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012). En parallèle, nos travaux indiquent que les Nc-LCS lombaires expriment des récepteurs couplés aux protéines G, tels que les récepteurs R-$GABA_B$ et les récepteurs cholinergiques muscariniques (R-mACh), capables de moduler l'activité des canaux Ca_v et donc leur activité. Nous n'avons pas observé de modulation des Ca_V par l'activation de R-mGlu.

Des travaux précédant de l'équipe ont révélé que les Nc-LCS bulbaires présentent exclusivement des activités spontanées GABAergiques et glycinergiques de faible fréquence (≈1 Hz). Cependant, jusqu'à notre étude (Gerstmann et al., 2022) et celle de Nakamura et collaborateurs (2023), peu d'informations étaient disponibles sur la connectivité présynaptique des Nc-LCS chez la souris et en particulier sur l'origine de ces projections. Nos

résultats montrent que l'application d'agonistes exogènes induit des courants inhibiteurs de grande amplitude, suggérant un contrôle inhibiteur important. Par contre, l'activation exogène des récepteurs glutamatergiques AMPA/Kainate a généré des courants de faible amplitude, avec une cinétique lente, similaires à ceux observés au niveau des Nc-LCS bulbaires (Jurčić et al., 2019). De la même manière, les courants générés par l'application d'ACh sont caractéristiques de courants nicotiniques cholinergiques, mais avec une amplitude très faible (≈10 pA). Malgré la faible amplitude des courants générés, nous avons montré que l'activation des récepteurs glutamatergiques et cholinergiques est capable de déclencher des dépolarisations importantes (liées à la forte résistance d'entrée des Nc-LCS) et même des PA, suggérant une possible modulation de l'excitabilité de ces petites cellules (cf ci-dessous pour plus de détails).

En ce qui concerne la transmission purinergique, Marichal et collaborateurs (2009) ont mis en évidence la présence de récepteurs fonctionnels chez le rat nouveau-né. L'application d'ATPγS dans nos modèles, n'a pas permis de mettre en évidence de telles réponses dans les Nc-LCS lombaires, pas plus que dans les Nc-LCS bulbo-spinaux d'une manière générale, ce qui pourrait être dû à une différence entre espèces.

Une question majeure pour comprendre l'activité et la physiologie des Nc-LCS concerne l'identification des signaux et des partenaires, ici présynaptiques, susceptibles de la moduler. D'une part, le LCS représente une voie de transmission volumique permettant le transport de molécules bioactives (neurotransmetteurs, neuropeptides, métabolites…) (Redzic et al., 2005), sur de longues distances et l'une des hypothèses est, que les Nc-LCS intégreraient ces signaux. La nature des signaux du LCS reste à ce jour très élusive et il est nécessaire de réaliser une analyse par dosage et protéomique de sa composition et des éventuelles modifications, notamment en relation avec l'activité motrice ; sujet de ce travail de thèse. Ces molécules circulantes pourraient agir sur les conductances identifiées dans notre étude, ainsi que sur l'activité de PKD2L1, comme chémorécepteur, pour réguler l'excitabilité des Nc-LCS. A ce jour peu d'informations sont disponibles chez la souris, quant à la nature de ces molécules, ni de leur(s) effet(s) sur la physiologie des Nc-LCS.

D'autre part, nous avons mis en évidence que les Nc-LCS expriment des récepteurs synaptiques (iono- et métabotropiques) classiques fonctionnels qui régulent l'activité des Nc-LCS notamment les entrées calciques. Cette observation implique que les Nc-LCS lombaires seraient principalement sous le contrôle d'entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques, mais également glutamatergiques et cholinergiques (cf ci-dessous). Les Nc-LCS pourraient recevoir ces informations *via* une libération synaptique de neurotransmetteurs (contacts fonctionnels ; cf ci-dessous). Nous pouvons également envisager une signalisation de type paracrine ou *via* le LCS (Redzic et al., 2005), bien qu'aucun changement du courant de maintien n'ait été observé, lors de l'application d'agonistes/antagonistes spécifiques. Il reste à présent à déterminer l'origine de ces neurotransmetteurs et la localisation des neurones présynaptiques au contact des Nc-LCS lombaires. Une fois encore, la réponse à cette question fondamentale réside dans des modèles expérimentaux préservant l'environnement natif des Nc-LCS.

B- Les Nc-LCS lombaires, des neurones de projection qui participent à la modulation d'interneurones moteurs

La caractérisation de la connectivité des Nc-LCS est essentielle pour comprendre leur rôle dans la ME et au niveau lombaire, leur contribution dans la modulation de l'activité motrice chez la souris. Comme indiqué précédemment cette analyse passe par l'identification, d'une part, des partenaires présynaptiques, qui modulent l'activité des Nc-LCS et d'autre part, des projections des Nc-LCS vers des cibles postsynaptiques, pour transmettre les informations collectées et réguler les sorties spinales contrôlant les fonctions motrices. A ce jour, chez la souris, la connectivité des Nc-LCS n'est que peu connue.

1- Les Nc-LCS forment un réseau sensoriel récurrent au sein de la ME

Chez la larve de poisson-zèbre, Wyart et collaborateurs (2009) ont observé que les Nc-LCS forment des projections ascendantes ventrales ipsilatérales, pouvant s'étendre sur plusieurs segments. Une organisation similaire a été observée chez le rat, où il a été démontré que les Nc-LCS projettent leur axone vers la région ventrale spinale pour former deux imposants faisceaux de fibres longeant la fissure médiane (Stoeckel et al., 2023). Des études récentes chez la souris, utilisant diverses techniques de traçage, ont mis en évidence ces mêmes faisceaux ventraux qui sont présents de la région lombaire à la région cervicale (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Gerstmann et al., 2022; Jurčić et al., 2021; Nakamura et al., 2023). Ces faisceaux semblent avoir principalement une projection ascendante (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023), bien que Nakamura et collaborateurs (2023) aient indiqué que l'on trouve également des Nc-LCS avec des projections caudales voire bidirectionnelles. Les axones des Nc-LCS se ramifient pour former des plexus denses, que l'on retrouve dans le parenchyme spinal au contact de différents neurones (cf ci-dessous), dont des Nc-LCS autour du canal central. Ces collatérales présentent une densité plus importante au niveau ventral dans les segments lombaires et au niveau dorso-médian au niveau cervical. Au niveau lombaire, cette organisation peut être mise en relation avec la localisation ventrale du réseau moteur et avec la fonction des Nc-LCS comme modulateurs de l'activité motrice.

Par une approche virale de traçage neuronal rétrograde (virus de la rage muté et pseudo typé), nous avons en collaboration avec l'équipe du Dr Zampieri, mis en évidence au niveau lombaire, une projection ascendante et récurrente des Nc-LCS, qui s'étend sur au moins 5 segments spinaux. Par ailleurs, il semblerait que la majorité des connexions GABAergiques, provient de Nc-LCS situés dans des régions plus caudales (Gerstmann et al., 2022) et suggère que les Nc-LCS contrôleraient non seulement l'activité des Nc-LCS locaux, mais aussi celle des Nc-LCS distaux. Pour vérifier cette connexion récurrente entre Nc-LCS, observée au niveau anatomique, nous avons utilisé l'approche CRACM, qui permet d'étudier la neurotransmission photo-évoquée dans un modèle de souris exprimant sélectivement la ChR2 dans la population neuronale d'intérêt. Ainsi, nous avons mis en évidence pour la première fois une connexion récurrente fonctionnelle entre Nc-LCS (Gerstmann et al., 2022). Par ailleurs, nous montrons qu'au minimum 70 % des Nc-LCS sont inter-connectés et les que les réponses sont GABAergiques, en accord avec le phénotype des Nc-LCS. Nos résultats suggèrent que les réponses observées, sont dues à des connexions directes entre Nc-LCS (monosynaptiques) et sont en général de faible amplitude, vraisemblablement induites par la libération de GABA, par une ou un faible nombre de terminaisons synaptiques. Nous n'avons pas mené d'analyse quantique de cette neurotransmission, pour déterminer les propriétés de libération

vésiculaire et la caractériser davantage. Toutefois, nos analyses indiquent que les réponses induites par photo-stimulation ont une latence et un « jitter time » (la différence de temps sur le front de montée de plusieurs réponses consécutives) constants, en accord avec une connectivité monosynaptique entre Nc-LCS. Par ailleurs, les réponses induites présentent un taux d'échec faible et une dépression est visible lorsque deux réponses consécutives, proches dans le temps (PPR <1) sont photo-évoquées, suggérant une haute probabilité de libération.

Classiquement, au sein d'un réseau neuronal, la neurotransmission entre deux neurones, s'insère dans un réseau plus complexe et peut être régulée par la diffusion du neurotransmetteur libéré dans la fente synaptique (rétroaction), ou par l'activation d'autres neurones (connexions axo-axoniques). Cela conduit notamment à une modulation/inhibition des Ca_V, responsables de la libération vésiculaire *via* l'activation de RCPG au niveau présynaptique. Nos résultats indiquent que c'est effectivement le cas, puisque les réponses évoquées entre Nc-LCS sont inhibées par l'activation de R-$GABA_B$, R-mACh et R-5HT. La modulation observée a une localisation présynaptique (variation du PPR) mais la nature et localisation des neurones impliqués n'a pas été identifiée. Pour ce qui est de la régulation GABAergique, elle pourrait-être due à des connexions axo-axoniques des projections de Nc-LCS locaux ou distaux, ainsi qu'à d'autres interneurones GABAergiques locaux. Il faut noter que pour cette modulation GABAergique, nos résultats semblent indiquer qu'il existerait deux types de terminaisons pour lesquelles la libération, est soit inhibée par l'activation des R-$GABA_B$ (majoritaire), soit non modifiée, mais nous n'avons pas de substrat neuronal pour expliquer cette différence. Comme indiqué précédemment, nous n'avons pas, à ce jour, d'évidence anatomique pour une connectivité entre Nc-LCS et neurones cholinergiques, mais ces derniers sont présents en grand nombre dans le réseau lombaire et autour du canal central. Les neurones cholinergiques pourraient ainsi moduler la connectivité entre Nc-LCS, soit directement (contacts synaptiques), soit de manière paracrine (libération d'ACh dans le parenchyme). Ce point reste à être élucidé. Par ailleurs, il existe une importante innervation sérotoninergique descendante autour du canal central, et nos résultats mettent en évidence une modulation sérotoninergique de la neurotransmission entre Nc-LCS mais sans modification du PPR. Ce résultat ne nous a pas permis d'identifier le locus pré- ou postsynaptique de cette modulation. Finalement, l'étude d'une possible modulation glutamatergique de cette neurotransmission est en cours. Il sera nécessaire de continuer cette étude pour compléter les résultats déjà acquis.

Nos données indiquent que les Nc-LCS reçoivent des entrées synaptiques issues, majoritairement, d'autres Nc-LCS. Notre étude a été menée sur des tranches coronales de ME lombaire et nos résultats anatomiques montrent que les Nc-LCS projettent de manière ascendante sur plusieurs segments spinaux. Pour démontrer fonctionnellement l'étendue de ces projections sur l'axe rostro-caudal, nous avons réalisé des hémisections de ME lombaires en conservant l'ensemble de la région ventrale et les axones des Nc-LCS. Ainsi, nous avons enregistré des Nc-LCS, photo-évoqué des réponses synaptiques et déplacé progressivement le faisceau de lumière vers des zones plus caudales. A cette fin, nous avons adapté notre système de photo-stimulation en utilisant une illumination à travers l'objectif mais avec un laser (faisceau de lumière de ≈5 µm de diamètre), afin de limiter la zone de photo-stimulation. Malheureusement, cette approche par épifluorescence n'était pas optimale et induisait malgré tout la photoactivation du neurone enregistré. Il est ainsi nécessaire de transposer cette étude sur un microscope à 2 photons, combiné à l'enregistrement électrophysiologique, qui offrira une précision de stimulation à l'échelle cellulaire. Cette analyse permettra de déterminer sur quelle distance deux Nc-LCS sont connectés, si un Nc-LCS est contacté par plusieurs Nc-LCS et s'il existe une connexion préférentielle en fonction de leur position autour

du canal central. Ces résultats permettront de cartographier ces connexions ascendantes récurrentes entre les Nc-LCS et de préciser l'organisation de la connectivité ente Nc-LCS.

Il est important de rappeler que la transmission GABAergique, joue un rôle important dans la maturation des circuits neuronaux. À la naissance, le GABA passe d'une action dépolarisante à hyperpolarisante sur les neurones, reflétant la maturation des réseaux neuronaux (Ben-Ari, 2002). Des études ont montré que les Nc-LCS conservent un état d'immaturité même à l'âge adulte, notamment observé à travers leurs propriétés électrophysiologiques (dépolarisation lente calcique, décharge phasique), l'expression de marqueurs d'immaturité neuronale (HUC/D, DCX, Nkx6.1, PSA-NCAM), l'expression des transporteurs au Cl^- (NKCC1 et KCC2), ou encore leur morphologie (Djenoune et al., 2014; Kutna et al., 2013; Marichal et al., 2009; Orts-Del'Immagine et al., 2014, 2017; Petracca et al., 2016; Riondel et al., 2024; Russo et al., 2004). De plus, il a été montré que le GABA peut exercer un effet excitateur ou inhibiteur sur les Nc-LCS spinaux chez la tortue (Reali et al., 2011), le rat (Marichal et al., 2009), et la souris (Riondel et al., 2024), suggérant l'existence de différentes populations neuronales, à différents stades de maturité. Chez la souris, deux populations distinctes ont été identifiées : une dépolarisée et l'autre hyperpolarisée par l'activation des récepteurs R-$GABA_A$. Au niveau lombaire, Riondel et collaborateurs (2024) ont montré que dans 70 % des Nc-LCS enregistrés, le GABA provoque des dépolarisations, sans distinction de localisation le long de l'axe dorso-ventral du canal central. Par ailleurs, dans les Nc-LCS où la signalisation GABAergique est excitatrice, l'application de GABA exogène entraîne une élévation du calcium intracellulaire, dépendant du recrutement des Ca_v (Riondel et al., 2024). Bien qu'aucune corrélation n'ait été trouvée, à ce jour, entre l'effet du GABA et la localisation des Nc-LCS, on peut envisager un réseau de projection entre Nc-LCS dans lequel la transmission GABAergique serait majoritairement excitatrice et permettrait ainsi une activation caudo-rostrale des Nc-LCS le long de l'axe du canal central et la coordination de leur activité.

La poursuite de l'étude sur l'action physiologique du GABA sur les Nc-LCS, lors de la transmission récurrente entre Nc-LCS, permettrait de mieux caractériser ce réseau et d'identifier différentes populations de Nc-LCS, qui se distingueraient par leur signalisation GABAergique (excitatrice ou inhibitrice), associée à la nature des voies de projection et des partenaires postsynaptiques. La confirmation de cette signalisation et de ses conséquences fonctionnelles, pourrait être testée sur des tranches longitudinales par des enregistrements en patch-clamp, en configuration cellule-attachée (voire patch-perforé), afin de préserver la concentration intracellulaire physiologique de Cl^-. Ces enregistrements pourraient être combinés à la stimulation optogénétique de Nc-LCS $ChR2^+$ locaux ou à distance. Nous pourrions ainsi observer les conséquences physiologiques de la transmission GABAergique sur les variations du potentiel de membrane des Nc-LCS, cartographier ces réponses en fonction de la position des Nc-LCS cibles autour du canal central et le long de ce-dernier. Une alternative serait de mener cette analyse par imagerie à l'aide de sondes voltage-sensibles, une approche développée à l'INT.

Ainsi, les Nc-LCS représentent l'une des rares population de neurones GABAergiques de projection du SNC, sur de longues distances (long-range projection) avec un dense faisceau de fibres ascendantes. Les principales fibres présynaptiques sont issues de Nc-LCS plus caudaux ce qui suggère que les Nc-LCS lombaires sont insérés dans un réseau récurrent entre Nc-LCS. On peut envisager que les Nc-LCS lombaires détecteraient au niveau local des informations sensorielles et auraient une activité coordonnée le long de l'axe du canal central, avec une modulation de leurs entrées synaptiques par des interneurones locaux et en fonction de

l'activité du réseau lombaire. La nature de cette modulation et les conditions de son activation reste à être caractérisées. Par ailleurs, dans la mesure où les Nc-LCS sont des neurones GABAergiques, on peut se demander quelle est la fonction de cette connectivité récurrente qui à priori inhiberait les Nc-LCS.

2- Autres partenaires présynaptiques des Nc-LCS

Des études électrophysiologiques, chez le rat et la souris, ainsi que nos résultats, ont révélé que les Nc-LCS expriment un ensemble de récepteurs synaptiques (cf ci-dessus) (Crozat et al., 2024 BioRxiv; Jurčić et al., 2019; Orts-Del'immagine et al., 2012). Au niveau bulbaire, une activité synaptique spontanée à une fréquence de ≈1 Hz, principalement GABAergique, a été observée (Jurčić et al., 2019; Orts Del'Immagine et al., 2015; Orts-Del'immagine et al., 2012). Il a été possible d'évoquer électriquement des réponses postsynaptiques GABAergiques et glutamatergiques dans ces mêmes neurones (Jurčić et al., 2019). En revanche, au niveau spinal, malgré les réponses induites par l'exposition à des agonistes exogènes, nous avons uniquement observé une activité synaptique spontanée de faible fréquence dans les Nc-LCS. Ce résultat pourrait en partie être dû à l'activité de Nc-LCS présynaptiques. Les Nc-LCS représentent la population la plus importante de neurones présynaptiques des Nc-LCS et leur faible fréquence de décharge spontanée de PA, voire son absence, pourraient expliquer la faible activité synaptique observée. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les axones des Nc-LCS projettent de manière horizontale. Pour les enregistrements électrophysiologiques, les tranches ont été réalisées dans l'axe transversal, qui n'est pas optimal, avec peu d'axones et de terminaisons (cf ci-dessous la Section C, Considérations techniques). Enfin, il est envisageable que la préparation *in vitro* ne soit pas adaptée parce qu'elle ne contient pas les éléments et conditions physiologiques nécessaires, à une activité synaptique optimale. Des préparations horizontales de type hémisection, pour préserver l'ensemble des axones des Nc-LCS, pourraient être testées pour vérifier cette hypothèse, ainsi qu'un milieu extracellulaire avec une concentration de potassium plus élevée (de 3 à 6 mM par exemple), afin d'augmenter l'excitabilité du réseau et favoriser la libération de neurotransmetteurs.

Par une approche virale de traçage neuronal rétrograde, Gerstmann et collaborateurs ont mis en évidence les interneurones présynaptiques des Nc-LCS. Ces neurones en faible proportion, sont GABAergiques et glutamatergiques et principalement localisés dans la région dorsale de la ME. Leur connectivité fonctionnelle avec les Nc-LCS n'a pas encore été mise en évidence. Au niveau anatomique, aucune fibre axonale de neurones cholinergiques ou d'un autre phénotype n'a, à ce jour, été identifiée au contact des Nc-LCS lombaires, bien que ces-derniers possèdent des récepteurs synaptiques fonctionnels pour les neurotransmetteurs libérés par ces neurones. Toutefois des analyses par immunohistofluorescence ou à l'aide de modèles transgéniques (ChAT-tdTomato) indiquent, la présence de nombreux neurones $ChAT^+$ autour du canal central, qui pourraient libérer de l'ACh synaptiquement ou par voie paracrine. Notre étude a été menée sur des sections fines de 30-40 µm, qui sont susceptibles de sous-estimer le nombre de ces neurones présynaptiques. Une analyse similaire menée sur des ME entières transparisées et imagées par microscopie à feuillets de lumière, apporterait plus d'informations sur la connectivité. Celle-ci est actuellement en cours au sein de l'équipe.

Un autre axe d'analyse concerne l'identification et la démonstration de la connectivité fonctionnelle entre Nc-LCS et les autres populations d'interneurones présynaptiques. Il sera nécessaire, pour identifier ces neurones, de combiner une approche de traçage monosynaptique rétrograde (virus de la rage muté) (Gerstmann et al., 2022), avec une expression sélective de ChR2 dans ces-mêmes neurones. Il sera ainsi possible de reproduire la

stratégie CRACM dans ce modèle. Cependant, cette étude représente toutefois un défi technologique important du fait de la fragilité (faible survie) des neurones infectés par le virus de la rage dans des préparations *in vitro* et de la difficulté d'identifier les Nc-LCS synaptiquement connectés. Cette étude permettrait néanmoins de préciser la cartographie présynaptique des Nc-LCS et les conséquences sur leur activité.

3- Les Nc-LCS lombaires, des acteurs de la modulation du réseau moteur

Identifier la connectivité postsynaptique des Nc-LCS chez la souris, est une étape clé pour déterminer, dans un premier temps, si les Nc-LCS lombaires sont intégrés au réseau moteur spinal, et dans un deuxième temps, s'ils modulent l'activité motrice au niveau de la ME lombaire. L'analyse anatomique de cette connectivité a révélé la présence de terminaisons synaptiques provenant des Nc-LCS, à proximité d'interneurones cholinergiques V0c et glutamatergiques V2a Chx10^{+} et V0 Lhx1^{+} (Gerstmann et al., 2022 ; Nakamura et al., 2023). La connectivité des Nc-LCS avec ces interneurones, impliqués dans la locomotion, suggère une potentielle intégration des Nc-LCS au sein du réseau moteur spinal.

Nakamura et collaborateurs (2023) ont démontré qu'il est possible d'infecter de manière sélective les Nc-LCS par des injections icv de constructions virales *via* le LCS et de tracer leurs axones. Nos résultats anatomiques, obtenus à partir d'infections virales des Nc-LCS (injections icv réalisées en collaboration avec J Ramirez-Franco, chercheur post-doctoral dans l'équipe), dans des modèles animaux, où les neurones cholinergiques (ChAT-tdTomato) et GABAergiques (venus-vGAT) sont sélectivement identifiés, confirment ces observations. L'analyse de ces données montre que les Nc-LCS projettent vers des neurones cholinergiques et GABAergiques, situés dans la région latérale et ventromédiane de la ME lombaire, confirmant ainsi les résultats des études antérieures. Pour compléter cette caractérisation, il sera nécessaire de reproduire ces expériences chez des souris transgéniques où les neurones glutamatergiques et les fibres sérotoninergiques sont identifiés.

A l'échelle du circuit, nos données mettent en évidence une connectivité fonctionnelle des Nc-LCS, avec des interneurones du réseau moteur lombaire et sont en accord avec notre étude antérieure (Gerstmann et al., 2022). Nous avons ainsi mis en évidence que les Nc-LCS projettent vers des interneurones GABAergiques (dI6 et V0v), glutamatergiques (V0g, V2a Chx10^{+} et non-V2a) et cholinergiques (V0c). Les interneurones identifiés sont responsables du contrôle d'éléments clés de la locomotion, que nous discuterons plus dans la partie suivante (Section D3, ci-dessous). Il est important de noter que notre étude de la connectivité par la stratégie CRACM, a permis d'identifier une connexion pour seulement 15 % (147/982) des interneurones enregistrés. En considérant la densité des Nc-LCS, leurs projections et l'étendue des collatérales, formant de larges plexus, nous pouvons nous étonner de ce faible pourcentage de connectivité. Ceci peut éventuellement s'expliquer par une projection majoritaire vers les Nc-LCS (cf ci-dessus), mais également par des limitations techniques (cf Section C, Considérations techniques). Ces-dernières peuvent être liées à l'utilisation de coupes transversales de ME pour laquelle l'axe de coupe est perpendiculaire à l'axe de projection des axones des Nc-LCS (faisceau ventral longitudinal) et qui ne préserve, dans la tranche, vraisemblablement que les fibres et terminaisons et peu ou pas les corps cellulaires. Par ailleurs, elle peut également s'expliquer par le niveau d'expression de la ChR2 et de son efficacité, des aspects que nous aborderons ultérieurement.

Enfin, un ensemble de données de la littérature indique que les différents sous-types d'interneurones du réseau moteur lombaire, se distinguent par leurs propriétés intrinsèques et de décharge. A partir des enregistrements électrophysiologiques des interneurones

connectés, nous avons étudié leurs propriétés intrinsèques ainsi que celles de leurs PA, leur patron de décharge et leurs propriétés rythmiques. Dans l'ensemble, l'analyse de ces paramètres, met en évidence des propriétés passives globalement similaires et on observe deux types majeurs de décharge de PA (immédiate et retardée) dans les populations d'interneurones enregistrés. Cependant, en raison de la diversité des sous-types cellulaires, de l'influence des conditions d'enregistrement (solutions intracellulaire, température, etc.) et de l'âge des animaux, il a été difficile de comparer nos résultats avec ceux de précédentes études et donc de regrouper ces différentes cellules et de les associer à des populations spécifiques. Pour pallier cela, nous avons mis en place un protocole de RT-PCR sur cellule unique (single-cell RT-PCR), afin de déterminer avec précision le phénotype des partenaires postsynaptiques des Nc-LCS. Enfin, il convient de préciser qu'en se basant sur les résultats anatomiques, des partenaires présumés et la présence de nombreuses fibres tdTomato$^+$ des Nc-LCS, les enregistrements électrophysiologiques ont été limités aux seuls neurones situés dans les régions latérales et ventromédianes, proches du canal central. Ainsi, il n'est pas exclu que d'autres partenaires postsynaptiques puissent être situés à des distances plus éloignées du canal central, dans des régions dorsales ou plus ventrales de la ME.

L'analyse des propriétés de la neurotransmission entre Nc-LCS et interneurones (nous n'avons pas analysé ces paramètres en fonction du phénotype des interneurones) a été réalisée à l'aide d'une répétition de quatre stimulations optogénétiques consécutives. Nos données montrent que la neurotransmission entre Nc-LCS et interneurones est robuste avec un taux moyen de réponse sur les quatre stimulations de 75 %, un faible taux d'échec et une diminution progressive de l'amplitude des IPSC, lors de stimulations successives. Ces résultats suggèrent que les terminaisons synaptiques des Nc-LCS présentent une probabilité élevée de libération vésiculaire. La pharmacologie de la neurotransmission et l'analyse des cinétiques des réponses évoquées sont en accord avec des courants portés par l'activation de R-GABA$_A$. Concernant l'activité synaptique, même si nous avons observé à certaines occasions des réponses qui présentaient un front de montée, ainsi qu'un « decay time » avec des « décrochements » multiples, qui suggèrent une libération multivésiculaire sur un site de libération, ou des réponses qui seraient dues à l'activation simultanée de plusieurs terminaisons (polysynaptiques), la connectivité entre Nc-LCS et interneurones semble directe. Plusieurs arguments soutiennent une connectivité monosynaptique. En effet, dans l'ensemble, l'analyse du temps de latence des réponses suite à la photo-stimulation, indique qu'il ne varie pas et que le « jitter time » est lui aussi, stable. Par ailleurs, les réponses persistent lorsque la neurotransmission glutamatergique est bloquée (application de DNQX). Enfin, pour confirmer la nature monosynaptique de la connectivité mise en évidence, nous avons utilisé une approche pharmacologique avec l'ajout de TTX et de 4-AP (Petreanu et al., 2007). La TTX, qui empêche la génération de PA, bloque largement la transmission synaptique (mono- et polysynaptique), induite par le réseau et ainsi, la libération de neurotransmetteurs est directement liée à la seule photo-stimulation des terminaisons axonales. L'ajout de 4-AP, qui bloque les canaux potassiques essentiels à la repolarisation de l'axone, permet de prolonger la dépolarisation des terminaisons lors de l'activation de la ChR2, augmentant ainsi la fusion et la libération vésiculaire. Dans le cas d'une connexion monosynaptique, l'amplitude des réponses photo-évoquées est partiellement restaurée (Linders et al., 2022; Petreanu et al., 2007). Nos résultats montrent une récupération des IPSC dans 30 % des cas et soutient ainsi une connectivité monosynaptique, même s'il existe des limitations liées à l'utilisation de la ChR2, que nous discuterons par la suite (Section C, Considérations techniques). Quoi qu'il en soit, pour des souris âgées de plus de 3 semaines, les interneurones susceptibles d'être synaptiquement connectés avec les Nc-LCS, présentent une homéostasie du chlore mature

(concentration intracellulaire de chlore faible) et une signalisation GABAergique inhibitrice. Il est ainsi peu probable que les réponses observées fassent intervenir un neurone intermédiaire, ce-dernier serait inhibé et ne pourrait pas induire de réponse dans le neurone enregistré.

Nous avons finalement testé la modulation de la connectivité entre Nc-LCS et interneurones par l'activation de récepteurs métabotropiques. Nos résultats indiquent, que l'activation de RCPG GABAergiques et cholinergiques, présents sur les boutons synaptiques des Nc-LCS, inhibe cette neurotransmission. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de modulation par la sérotonine, suggérant que les R-5HT n'ont pas d'effet sur la neurotransmission étudiée. Ces données seront complétées par l'analyse d'une modulation par les R-mGlu. Pour les R-$GABA_B$, nous pouvons envisager que l'inhibition est induite, au moins en partie, par la diffusion rétrograde dans la fente synaptique du GABA libéré par les Nc-LCS, mais nous ne pouvons pas exclure l'implication d'autres interneurones GABAergiques du réseau lombaire. En ce qui concerne la modulation cholinergique, comme discuté précédemment, elle pourrait être médiée par les nombreux interneurones cholinergiques spinaux. Cette analyse de la modulation de la neurotransmission a été réalisée sur des connexions établies avec des interneurones, pour lesquels le phénotype n'a pas été identifié. Nous pouvons ainsi nous demander si la nature des RCPG activés serait différente en fonction de la nature des cibles postsynaptiques. Chez le poisson-zèbre, une étude récente a révélé que la co-expression de neurotransmetteurs par les neurones spinaux est plus étendue que prévue, ajoutant une nouvelle complexité aux réseaux spinaux (Pedroni & Ampatzis, 2019). Chez la lamproie, les Nc-LCS de type 1 (Jalalvand et al., 2014) et chez le poisson-zèbre (Djenoune et al., 2014), le GABA est co-exprimé avec la somatostatine. Nous montrons ici que la transmission synaptique entre les Nc-LCS et interneurones est médiée par le GABA *via* les récepteurs R-$GABA_A$, mais nous ne pouvons pas exclure une co-libération du GABA avec des neuropeptides, qui permettraient un autre niveau de modulation. Cet aspect n'a pas été adressé dans la présente étude.

Ainsi, nous avons mis en évidence une connexion fonctionnelle entre Nc-LCS et des interneurones clés du réseau moteur, principalement impliqués dans l'alternance gauche-droite des membres postérieurs, la coordination des mouvements et l'adaptation à la fréquence du pas. Ces connexions permettraient de contrôler, le long de l'axe lombaire des segments L1 à L6, ces populations d'interneurones, tout en coordonnant cette modulation avec les connexions récurrentes des Nc-LCS, présents tout le long de l'axe rostro-caudal de la ME. Une des réponses qu'il faudra apporter, dans la poursuite de la caractérisation de la connectivité des Nc-LCS lombaires au sein du réseau moteur, concerne la nature des stimuli qui activent les Nc-CS, qu'ils soient issus de la transmission volumique *via* le LCS ou de l'activation par leurs partenaires synaptiques.

C- Considérations techniques

Pour mon projet de thèse présenté ici, nous avons utilisé un ensemble de techniques de pointes qui ont permis de répondre à un ensemble de questions cruciales sur les propriétés des Nc-LCS lombaires, leur connectivité et l'identité de leurs partenaires synaptiques. Elle soulève, toutefois, un ensemble de questions d'ordre technique et de défis technologiques qu'il faudra relever à l'avenir.

1- Préparation *in vitro* et limitations expérimentales

Ainsi, les Nc-LCS projettent leur axone dans la région ventrale de la ME pour former des faisceaux longitudinaux ascendants avant de se ramifier pour former des plexus de fibres et des terminaisons synaptiques. Bien que plus facile à mettre en place, l'utilisation de coupes coronales de ME de 300 µm ne semble pas optimale dans notre étude, puisqu'elles sont réalisées perpendiculairement à l'axe de projection des fibres. Par ailleurs, comme les Nc-LCS projettent de façon ascendante, il est peu probable que nous ayons directement stimulé les corps cellulaires des Nc-LCS connectés, limitant ainsi la stimulation aux seules terminaisons synaptiques $ChR2^+$. Cela pourrait expliquer la faible densité/proportion des connexions fonctionnelles enregistrées. Ces expériences pourraient être reproduites en utilisant des hémisections dorso-ventrales pour enregistrer les interneurones à la surface de la section, tout en préservant intacte la partie ventrale, et donc les projections ventrales des Nc-LCS et leur corp cellulaire. Pour mener à bien cette étude, une illumination infra-rouge classique par transmission, à travers la chambre d'enregistrement et le tissu, n'est pas possible du fait de l'épaisseur de la préparation (entre 500-600 µm). Pour cela, il est nécessaire d'adapter le système d'illumination oblique développé par Krotov et collaborateurs (Krotov et al., 2017), qui permettra, combiné à la stratégie CRACM, de visualiser la surface de l'hémisection et d'enregistrer les interneurones d'intérêts.

Les données recueillies par Gerstmann et collaborateurs (2022), ainsi que des résultats préliminaires obtenus au sein de l'équipe, indiquent que les Nc-LCS projetteraient vers les colonnes médianes, voire latérales des motoneurones et suggèrent qu'ils pourraient former des connexions directes avec ces-derniers. Nous avons essayé de mettre en évidence de telles connexions notamment sur des tranches coronales et longitudinales de ME lombaire mais à ce jour, nos résultats ont été infructueux. Cela s'explique par le fait qu'il est difficile de maintenir « en vie » les motoneurones dans des préparations *in vitro* au-delà de 15 jours, que la connectivité des Nc-LCS dans de telles préparations est faible et que la ChR2 présente un faible niveau d'expression dans les Nc-LCS à des âges précoces. Il est envisagé de développer la préparation d'hémisection combinée à l'illumination oblique à partir d'animaux ChAT-tdTomato dans lesquels, les Nc-LCS exprimeraient la ChR2 (infection par voie icv avec des AAV-ChR2). Il sera ainsi possible de préserver les motoneurones, de les visualiser grâce à la fluorescence tdTomato et de photo-stimuler les projections des Nc-LCS. Bien que représentant un défi technologique, cette étude permettrait, pour la première fois, de confirmer que les Nc-LCS projettent directement sur les motoneurones.

2- Optogénétique et analyse de la connectivité

Notre analyse de la connectivité entre Nc-LCS et interneurones indique une grande variabilité dans l'amplitude des IPSC enregistrés, mesurant en moyenne -150 pA et pouvant atteindre -2000 pA. Ces résultats suggèrent une variabilité dans la nature des connexions, qui peut dépendre du niveau d'expression des $R\text{-}GABA_A$ dans un sous-type d'interneurones donnés, mais également du niveau de « couverture » synaptique. Notre analyse de

l'amplitude des IPSC ne met pas en évidence de différence marquée de l'amplitude des réponses en fonction du sous-type neuronal enregistré. Hubbard et collaborateurs (2016) ont montré, chez la larve de poisson-zèbre, une variabilité similaire au sein d'une même population neuronale. Ce qui suggère que la variabilité observée, serait plutôt due à des différences dans le nombre connexions établies entre Nc-LCS et interneurones, mais également dans le nombre de terminaisons photo-stimulées et ainsi dans l'efficacité de cette approche à générer des PA. Bien que la stratégie CRACM ait permis de mettre en évidence, pour la première fois, des connexions synaptiques fonctionnelles et d'identifier le phénotype des interneurones connectés, elle présente des limitations pour caractériser précisément la connectivité et la couverture synaptique. En effet, elle ne permet aucun contrôle du nombre de terminaisons stimulées lors d'une stimulation lumineuse. Par ailleurs, le faible taux de connectivité synaptique observé, la variabilité de l'amplitude des IPSC photo-évoqués et le faible pourcentage de récupération des réponses observées en présence de TTX et de 4-AP, pourraient être liés à l'utilisation de la ChR2. La ChR2 est exprimée dans le soma, l'axone et les terminaisons neuronales. Dans les tranches coronales, même si les axones sont séparés du soma, ils restent fonctionnels, puisque des PA peuvent encore se propager, permettant ainsi l'étude de la connectivité dans un circuit local ou reliant des régions plus éloignées (Petreanu et al., 2007). Pour étudier la connectivité fonctionnelle des Nc-LCS, nous avons utilisé une LED illuminant l'ensemble du champ optique, permettant ainsi l'activation d'un plus grand nombre d'axones et de boutons synaptiques. Cependant, dans certains cas, il est possible que la capacité de la ChR2 à dépolariser les terminaisons des Nc-LCS et donc à induire une libération vésiculaire, soit insuffisante, probablement parce que les photocourants médiés par la ChR2, ne sont pas suffisamment grands pour déclencher une libération synaptique. L'activation de la ChR2 induit une dépolarisation du potentiel de membrane des neurones et pour générer une dépolarisation suffisante pour induire des PA ou activer des Ca_V, la protéine ChR2 doit être exprimée avec une forte densité à la membrane, en raison de la faible conductance du canal unitaire (Zeng & Madisen, 2012). En l'état, nous n'avons aucune donnée du niveau d'expression de cette protéine, en fonction du compartiment cellulaire considéré (soma, axone, terminaison). Cela met en évidence l'importance d'utiliser une lignée transgénique permettant un niveau d'expression du transgène élevé dans les cellules d'intérêt, ainsi que d'étudier les conditions dans lesquelles la ChR2 est exprimée à la membrane et donc fonctionnelle. Au cours des enregistrements, nous avons également observé un effet marqué de l'âge et du phénotype des souris. En effet, la probabilité de réponses est de 13 % chez des souris homozygotes de P14 à P20, contre 32 % chez celles âgées de P35 à P42. Cette probabilité chute à 19 % chez les souris hétérozygotes de P35 à P42. Ainsi, les considérations physiologiques associées aux limitations techniques pourraient en grande partie, expliquer les résultats obtenus pour la connectivité.

3- Analyse du profil moléculaire par la RT-PCR sur cellule unique

À ce jour, aucune étude fonctionnelle n'a identifié les partenaires postsynaptiques des Nc-LCS chez la souris. Ces informations sont cruciales pour valider les études anatomiques et pour mieux comprendre le rôle des Nc-LCS au niveau lombaire. Avec l'aide de Caroline Blanc-Tailleur, spécialisée en biologie moléculaire au sein de notre équipe, nous avons mis en place la technique de RT-PCR sur cellule unique (single cell RT-PCR). Le travail en conditions exemptes de RNAses et l'utilisation de contrôles pour éviter toute contamination des échantillons, ont été déterminants pour obtenir un matériel exploitable. Grâce aux avancées en génétique, il est maintenant possible d'identifier plusieurs classes majeures d'interneurones spinaux, en fonction de leurs profils d'expression de facteurs de transcription

(FT). Compte tenu de la faible quantité d'ARNm dans les échantillons, les produits de rétrotranscription ont été dilués de moitié, afin de pouvoir tester plusieurs FT successivement, tout en incluant à chaque fois un contrôle de l'actine. Nous avons d'abord cherché à détecter l'expression de gènes codants pour le transporteur vésiculaire du glutamate (Slc17a6, vGluT2), l'enzyme de la synthèse d'acétylcholine (ChAT : choline acétyltransférase) et l'enzyme de synthèse du GABA (GAD65/67). Les résultats obtenus ont orienté la suite des FT à tester. En tenant compte de la quantité limitée de matériel et de la grande diversité des FT exprimés par les sous-populations de neurones ventraux spinaux (Alaynick et al., 2011; Blum et al., 2021; Lu et al., 2015; Russ et al., 2021), nous avons priorisé les FT classiques puis des FT plus spécifiques, pour affiner nos résultats. L'expression d'au minimum quatre FT, ainsi que la cohérence des résultats obtenus (expression d'un code de FT précis), ont servi de critères d'inclusion. Cette étude est qualitative et permet de décrire la présence ou l'absence de FT. Afin de tenir compte des différences temporelles d'expression des FT, nous avons uniquement testé des FT dont l'expression est activée dans les neurones post-mitotiques. Enfin, ces expériences ont été réalisées sur des souris âgées de P14 à P28, car l'un des FT ciblé est exprimé jusqu'à P30 (Pitx2, Zagoraiou et al., 2009).

4- Nc-LCS et approche de marche fictive

Pour savoir si les Nc-LCS étaient des modulateurs de l'activité motrice spinale chez la souris, nous avons utilisé des préparations isolées de ME lombaires de souris nouveau-nées entre P0 et P3, exprimant la ChR2 dans les Nc-LCS. La préparation de locomotion fictive évoquée pharmacologiquement (10 µM NMA + 10 µM 5-HT), permet de reproduire une activité motrice rythmique et de l'enregistrer par des électrodes extracellulaires, placées de chaque côté de la préparation, au niveau racines ventrales, innervant les muscles extenseurs (L5) et fléchisseurs (L2). Il est ainsi possible d'enregistrer l'alternance ipsilatérale entre les muscles antagonistes, et l'alternance gauche-droite. Nous avons réalisé cette étude en contrôle et pendant l'activation optogénétique des Nc-LCS. Pour des intensités de stimulation lumineuse (<10 $mW.mm^2$) n'induisant pas d'augmentation significative de la température sur la préparation, nous n'avons pas mis en évidence de changements dans la fréquence, l'amplitude ou la coordination (alternance gauche-droite et fléchisseur-extenseur) des bouffées de PA. En revanche, pour des intensités de stimulation plus élevées, généralement utilisées dans la littérature, nous avons observé des effets, accompagnés d'une élévation de la température. Nous avons ainsi attribué ces modifications à un artéfact dû à la température. Par ailleurs, la validation de notre modèle optogénétique à mis en évidence une expression insuffisante de la ChR2 chez des souris de moins de 15 jours. En effet, comme indiqué plus haut, l'expression de la ChR2 était diffuse dans le cytoplasme des Nc-LCS et non concentrée à la membrane. De plus, les enregistrements en patch-clamp ont montré une faible amplitude des photo-courants, insuffisante pour induire des PA. Cependant de nombreuses études chez le poisson-zèbre (Eklöf-Ljunggren et al., 2012; Ljunggren et al., 2014) ou chez la souris (Hägglund et al., 2013), ont utilisé cette même technique. Il est possible que la fonctionnalité de la ChR2 dépende du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. Cependant, même si les Nc-LCS sont des cellules formées tardivement et qui gardent un état immature, la stimulation optogénétique fonctionne chez les larves de poisson-zèbre (Fidelin et al., 2015; Wyart et al., 2009).

D- Le rôle des Nc-LCS dans les fonctions motrices dans les modèles aquatiques et murins

Les données de notre étude démontrent que les Nc-LCS lombaires sont interconnectés et semblent former un réseau ascendant récurrent et indiquent, pour la première fois, qu'ils établissent des connexions fonctionnelles avec des interneurones clés du réseau moteur spinal. Chez le poisson-zèbre, les Nc-LCS présentent des similitudes avec ceux de la lamproie et d'autres espèces de vertébrés, y compris les mammifères. Ces neurones sont GABAergiques et sont localisés près du canal central, où ils projettent une dendrite se terminant par une protrusion ciliée. De plus, comme évoqué précédemment, les connexions entre les interneurones spinaux de la corne ventrale sont globalement similaires chez le poisson-zèbre et la souris (Sengupta & Bagnall, 2023), permettant ainsi d'établir des parallèles entre ces modèles de vertébrés.

1- Rôle de la connexion récurrente des Nc-LCS dans l'activité motrice

La coordination le long de l'axe rostro-caudal est cruciale pour la locomotion, tant chez la lamproie, les poissons que chez les vertébrés quadru- et bipèdes. Chez le poisson-zèbre, il a été mis en évidence l'existence d'une connexion ascendante récurrente des Nc-LCS GABAergiques. Chez la larve de poisson-zèbre, Fidelin et collaborateurs (2015) ont montré que les Nc-LCS projettent sur 2 à 6 segments en moyenne et inhibent les interneurones glutamatergiques V0v, dont les projections descendantes s'étendent sur 15 à 20 segments. L'activation des Nc-LCS entraine une inhibition de l'activité motrice au niveau des segments rostraux et caudaux et cette inhibition est plus marquée lorsque les Nc-LCS rostraux sont activés. Ces résultats suggèrent que l'action inhibitrice des Nc-LCS sur l'activité motrice, se propage préférentiellement vers la partie caudale en modulant les projections descendantes des V0v (Fidelin et al., 2015). Cette connexion récurrente ascendante semble en accord avec l'activité de nage, qui nécessite des boucles de rétrocontrôle négatif entre les segments caudaux et rostraux, pour coordonner les mouvements ondulatoires. Chez les vertébrés à membres, le rôle de cette connexion reste à clarifier. Récemment, l'équipe a montré que les Nc-LCS présentent une distribution croissante le long de l'axe rostro-caudal de la ME (Crozat et al., 2024 BioRxiv), suggérant l'existence de différents circuits, connexions et actions, comme observés chez le poisson-zèbre (Wu et al., 2021). Chez la souris, Gerstmann et collaborateurs, ont montré que les Nc-LCS projettent sur au moins 5 segments (Gerstmann et al., 2022). Cette connexion récurrente ascendante pourrait contrôler non seulement l'activité des Nc-LCS locaux, mais aussi celle des Nc-LCS distaux, afin de moduler les retours sensoriels. Localement, cette récurrence pourrait agir sur des interneurones lombaires des segments proximaux et distaux, en exerçant des inhibitions/excitations (GABA hyperpolarisant/dépolarisant) en cascade pour propager l'information le long de l'axe rostro-caudal, facilitant ainsi la coordination séquentielle des motoneurones et des muscles des membres et du tronc.

2- Rôle sensoriel des Nc-LCS dans l'activité motrice

Les Nc-LCS ont des propriétés de neurones sensoriels, notamment par l'expression de PKD2L1. Ainsi, les retours sensoriels, qui rendent compte de l'activité motrice, vont permettre aux Nc-LCS de contrôler l'activité de nage, en adaptant l'acte locomoteur. Chez le poisson, la nage est rendue possible par le phénomène ondulatoire, qui se propage le long du corps et qui va entrainer la torsion de la ME, ainsi qu'une variation de la pression et du flux du LCS. Les travaux menés chez la larve de poisson-zèbre ont démontré que le transport du LCS, le long du canal central, dépend de la mobilité des cils présents au niveau des cellules épendymaires,

bordant la lumière du canal central. Les Nc-LCS *via* l'activation de PKD2L1 sont capables de détecter le flux du LCS et des stimuli mécaniques. Les Nc-LCS possèdent ainsi des propriétés mécanosensibles, qui leur permettent de détecter la torsion de la ME et des changements de flux du LCS pour moduler en retour, l'activité de nage (Sternberg et al., 2018). En plus, de participer au transport du LCS, la mobilité des cils, est cruciale pour la formation de la fibre de Reissner (RF) et la morphogenèse de l'axe du corps (Cantaut-Belarif et al., 2018). La sensibilité mécanique des Nc-LCS, repose non seulement sur la mobilité de leurs cils, mais aussi sur leur interaction avec la RF (Orts-Del'Immagine et al., 2020; Sternberg et al., 2018). La RF est principalement constituée de SCO-spondine, une glycoprotéine sécrétée au niveau du 3ème ventricule, qui s'agrège pour former une longue « tresse », qui s'étend jusqu'au canal central (Rodríguez et al., 1998) et qui se déplace avec les mouvement de la ME. Il a récemment été démontré que les Nc-LCS interagissent avec la RF *via* leur protrusion ciliée et sont ainsi capables de détecter la courbure active ou passive de l'axe du corps, par l'activation de PKD2L1. En retour, les Nc-LCS activent les circuits spinaux pour moduler la nage (Böhm et al., 2016; Sternberg et al., 2018).

Par ailleurs, il semble que la détection de signaux chimiques, notamment la variation de pH extracellulaire, consécutive à une activité motrice importante, par les canaux PKD2L1 exprimés par les Nc-LCS, permettent également de moduler le comportement de nage, bien que les mécanismes précis qui sous-tendent cet effet soient moins bien établis (Jalalvand et al., 2016b).

3- Les Nc-LCS sont intégrés au réseau moteur spinal

En s'appuyant sur des données anatomiques et physiologiques, Sengupta et Bagnall (2023) ont répertorié la diversité des connexions dans la corne ventrale de la ME, chez différents vertébrés, tels le poisson-zèbre, le têtard et la souris. Leur étude montre que la majorité des neurones ventraux établissent des connexions récurrentes et qu'ils sont connectés avec une grande variété de partenaires, et met en évidence des similitudes entre les circuits du poisson-zèbre et de la souris (Sengupta & Bagnall, 2023). Nos résultats, chez la souris vont dans le même sens, suggérant une interaction complexe entre plusieurs circuits et des similitudes quant au rôle des Nc-LCS.

D'un point de vue comportemental, Wyart et collaborateurs ont montré, chez la larve de poisson-zèbre éveillée, que les Nc-LCS modulent l'activité motrice. En effet, ces neurones sont suffisants pour activer le CPG locomoteur à des stades précoces du développement, lorsque la transmission GABAergique est encore excitatrice et sont nécessaires au maintien d'une fréquence normale de nage spontanée (Böhm et al., 2016; Wyart et al., 2009). Les Nc-LCS interviennent également dans la modulation de la nage en fonction de la vitesse. Pour la nage lente, ils inhibent les interneurones glutamatergiques descendants V0v (Fidelin et al., 2015) et les Nc-LCS dorsaux au niveau rostral, inhibent les neurones réticulospinaux du tronc cérébral (M.-Y. Wu et al., 2021), tous deux impliqués dans le contrôle de la nage lente. Pour la nage rapide, les Nc-LCS projettent vers des éléments du circuit d'échappement, situés dans la ME, comme les motoneurones caudaux primaires (CaPs ; dorsal Caudal Primary), qui innervent les muscles axiaux, nécessaires à la nage rapide et au contrôle postural (Hubbard et al., 2016), ou les interneurones primaires sensoriels commissuraux et ascendants (CoPAs ; Commissural Primary Ascending sensory), qui recrutent les motoneurones du côté controlatéral de la ME (Hubbard et al., 2016). De plus, les Nc-LCS ventraux au niveau rostral, effectuent également des connexions fonctionnelles avec les axones des neurones réticulospinaux, responsables de la nage rapide (M.-Y. Wu et al., 2021). Cette spécialisation des connexions suggère que les Nc-LCS modulent les circuits prémoteurs selon l'état d'activité

de l'animal. Lorsqu'une larve est au repos, leur activation déclenche une nage lente, tandis que pendant une activité de nage, leur activation met fin au mouvement en réduisant les évènements locomoteurs (Fidelin et al., 2015). Ces connexions permettent également aux larves d'exécuter des mouvements de grande amplitude et de maintenir leur posture pendant des épisodes d'échappements (Böhm et al., 2016 ; Hubbard et al., 2016).

Chez la lamproie ou le poisson-zèbre, la détection de la courbure du corps le long de l'axe rostro-caudal, est essentielle à la propagation rythmique ondulatoire de la contraction musculaire et donc à l'activité de nage ainsi qu'à son adaptation. Chez les vertébrés quadrupèdes, la locomotion fait appel à une séquence d'actes moteurs, qui entraîne une alternance de l'activité des membres et repose sur des circuits neuronaux différents. Les données récentes ont démontré que les Nc-LCS ne jouaient pas un rôle dans la locomotion *per se* ou la nage, mais plutôt dans la modulation d'activités motrices fines ou complexes et leur adaptation (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023). Ce rôle différent des Nc-LCS explique vraisemblablement aussi leur insertion dans des réseaux moteurs différents.

Nous avons récemment démontré avec le modèle génétique de la toxine diphtérique, que l'ablation sélective des Nc-LCS affecte l'habileté motrice nécessaire à la réalisation de mouvements fins (déplacement sur une poutre ou une échelle horizontale). Curieusement, seuls les membres postérieurs apparaissent affectés, bien que les souris utilisent leurs pattes avant pour « explorer » l'environnement et pouvoir avancer. Il serait intéressant d'analyser cet aspect plus en détail. De façon surprenante, ces déficits sont phénocopiés dans un modèle de souris où la ciliogenèse est sélectivement inhibée dans les Nc-LCS (Gerstmann et al., 2022). Nos résultats ont été complétés par l'étude menée par Nakamura et collaborateurs (2023) qui suggèrent, que l'inhibition sélective des Nc-LCS par une approche chémogénétique (DREAADs et application de CNO), altère la capacité des souris à s'adapter à la locomotion rapide, induite par l'accélération de la vitesse de rotation d'un tapis roulant. Les souris ne sont pas en mesure d'augmenter la fréquence du pas et donc la vitesse de déplacement, pour s'adapter au rythme (Nakamura et al., 2023). Chez la larve de poisson-zèbre, la mutation du canal PKD2L1 réduit la fréquence des battements de la queue (Böhm et al., 2016), tandis que la délétion des Nc-LCS, entraine des problèmes posturaux (Hubbard et al., 2016). Bien que ces déficits soient moins marqués chez les vertébrés quadrupèdes, les résultats obtenus, vont dans le même sens et indiquent que les Nc-LCS participeraient au maintien de la posture, à la coordination des membres, ou à l'adaptation lors d'actes moteurs complexes. Nous confirmons ici l'hypothèse que les Nc-LCS moduleraient l'activité motrice. Il demeure malgré tout une question importante, sur les mécanismes permettant leur activation.

La technique de CRACM couplée à une approche de RT-PCR sur cellule unique, nous ont permis de démontrer une connexion fonctionnelle entre les Nc-LCS et des neurones glutamatergiques, cholinergiques et GABAergiques. Une analyse plus poussée indique que les Nc-LCS sont connectés fonctionnellement avec plusieurs composants clés du réseau locomoteur : les interneurones V0c, V0g, dl6, V0v, V2a et les non-V2a. Il semble par ailleurs, que les Nc-LCS forment préférentiellement des connexions avec les interneurones V0c (37,5% des connexions identifiées), suivis des dl6 et V0g (22%), des V0v (12,5%) et enfin avec les V2a Chx10^{+} et les Non-V2a Shox2^{+} (3%). Les interneurones V0v, exprimant les facteurs de transcription Evx1^{+}, Pax2^{+}, Pax7^{-}, Lbx1^{-} et MafA^{+}, sont largement décris comme étant une population excitatrice (expression de Vglut2, Talpalar et al., 2013, Lanuza et al., 2004). Cependant, il est a noté que nos résultats montrent une population exprimant les facteurs de transcription des interneurones V0v, ayant un phénotype GABA/glycine, suggérant l'existence

d'une possible population d'interneurones V0v qui serait inhibitrice (Lu et al., 2015 ; Zhang et al., 2008 : données non publiées ; Rabe et al., 2009).

Il est intéressant de noter que ces interneurones sont majoritairement impliqués dans l'alternance gauche-droite, notamment lors d'un activité locomotrice rapide, la coordination de l'activité musculaire, la correction de la posture et dans la modulation de la force de contraction musculaire. Un ensemble de fonctions qui est cohérent avec le contrôle d'actes moteurs complexes et fins, ainsi qu'avec l'adaptation à l'accélération du pas ; des déficits observés lors de la manipulation des Nc-LCS chez la souris.

Ainsi, les interneurones ***V0c***, qui expriment Pitx2, semblent être les partenaires privilégiés des Nc-LCS en termes de connectivité. Ces neurones forment de larges synapses, appelées c-boutons sur les motoneurones, qui permettent d'amplifier leur décharge. Ils seraient ainsi impliqués dans la modulation de l'activité locomotrice en augmentant l'activité des muscles extenseurs des pattes arrière, lors de tâches nécessitant une activation musculaire plus intense, comme la nage (Miles et al., 2007; Nascimento et al., 2020; Zagoraiou et al., 2009), et participeraient également à la correction de la posture (Zelenin et al., 2021). Il est envisageable que les Nc-LCS inhibent de façon tonique les V0c, uniquement pendant des tâches motrices de base, et que cette inhibition cesse lors de la transition vers des mouvements plus complexes. Si le comportement de nage ne semble pas être altéré chez les souris dépourvues de Nc-LCS, une étude EMG mesurant l'activité des muscles extenseurs des pattes arrière, pourrait révéler des variations d'activité musculaire en fonction des tâches motrices. Les Nc-LCS pourraient ainsi participer à la modulation intrinsèque de l'activité des motoneurones et à l'adaptation de la contraction musculaire aux exigences comportementales, potentiellement en lien avec les systèmes sensoriels.

L'alternance gauche-droite à des vitesses élevées, impliquerait notamment les interneurones glutamatergiques ***V2a Chx10^{+}*** (Crone et al., 2008, 2009; Dougherty & Kiehn, 2010; Zhong et al., 2010) et ***V0v*** (Bellardita & Kiehn, 2015; Talpalar et al., 2013). Ces derniers, joueraient aussi un rôle dans la coordination de l'activité des muscles du tronc et des membres des côtés gauche et droit, tout comme les ***V0g*** (Zelenin et al., 2021). Les interneurones inhibiteurs ***dI6***, seraient impliqués dans divers aspects du contrôle moteur, tels que l'alternance gauche-droite (Haque et al., 2018) et la génération du rythme locomoteur (Dyck et al., 2012), une fonction également partagée par les interneurones glutamatergiques ***non-V2a Shox2^{+}*** (Dougherty et al., 2013; Ha & Dougherty, 2018) **(Figure 86)**.

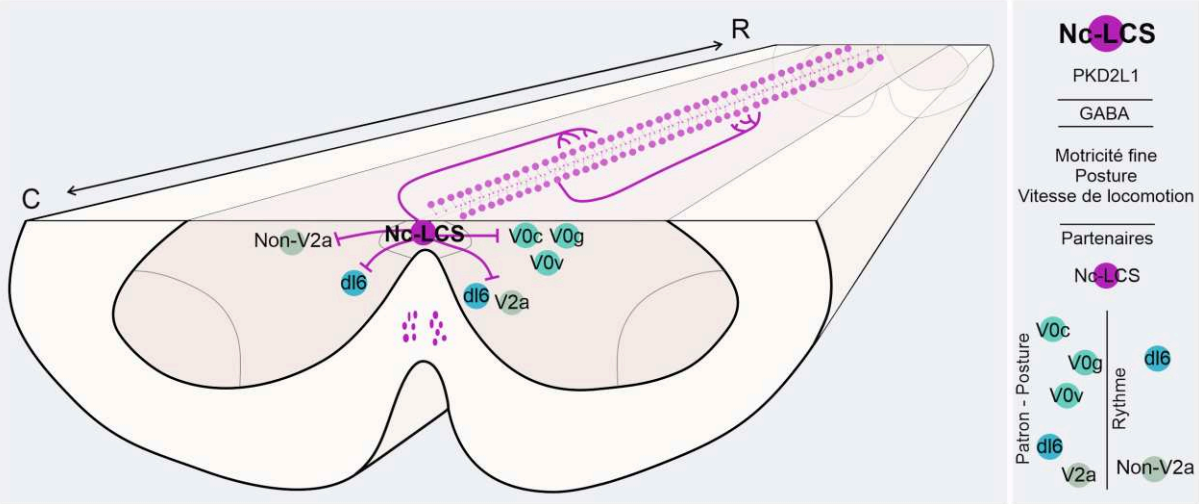


Figure 86 | Connectivité et rôles supposés des Nc-LCS au niveau de la ME lombaire

La réalisation de mouvements fins repose sur l'intégration de plusieurs signaux sensoriels, tels que des signaux cutanés, proprioceptifs, visuels et vestibulaires, permettant d'ajuster avec précision les mouvements des membres et du corps. Il est intéressant de noter que les déficits moteurs observés chez les souris dépourvues de Nc-LCS ou de leurs cils, c'est-à-dire, lors du test de l'échelle et de la poutre (Gerstmann et al., 2022), sont retrouvés chez des souris dépourvues de neurones proprioceptifs, exprimant le canal ionique mécanosensible Piezo2, ou déficientes pour ce dernier. Dans l'ensemble, ces souris présentent des problèmes de coordination, ainsi qu'une altération de l'équilibre et de la posture (Florez-Paz et al., 2016 ; Woo et al., 2015). Par ailleurs, des comportements similaires sont également observés lorsque les retours sensoriels proprioceptifs des fuseaux musculaires sont absents (Akay et al., 2014; Takeoka et al., 2014).

Ainsi, la détection de la courbure de la ME pourrait être importante dans des contextes particuliers, où la coordination précise des mouvements des membres et du corps est cruciale, et où l'intégration de différents signaux sensoriels est nécessaire. Dans des situations, où la stabilité de l'animal est compromise (réduction de la base de support ou extension excessive des pattes arrière), comme lorsque les souris doivent progresser sur une poutre ou une échelle, les Nc-LCS pourraient détecter et être informés par des retours sensoriels périphériques, des déplacements de l'axe du corps et transmettre ces informations au réseau locomoteur spinal pour en adapter l'activité. Il est intéressant de noter que les souris dépourvues de Nc-LCS ou de cils mobiles, tentent de compenser le manque de retours proprioceptifs en surutilisant leur queue, comme balancier.

Chez la lamproie adulte, Alford et collaborateurs (1990) ont montré que le système GABAergique, est un puissant régulateur de l'activité de nage fictive, puisque le blocage des récepteurs R-$GABA_A$ par la strychnine, augmente la fréquence de la nage. Ainsi, pendant une activité rythmique, l'inhibition présynaptique GABAergique des neurones de la corne ventrale, permettrait de réduire l'intensité de l'excitation, en assurant un arrêt précis de la décharge des sorties motrices (Alford et al., 1990). Ainsi, chez la souris, les Nc-LCS pourraient jouer un rôle similaire dans les tâches motrices complexes, où les retours sensoriels sont cruciaux. Ils pourraient fournir au réseau moteur spinal des informations sur la position du corps et des membres, permettant ainsi d'ajuster les mouvements avec précision. De plus, ils pourraient inhiber les retours sensoriels de manière présynaptique, facilitant une transition en douceur entre différents mouvements (Fink et al., 2014). Les Nc-LCS pourraient ainsi jouer un rôle clé dans l'intégration et la modulation des retours mécanosensoriels pour ajuster l'activité motrice, en synchronie avec les afférences proprioceptives des fuseaux musculaires et des organes tendineux de Golgi (Pearson, 2008). Ils offriraient ainsi un niveau supplémentaire de retour sensoriel aux côtés des récepteurs proprioceptifs classiques. Nous posons l'hypothèse que les Nc-LCS représentent un relai et un système d'intégration de l'information sensorielle, majoritairement proprioceptive et il restera à l'avenir, à mettre en évidence cette connectivité au niveau anatomique et fonctionnel.

Il faut noter que les études décrites ci-dessus ont été réalisées sur des modèles de souris transgéniques dans lesquels, l'ensemble des Nc-LCS le long du canal bulbo-spinal (ainsi que toutes les cellules qui expriment PKD2L1), est délété ou inhibé (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023). Il semble crucial de confirmer les déficits moteurs observés, en ciblant une modulation des seuls Nc-LCS lombaires, avec des modèles génétiques spécifiques. A cette fin, l'équipe développe un modèle chémo-optogénétique avec la luminopsine (Berglund et al., 2019). Il s'agit d'une protéine chimère entre une luciférase et une opsine, qui existe dans une forme activatrice et inhibitrice. En présence de son substrat, le coelenterazine, la luciférase

produira une bioluminescence capable d'activer l'opsine et de moduler l'activité des Nc-LCS. L'expression sélective de la luminopsine ou l'injection de son substrat dans la seule région lombaire permettra d'activer/d'inhiber les Nc-LCS lombaires, d'en tester les conséquences sur l'activité motrice et de confirmer le rôle de ces neurones comme modulateurs de l'activité motrice.

CONCLUSION

VI - Conclusion et perspectives

Cette caractérisation cellulaire des Nc-LCS au niveau lombaire s'inscrit dans une étude plus large menée par l'équipe, visant à étudier l'ensemble de la population de Nc-LCS, le long de l'axe rostro-caudal de la ME chez la souris. Ainsi, les Nc-LCS des segments cervical, thoracique et lombaire ont été étudiés de manière similaire. La comparaison des différents segments, révèle que les Nc-LCS constituent une population globalement homogène tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel. Nous nous sommes intéressés dans cette étude aux propriétés et à la connectivité des Nc-LCS lombaires et nous avons mis en évidence qu'ils modulaient l'activité d'interneurones clés du réseau moteur lombaire, en relation avec le contrôle postural et des mouvements fins. Des analyses similaires sont menées au sein de l'équipe pour caractériser la connectivité locale des Nc-LCS thoraciques et cervicaux ainsi que bulbaires et d'en déterminer la fonction.

Les Nc-LCS semblent, d'une part, former l'un des rares réseaux GABAergiques de projection sur de longues distances, qui leur permettrait une activité coordonnée le long de l'axe du canal central, tout en contrôlant de manière locale le réseau moteur. D'autre part ils sont au contact du LCS, qui est considéré comme une troisième voie de transmission, la transmission volumique, qui permet de transmettre sur de longues distances et à l'ensemble du SNC des signaux homéostatiques, métaboliques ainsi que des neurotransmetteurs. Les Nc-LCS sont présents au niveau du canal central du tronc cérébral et nous avons des évidences récentes indiquant qu'ils projetteraient vers des noyaux bulbaires cardinaux du système sensoriel intéroceptif.

En accord avec l'hypothèse avancée par Vigh et Teichman dès 1987, nous proposons que les Nc-LCS représentent des acteurs du système intéroceptif, capables de détecter des informations sur l'état interne du corps ; concept introduit par Sherrington. Parmi les récepteurs intéroceptifs, on retrouve des mécanorécepteurs, chémorécepteurs et osmorécepteurs, des propriétés mises en évidence en partie pour les Nc-LCS. Plusieurs études suggèrent que les Nc-LCS pourraient agir comme un organe sensoriel, ou un organe sagittal comme l'appelait Kolmer (1921). Ils ont une position stratégique, entre le LCS et le tissu nerveux, pour capter, intégrer et transmettre les informations provenant du LCS, qui évoluent en fonction de l'activité et de l'état physiologique du SNC et de l'organisme. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les Nc-LCS possèdent des canaux PKD2L1 et ASIC, capables de détecter des variations du pH extracellulaire (Orts-Del'Immagine et al., 2016; Jalalvand et al., 2016b). Lors d'une activité physique intense modifiant la VO_2 max (quantité maximale d'oxygène que l'organisme peut utiliser par unité de temps), il a été observé une légère augmentation du pH du LCS (Bisgard et al., 1978). Ce changement de pH pourrait activer les Nc-LCS et entrainer la libération de GABA pour moduler l'activité des circuits moteurs spinaux.

Ainsi, un dernier défi dans la compréhension du rôle des Nc-LCS sera, de déterminer comment la composition du LCS évolue en fonction de l'activité motrice, ou de l'organisme de manière plus générale, d'identifier quels récepteurs sont exprimés par les Nc-LCS, quelles sont les conséquences de leur activation sur la physiologie de ces-derniers et comment cela participe à la modulation des comportements. Chez la souris, les Nc-LCS spinaux n'ont, à ce jour, été étudiés que dans des modèles *in vitro*. Ainsi, les questions des conditions physiologiques ou pathologiques dans lesquelles ces cellules sont recrutées et du moment où cela se produit, demeurent entières. Les réponses à ces questions fondamentales ne pourra être obtenue que dans des modèles intégrés et *in vivo,* dans lesquels les Nc-LCS seraient dans leur environnement natif et pourraient être modulés de manière sélective.

REFERENCES

VII – Références bibliographiques

A

Abbott, N. J. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: Significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, *45*(4), 545-552. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.006

Agduhr, E. (1922). Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, *66*(3), 223-360. https://doi.org/10.1007/BF02593586

Agnati, L. F., Guidolin, D., Guescini, M., Genedani, S., & Fuxe, K. (2010). Understanding wiring and volume transmission. *Brain Research Reviews*, *64*(1), 137-159. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.03.003

Akay, T. (2020). Sensory Feedback Control of Locomotor Pattern Generation in Cats and Mice. *Neuroscience*, *450*, 161-167. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.008

Akay, T., Tourtellotte, W. G., Arber, S., & Jessell, T. M. (2014). Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16877-16882. https://doi.org/10.1073/pnas.1419045111

Alaynick, W. A., Jessell, T. M., & Pfaff, S. L. (2011). SnapShot : Spinal Cord Development. *Cell*, *146*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.038

Alford, S., Sigvardt, K. A., & Williams, T. L. (1990). GABAergic control of rhythmic activity in the presence of strychnine in the lamprey spinal cord. *Brain Research*, *506*(2), 303-306. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91267-k

Al-Mosawie, A., Wilson, J. M., & Brownstone, R. M. (2007). Heterogeneity of V2-derived interneurons in the adult mouse spinal cord. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(11), 3003-3015. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05907.x

Alvarez, F. J., Jonas, P. C., Sapir, T., Hartley, R., Berrocal, M. C., Geiman, E. J., Todd, A. J., & Goulding, M. (2005). Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *493*(2), 177-192. https://doi.org/10.1002/cne.20711

Ampatzis, K., Song, J., Ausborn, J., & El Manira, A. (2013). Pattern of Innervation and Recruitment of Different Classes of Motoneurons in Adult Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, *33*(26), 10875-10886. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0896-13.2013

Ampatzis, K., Song, J., Ausborn, J., & El Manira, A. (2014). Separate microcircuit modules of distinct v2a interneurons and motoneurons control the speed of locomotion. *Neuron*, *83*(4), 934-943. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.018

Andersson, L. S., Larhammar, M., Memic, F., Wootz, H., Schwochow, D., Rubin, C.-J., Patra, K., Arnason, T., Wellbring, L., Hjälm, G., Imsland, F., Petersen, J. L., McCue, M. E., Mickelson, J. R., Cothran, G., Ahituv, N., Roepstorff, L., Mikko, S., Vallstedt, A., … Kullander, K. (2012).

Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature*, *488*(7413), 642-646. https://doi.org/10.1038/nature11399

Arber, S., & Costa, R. M. (2022). Networking brainstem and basal ganglia circuits for movement. *Nature Reviews Neuroscience*, *23*(6), 342-360. https://doi.org/10.1038/s41583-022-00581-w

B

Banizs, B., Pike, M. M., Millican, C. L., Ferguson, W. B., Komlosi, P., Sheetz, J., Bell, P. D., Schwiebert, E. M., & Yoder, B. K. (2005). Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development (Cambridge, England)*, *132*(23), 5329-5339. https://doi.org/10.1242/dev.02153

Barber, R. P., Vaughn, J. E., & Roberts, E. (1982). The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Research*, *238*(2), 305-328. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90107-X

Bellardita, C., & Kiehn, O. (2015). Phenotypic characterization of speed-associated gait changes in mice reveals modular organization of locomotor networks. *Current Biology: CB*, *25*(11), 1426-1436. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.005

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews. Neuroscience*, *3*(9), 728-739. https://doi.org/10.1038/nrn920

Berg, R. W., Alaburda, A., & Hounsgaard, J. (2007). Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal half-centers. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5810), 390-393. https://doi.org/10.1126/science.1134960

Berglund, K., Fernandez, A. M., Gutekunst, C.-A. N., Hochgeschwender, U., & Gross, R. E. (2019). Step-function luminopsins for bimodal prolonged neuromodulation. *Journal of Neuroscience Research*. https://doi.org/10.1002/jnr.24424

Bernstock, J., Verheyen, J., Huang, B., Pluchino, J. H. and S., Bernstock, J., Verheyen, J., Huang, B., & Pluchino, J. H. and S. (2014). Typical and Atypical Stem Cell Niches of the Adult Nervous System in Health and Inflammatory Brain and Spinal Cord Diseases. In *Adult Stem Cell Niches*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/58599

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., & Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological Reviews*, *84*(3), Article 3. https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2003

Bhumbra, G. S., & Beato, M. (2018). Recurrent excitation between motoneurones propagates across segments and is purely glutamatergic. *PLoS Biology*, *16*(3), e2003586. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003586

Bikoff, J. B., Gabitto, M. I., Rivard, A. F., Drobac, E., Machado, T. A., Miri, A., Brenner-Morton, S., Famojure, E., Diaz, C., Alvarez, F. J., Mentis, G. Z., & Jessell, T. M. (2016). Spinal Inhibitory Interneuron Diversity Delineates Variant Motor Microcircuits. *Cell*, *165*(1), 207-219. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.027

Bisgard, G. E., Forster, H. V., Byrnes, B., Stanek, K., Klein, J., & Manohar, M. (1978). Cerebrospinal fluid acid-base balance during muscular exercise. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, *45*(1), 94-101. https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.1.94

Bishop, G. A., Berbari, N. F., Lewis, J., & Mykytyn, K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *505*(5), 562-571. https://doi.org/10.1002/cne.21510

Bjorefeldt, A., Illes, S., Zetterberg, H., & Hanse, E. (2018). Neuromodulation via the Cerebrospinal Fluid : Insights from Recent in Vitro Studies. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*, 5. https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00005

Blum, J. A., Klemm, S., Shadrach, J. L., Guttenplan, K. A., Nakayama, L., Kathiria, A., Hoang, P. T., Gautier, O., Kaltschmidt, J. A., Greenleaf, W. J., & Gitler, A. D. (2021). Single-cell transcriptomic analysis of the adult mouse spinal cord reveals molecular diversity of autonomic and skeletal motor neurons. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 572-583. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00795-0

Boespflug, E. L., & Iliff, J. J. (2018). The Emerging Relationship Between Interstitial Fluid-Cerebrospinal Fluid Exchange, Amyloid-β, and Sleep. *Biological Psychiatry*, *83*(4), 328-336. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.031

Böhm, U. L., Prendergast, A., Djenoune, L., Nunes Figueiredo, S., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., Charpentier, M., Concordet, J.-P., Rio, J.-P., Del Bene, F., & Wyart, C. (2016). CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nature Communications*, *7*, 10866. https://doi.org/10.1038/ncomms10866

Boulter, C., Mulroy, S., Webb, S., Fleming, S., Brindle, K., & Sandford, R. (2001). Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(21), 12174-12179. https://doi.org/10.1073/pnas.211191098

Bradbury, M. W. B., & Sarna, G. S. (1977). Homeostasis of the ionic composition of the cerebrospinal fluid. *Experimental Eye Research*, *25*, 249-257. https://doi.org/10.1016/S0014-4835(77)80022-5

Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of Cell Biology*, *40*(3), 648-677. https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648

Britz, O., Zhang, J., Grossmann, K. S., Dyck, J., Kim, J. C., Dymecki, S., Gosgnach, S., & 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

Brocard, F., Tazerart, S., & Vinay, L. (2010). Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *16*(2), 139-155. https://doi.org/10.1177/1073858409346339

Brocklehurst, G. (1979). The significance of the evolution of the cerebrospinal fluid system. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, *61*(5), 349-356.

Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T., & Millar, I. D. (2004). Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, *129*(4), 957-970. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.003

Bruni, J. E., & Reddy, K. (1987). Ependyma of the central canal of the rat spinal cord: A light and transmission electron microscopic study. *Journal of Anatomy*, *152*, 55-70.

Bui, T. V., Akay, T., Loubani, O., Hnasko, T. S., Jessell, T. M., & Brownstone, R. M. (2013). Circuits for grasping : Spinal dI3 interneurons mediate cutaneous control of motor behavior. *Neuron*, *78*(1), 191-204. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.007

Bui, T. V., Stifani, N., Akay, T., & Brownstone, R. M. (2016). Spinal microcircuits comprising dI3 interneurons are necessary for motor functional recovery following spinal cord transection. *eLife*, *5*, e21715. https://doi.org/10.7554/eLife.21715

Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., & Zajac, F. E. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of Physiology*, *234*(3), 723-748. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010369

C

Caggiano, V., Leiras, R., Goñi-Erro, H., Masini, D., Bellardita, C., Bouvier, J., Caldeira, V., Fisone, G., & Kiehn, O. (2018). Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature*, *553*(7689), 455-460. https://doi.org/10.1038/nature25448

Caldeira, V., Dougherty, K. J., Borgius, L., & Kiehn, O. (2017). Spinal Hb9::Cre-derived excitatory interneurons contribute to rhythm generation in the mouse. *Scientific Reports*, *7*, 41369. https://doi.org/10.1038/srep41369

Cangiano, L., & Grillner, S. (2003). Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey. *Journal of Neurophysiology*, *89*(6), 2931-2942. https://doi.org/10.1152/jn.01100.2002

Cantaut-Belarif, Y., Sternberg, J. R., Thouvenin, O., Wyart, C., & Bardet, P.-L. (2018). The Reissner Fiber in the Cerebrospinal Fluid Controls Morphogenesis of the Body Axis. *Current Biology: CB*, *28*(15), 2479-2486.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.079

Catavitello, G., Ivanenko, Y., & Lacquaniti, F. (2018). A kinematic synergy for terrestrial locomotion shared by mammals and birds. *eLife*, *7*, e38190. https://doi.org/10.7554/eLife.38190

Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(8), Article 8. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947

Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, *58*(3), Article 3. https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90027-B

Cazalets, J. R., Menard, I., Crémieux, J., & Clarac, F. (1990). Variability as a characteristic of immature motor systems: An electromyographic study of swimming in the newborn rat. *Behavioural Brain Research*, *40*(3), 215-225. https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90078-s

Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., & Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *The Journal of Physiology*, *455*, 187-204. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019296

Chalfie, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(1), 44-52. https://doi.org/10.1038/nrm2595

Chen, X. Z., Vassilev, P. M., Basora, N., Peng, J. B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E. M., Reeders, S. T., Hediger, M. A., & Zhou, J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature*, *401*(6751), 383-386. https://doi.org/10.1038/43907

Chopek, J. W., Nascimento, F., Beato, M., Brownstone, R. M., & Zhang, Y. (2018). Sub-populations of Spinal V3 Interneurons Form Focal Modules of Layered Pre-motor Microcircuits. *Cell Reports*, *25*(1), 146-156.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.095

Cina, C., & Hochman, S. (2000). Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *423*(4), 590-602. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000807)423:4<590::aid-cne5>3.0.co;2-l

Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, *426*(6966), 517-524. https://doi.org/10.1038/nature02196

Cohen, A. H., & Harris-Warrick, R. M. (1984). Strychnine eliminates alternating motor output during fictive locomotion in the lamprey. *Brain Research*, *293*(1), 164-167. https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91464-1

Conway, B. A., Hultborn, H., & Kiehn, O. (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Experimental Brain Research*, *68*(3), 643-656. https://doi.org/10.1007/BF00249807

Corns, L. F., Atkinson, L., Daniel, J., Edwards, I. J., New, L., Deuchars, J., & Deuchars, S. A. (2015). Cholinergic Enhancement of Cell Proliferation in the Postnatal Neurogenic Niche of the Mammalian Spinal Cord. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *33*(9), 2864-2876. https://doi.org/10.1002/stem.2077

Corvaja, N., Grofová, I., Pompeiano, O., & Walberg, F. (1977). The lateral reticular nucleus in the cat—II. Effects of lateral reticular lesions on posture and reflex movements. *Neuroscience*, *2*(6), 929-943. https://doi.org/10.1016/0306-4522(77)90116-6

Cowley, K. C., & Schmidt, B. J. (1995). Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *74*(3), 1109-1117. https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.3.1109

Crone, S. A., Quinlan, K. A., Zagoraiou, L., Droho, S., Restrepo, C. E., Lundfald, L., Endo, T., Setlak, J., Jessell, T. M., Kiehn, O., & Sharma, K. (2008). Genetic ablation of V2a ipsilateral

interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron*, *60*(1), 70-83. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.009

Crone, S. A., Zhong, G., Harris-Warrick, R., & Sharma, K. (2009). In mice lacking V2a interneurons, gait depends on speed of locomotion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(21), 7098-7109. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1206-09.2009

Crozat, E., Blasco, E., Ramirez-Franco, J., Riondel, P., JURCIC, N., Seddik, R., Michelle, C., Trouslard, J., & Wanaverbecq, N. (2024). Spinal cerebrospinal fluid contacting neurons are a conserved sensory neuronal population along the mouse spinal cord. *bioRxiv*, 2024.10.10.617653. https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653

D

Dale, N., Roberts, A., Ottersen, O. P., & Storm-Mathisen, J. (1987). The development of a population of spinal cord neurons and their axonal projections revealed by GABA immunocytochemistry in frog embryos. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, *232*(1267), 205-215.

DeCaen, P. G., Delling, M., Vien, T. N., & Clapham, D. E. (2013). Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature*, *504*(7479), 315-318. https://doi.org/10.1038/nature12832

Delling, M., DeCaen, P. G., Doerner, J. F., Febvay, S., & Clapham, D. E. (2013). Primary cilia are specialized calcium signaling organelles. *Nature*, *504*(7479), 311-314. https://doi.org/10.1038/nature12833

Delmas, P., Padilla, F., Osorio, N., Coste, B., Raoux, M., & Crest, M. (2004). Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *322*(4), 1374-1383. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.044

Deska-Gauthier, D., & Zhang, Y. (2019). The functional diversity of spinal interneurons and locomotor control. *Current Opinion in Physiology*, *8*, 99-108. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.005

Di Bella, D. J., Carcagno, A. L., Bartolomeu, M. L., Pardi, M. B., Löhr, H., Siegel, N., Hammerschmidt, M., Marín-Burgin, A., & Lanuza, G. M. (2019). Ascl1 Balances Neuronal versus Ependymal Fate in the Spinal Cord Central Canal. *Cell Reports*, *28*(9), 2264-2274.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.087

Djenoune, L., Desban, L., Gomez, J., Sternberg, J. R., Prendergast, A., Langui, D., Quan, F. B., Marnas, H., Auer, T. O., Rio, J.-P., Del Bene, F., Bardet, P.-L., & Wyart, C. (2017). The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes. *Scientific Reports*, *7*(1), 719. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00350-1

Djenoune, L., Khabou, H., Joubert, F., Quan, F. B., Nunes Figueiredo, S., Bodineau, L., Del Bene, F., Burcklé, C., Tostivint, H., & Wyart, C. (2014). Investigation of spinal cerebrospinal fluid-

contacting neurons expressing PKD2L1 : Evidence for a conserved system from fish to primates. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 26. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00026

Djenoune, L., & Wyart, C. (2017). Light on a sensory interface linking the cerebrospinal fluid to motor circuits in vertebrates. *Journal of Neurogenetics*, *31*(3), 113-127. https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1359833

Domenici, P. (2010). Escape Responses in Fish: Kinematics, Performance and behavior. In *Fish Locomotion*. CRC Press.

Dougherty, K. J., & Ha, N. T. (2019). The rhythm section: An update on spinal interneurons setting the beat for mammalian locomotion. *Current Opinion in Physiology*, *8*, 84-93. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.004

Dougherty, K. J., & Kiehn, O. (2010). Firing and cellular properties of V2a interneurons in the rodent spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(1), 24-37. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4821-09.2010

Dougherty, K. J., Zagoraiou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., Jessell, T. M., & Kiehn, O. (2013). Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron*, *80*(4), 920-933. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.015

Dubuc, R., Brocard, F., Antri, M., Fénelon, K., Gariépy, J.-F., Smetana, R., Ménard, A., Le Ray, D., Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., Sirota, M. G., Derjean, D., St-Pierre, M., Zielinski, B., Auclair, F., & Veilleux, D. (2008). Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Research Reviews*, *57*(1), 172-182. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.016

Dyck, J., Lanuza, G. M., & Gosgnach, S. (2012). Functional characterization of dI6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *107*(12), 3256-3266. https://doi.org/10.1152/jn.01132.2011

E

Eccles, J. C., Eccles, R. M., Iggo, A., & Lundberg, A. (1960). Electrophysiological studies on gamma motoneurones. *Acta Physiologica Scandinavica*, *50*, 32-40. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1960.tb02070.x

Eklöf-Ljunggren, E., Haupt, S., Ausborn, J., Dehnisch, I., Uhlén, P., Higashijima, S., & El Manira, A. (2012). Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(14), 5511-5516. https://doi.org/10.1073/pnas.1115377109

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

Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M., & Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*, *90*(1), 169-180. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80323-2

F

Feldman, A. G., & Orlovsky, G. N. (1975). Activity of interneurons mediating reciprocal 1a inhibition during locomotion. *Brain Research*, *84*(2), 181-194. https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90974-9

Fidelin, K., Djenoune, L., Stokes, C., Gomez, J., Baradel, A., Del Bene, F., & Wyart, C. (2015). State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons. *Current Biology*, *25*, 1-13.

Fink, A. J. P., Croce, K. R., Huang, Z. J., Abbott, L. F., Jessell, T. M., & Azim, E. (2014). Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature*, *509*(7498), 43-48. https://doi.org/10.1038/nature13276

Florez-Paz, D., Bali, K. K., Kuner, R., & Gomis, A. (2016). A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Scientific Reports*, *6*, 25923. https://doi.org/10.1038/srep25923

Forssberg, H. (1979). Stumbling corrective reaction: A phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *Journal of Neurophysiology*, *42*(4), 936-953. https://doi.org/10.1152/jn.1979.42.4.936

Fujita, T., Kanno, T., & Kobayashi, S. (2012). *The Paraneuron*. Springer Science & Business Media.

Furube, E., Ishii, H., Nambu, Y., Kurganov, E., Nagaoka, S., Morita, M., & Miyata, S. (2020). Neural stem cell phenotype of tanycyte-like ependymal cells in the circumventricular organs and central canal of adult mouse brain. *Scientific Reports*, *10*(1), 2826. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59629-5

G

Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., & Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, *105*(4), 521-532. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00341-5

Garwicz, M., Christensson, M., & Psouni, E. (2009). A unifying model for timing of walking onset in humans and other mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21889-21893. https://doi.org/10.1073/pnas.0905777106

Gassmann, M., & Bettler, B. (2012). Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(6), 380-394. https://doi.org/10.1038/nrn3249

GENSAT Brain Atlas of Gene Expression in EGFP, tdTomato, and Cre Transgenic Mice, and Heintz TRAP mice. (s. d.-a). Consulté 31 octobre 2024, à l'adresse https://www.gensat.org/GeneProgressTracker.jsp?gensatGeneID=87

GENSAT Brain Atlas of Gene Expression in EGFP, tdTomato, and Cre Transgenic Mice, and Heintz TRAP mice. (s. d.-b). Consulté 31 octobre 2024, à l'adresse https://www.gensat.org/GeneProgressTracker.jsp?gensatGeneID=379

Gerstmann, K., Jurčić, N., Blasco, E., Kunz, S., de Almeida Sassi, F., Wanaverbecq, N., & Zampieri, N. (2022). The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion. *Current Biology: CB*, *32*(11), 2442-2453.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.019

Gosgnach, S., Lanuza, G. M., Butt, S. J. B., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E. M., Kiehn, O., & Goulding, M. (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature*, *440*(7081), 215-219. https://doi.org/10.1038/nature04545

Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: Moving in a new direction. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/nrn2608

Griener, A., Zhang, W., Kao, H., Haque, F., & Gosgnach, S. (2017). Anatomical and electrophysiological characterization of a population of dI6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord. *Neuroscience*, *362*, 47-59. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.031

Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: From ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews. Neuroscience*, *4*(7), 573-586. https://doi.org/10.1038/nrn1137

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

Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K., & Wikström, M. A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs—Roles for the striatum and pallidum. *Trends in Neurosciences*, *28*(7), 364-370. https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.05.004

Grillner, S., & Manira, A. E. (2015). The intrinsic operation of the networks that make us locomote. *Current Opinion in Neurobiology*, *31*, 244-249. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.003

Grillner, S., & Robertson, B. (2015). The basal ganglia downstream control of brainstem motor centres—An evolutionarily conserved strategy. *Current Opinion in Neurobiology*, *33*, 47-52. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.019

Grillner, S., & Wallén, P. (1980). Does the central pattern generation for locomotion in lamprey depend on glycine inhibition? *Acta Physiologica Scandinavica*, *110*(1), 103-105. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1980.tb06637.x

Grillner, S., Williams, T., & Lagerbäck, P. A. (1984). The edge cell, a possible intraspinal mechanoreceptor. *Science (New York, N.Y.)*, *223*(4635), 500-503. https://doi.org/10.1126/science.6691161

Grimes, D. T., Boswell, C. W., Morante, N. F. C., Henkelman, R. M., Burdine, R. D., & Ciruna, B. (2016). Zebrafish model of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow to defects in spine curvature. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6291), 1341-1344. https://doi.org/10.1126/science.aaf6419

Gross, M. K., Dottori, M., & Goulding, M. (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron*, *34*(4), 535-549. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00690-6

Gruener, G., & Biller, J. (2008). SPINAL CORD ANATOMY, LOCALIZATION, AND OVERVIEW OF SPINAL CORD SYNDROMES. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *14*(3), 11. https://doi.org/10.1212/01.CON.0000324122.16947.75

Guertin, P. A. (2013). The Spinal Cord : Functional Organization, Diseases, and Dysfunctions. In H. Aldskogius (Éd.), *Animal Models of Spinal Cord Repair* (p. 1-23). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-197-4_1

H

Ha, N. T., & Dougherty, K. J. (2018). Spinal Shox2 interneuron interconnectivity related to function and development. *eLife*, *7*, e42519. https://doi.org/10.7554/eLife.42519

Hablitz, L. M., & Nedergaard, M. (2021). The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *41*(37), 7698-7711. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0619-21.2021

Hägglund, M., Borgius, L., Dougherty, K. J., & Kiehn, O. (2010). Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nature Neuroscience*, *13*(2), 246-252. https://doi.org/10.1038/nn.2482

Hägglund, M., Dougherty, K. J., Borgius, L., Itohara, S., Iwasato, T., & Kiehn, O. (2013). Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(28), 11589-11594. https://doi.org/10.1073/pnas.1304365110

Haque, F., Rancic, V., Zhang, W., Clugston, R., Ballanyi, K., & Gosgnach, S. (2018). WT1-Expressing Interneurons Regulate Left-Right Alternation during Mammalian Locomotor Activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *38*(25), 5666-5676. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0328-18.2018

Hari, K., Lucas-Osma, A. M., Metz, K., Lin, S., Pardell, N., Roszko, D. A., Black, S., Minarik, A., Singla, R., Stephens, M. J., Pearce, R. A., Fouad, K., Jones, K. E., Gorassini, M. A., Fenrich, K. K., Li, Y., & Bennett, D. J. (2022). GABA facilitates spike propagation through branch points of sensory axons in the spinal cord. *Nature Neuroscience*, *25*(10), 1288. https://doi.org/10.1038/s41593-022-01162-x

Heinrich Martin, F., Ricardo Seoane, J., & Baile, C. A. (1973). Feeding in satiated sheep elicited by intraventricular injections of CSF from fasted sheep. *Life Sciences*, *13*(2), 177-184. https://doi.org/10.1016/0024-3205(73)90193-8

Hinckley, C. A., Hartley, R., Wu, L., Todd, A., & Ziskind-Conhaim, L. (2005). Locomotor-like rhythms in a genetically distinct cluster of interneurons in the mammalian spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *93*(3), 1439-1449. https://doi.org/10.1152/jn.00647.2004

Hinckley, C., Seebach, B., & Ziskind-Conhaim, L. (2005). Distinct roles of glycinergic and GABAergic inhibition in coordinating locomotor-like rhythms in the neonatal mouse spinal cord. *Neuroscience*, *131*(3), 745-758. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.034

Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The Cells and Logic for Mammalian Sour Taste detection. *Nature*, *442*(7105), 934-938. https://doi.org/10.1038/nature05084

Hubbard, J. M., Böhm, U. L., Prendergast, A., Tseng, P.-E. B., Newman, M., Stokes, C., & Wyart, C. (2016). Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. *Current Biology: CB*, *26*(21), 2841-2853. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.026

Hugnot, J.-P. (2012). The Spinal Cord Neural Stem Cell Niche. In *Neural Stem Cells and Therapy*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/30868

I

Ikeda, S. R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, *380*(6571), 255-258. https://doi.org/10.1038/380255a0

J

Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Löw, P., Wallén, P., & Grillner, S. (2018). Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons Sense pH Changes and Motion in the Hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, *38*(35), 7713-7724. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3359-17.2018

Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., & Grillner, S. (2016). Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nature Communications*, *7*, 10002. https://doi.org/10.1038/ncomms10002

Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., Hill, R. H., & Grillner, S. (2014). Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *The Journal of Comparative Neurology*, *522*(8), 1753-1768. https://doi.org/10.1002/cne.23542

Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System : A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, *40*(12), 2583-2599. https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6

Johnson, E., Clark, M., Oncul, M., Pantiru, A., MacLean, C., Deuchars, J., Deuchars, S. A., & Johnston, J. (2023). Graded spikes differentially signal neurotransmitter input in cerebrospinal fluid contacting neurons of the mouse spinal cord. *iScience*, *26*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105914

Jurčić, N., Er-Raoui, G., Airault, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., & Seddik, R. (2019). GABAB receptors modulate Ca2+ but not G protein-gated inwardly rectifying K+ channels in cerebrospinal-fluid contacting neurones of mouse brainstem. *The Journal of Physiology*, *597*(2), 631-651. https://doi.org/10.1113/JP277172

Jurčić, N., Michelle, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., & Kastner, A. (2021). Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. *The European Journal of Neuroscience*. https://doi.org/10.1111/ejn.15342

K

Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*, *29*, 279-306. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910

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

Kiehn, O., & Dougherty, K. (2013). *Locomotion: Circuits and Physiology* (D. W. Pfaff, Éd.; p. 1209-1236). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_42

Kjaerulff, O., & Kiehn, O. (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: A lesion study. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(18), 5777-5794. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-18-05777.1996

Klarica, M., Radoš, M., & Orešković, D. (2019). The Movement of Cerebrospinal Fluid and Its Relationship with Substances Behavior in Cerebrospinal and Interstitial Fluid. *Neuroscience*, *414*, 28-48. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.032

Kolmer, W. (1921). Das „Sagittalorgan“ der Wirbeltiere. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, *60*(3), Article 3. https://doi.org/10.1007/BF02593657

Koronfel, L. M., Kanning, K. C., Alcos, A., Henderson, C. E., & Brownstone, R. M. (2021). Elimination of glutamatergic transmission from Hb9 interneurons does not impact treadmill locomotion. *Scientific Reports*, *11*(1), 16008. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95143-y

Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, *466*(7306), 622-626. https://doi.org/10.1038/nature09159

Kriellaars, D. J., Brownstone, R. M., Noga, B. R., & Jordan, L. M. (1994). Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. *Journal of Neurophysiology*, *71*(6), 2074-2086. https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.6.2074

Krotov, V., Tokhtamysh, A., Kopach, O., Dromaretsky, A., Sheremet, Y., Belan, P., & Voitenko, N. (2017). Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00342

Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H.-Y., Hyman, B. T., & Bacskai, B. J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*, *59*(2), 214-225. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.008

Kutna, V., Sevc, J., Gombalová, Z., Matiašová, A., & Daxnerová, Z. (2013). Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochemica*. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.08.004

Kwon, B. K., Stammers, A. M. T., Belanger, L. M., Bernardo, A., Chan, D., Bishop, C. M., Slobogean, G. P., Zhang, H., Umedaly, H., Giffin, M., Street, J., Boyd, M. C., Paquette, S. J., Fisher, C. G., & Dvorak, M. F. (2010). Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, *27*(4), 669-682. https://doi.org/10.1089/neu.2009.1080

L

LaMotte, C. C. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *The Journal of Comparative Neurology*, *258*(4), 527-541. https://doi.org/10.1002/cne.902580405

LaMotte, C. C. (1988). Lamina X of primate spinal cord: Distribution of five neuropeptides and serotonin. *Neuroscience*, *25*(2), Article 2.

Lanuza, G. M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T. M., & Goulding, M. (2004). Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron*, *42*(3), 375-386.

Leroy, F., Lamotte d'Incamps, B., Imhoff-Manuel, R. D., & 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

Li, Q., Dai, X.-Q., Shen, P. Y., Wu, Y., Long, W., Chen, C. X., Hussain, Z., Wang, S., & Chen, X.-Z. (2007). Direct binding of alpha-actinin enhances TRPP3 channel activity. *Journal of Neurochemistry*, *103*(6), 2391-2400. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04940.x

Li, W.-G., & Xu, T.-L. (2010). ASIC3 Channels in Multimodal Sensory Perception. *ACS Chemical Neuroscience*, *2*(1), 26. https://doi.org/10.1021/cn100094b

Linders, L. E., Supiot, L. F., Du, W., D'Angelo, R., Adan, R. A. H., Riga, D., & Meye, F. J. (2022). Studying Synaptic Connectivity and Strength with Optogenetics and Patch-Clamp Electrophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11612. https://doi.org/10.3390/ijms231911612

Liu, G., Mestre, H., Sweeney, A. M., Sun, Q., Weikop, P., Du, T., & Nedergaard, M. (2020). Direct Measurement of Cerebrospinal Fluid Production in Mice. *Cell Reports*, *33*(12), 108524. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108524

Ljunggren, E. E., Haupt, S., Ausborn, J., Ampatzis, K., & El Manira, A. (2014). Optogenetic activation of excitatory premotor interneurons is sufficient to generate coordinated locomotor activity in larval zebrafish. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(1), 134-139. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4087-13.2014

Lu, D. C., Niu, T., & Alaynick, W. A. (2015). Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00025

Lundfald, L., Restrepo, C. E., Butt, S. J. B., Peng, C.-Y., Droho, S., Endo, T., Zeilhofer, H. U., Sharma, K., & Kiehn, O. (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(11), 2989-3002. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05906.x

M

Manuel, M., & Zytnicki, D. (2011). Alpha, beta and gamma motoneurons: Functional diversity in the motor system's final pathway. *Journal of Integrative Neuroscience*, *10*(3), 243-276. https://doi.org/10.1142/S0219635211002786

Manuel, M., & Zytnicki, D. (2019). Molecular and electrophysiological properties of mouse motoneuron and motor unit subtypes. *Current Opinion in Physiology*, *8*, 23-29. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.11.008

Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2009). Enigmatic central canal contacting cells: Immature neurons in « standby mode »? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(32), 10010-10024. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6183-08.2009

Marichal, N., Reali, C., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2017). Spinal Cord Stem Cells In Their Microenvironment: The Ependyma as a Stem Cell Niche. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1041*, 55-79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7_5

McCrea, D. A., & Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Research Reviews*, *57*(1), 134-146. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.006

Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biology*, *6*(7), e182. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060182

Miles, G. B., Hartley, R., Todd, A. J., & Brownstone, R. M. (2007). Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(7), 2448-2453. https://doi.org/10.1073/pnas.0611134104

Minke, B. (2006). TRP channels and Ca2+ signaling. *Cell calcium*, *40*(3), 261-275. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.05.002

Molander, C., Xu, Q., & Grant, G. (1984). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *230*(1), 133-141. https://doi.org/10.1002/cne.902300112

Moon, K. M., Kim, J., Seong, Y., Suh, B.-C., Kang, K., Choe, H. K., & Kim, K. (2021). Proprioception, the regulator of motor function. *BMB Reports*, *54*(8), 393-402. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.8.052

Mori, S., Sakamoto, T., Ohta, Y., Takakusaki, K., & Matsuyama, K. (1989). Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Research*, *505*(1), 66-74. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90116-9

Mothe, A. J., & Tator, C. H. (2005). Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience*, *131*(1), 177-187. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.011

Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Shida, S., Satoh, E., Ono, K., Miyoshi, I., Watanabe, H., Ito, H., & Iijima, T. (2005). Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(7), 5626-5635. https://doi.org/10.1074/jbc.M411496200

N

Nagatsu, I., Sakai, M., Yoshida, M., & Nagatsu, T. (1988). Aromatic L-amino acid decarboxylase-immunoreactive neurons in and around the cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal do not contain dopamine or serotonin in the mouse and rat spinal cord. *Brain research*, *475*(1), 91-102.

Nakamura, Y., Kurabe, M., Matsumoto, M., Sato, T., Miytashita, S., Hoshina, K., Kamiya, Y., Tainaka, K., Matsuzawa, H., Ohno, N., & Ueno, M. (2023). Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *eLife*, *12*, e83108. https://doi.org/10.7554/eLife.83108

Nascimento, F., Broadhead, M. J., Tetringa, E., Tsape, E., Zagoraiou, L., & 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

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*, *87*(1), 165-217. https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2006

Nilsson, C., Ståhlberg, F., Thomsen, C., Henriksen, O., Herning, M., & Owman, C. (1992). Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging. *The American Journal of Physiology*, *262*(1 Pt 2), R20-24. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.262.1.R20

Noga, B. R., Turkson, R. P., Xie, S., Taberner, A., Pinzon, A., & Hentall, I. D. (2017). Monoamine Release in the Cat Lumbar Spinal Cord during Fictive Locomotion Evoked by the Mesencephalic Locomotor Region. *Frontiers in Neural Circuits*, *11*, 59. https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00059

Nógrádi, A., & Vrbová, G. (2006). Anatomy and Physiology of the Spinal Cord. In A. Nógrádi (Éd.), *Transplantation of Neural Tissue into the Spinal Cord* (p. 1-23). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-32633-2_1

Nomura, H., Turco, A. E., Pei, Y., Kalaydjieva, L., Schiavello, T., Weremowicz, S., Ji, W., Morton, C. C., Meisler, M., Reeders, S. T., & Zhou, J. (1998). Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(40), 25967-25973.

O

Oreskovic, D., & Klarica, M. (2010). The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews*, *64*(2), Article 2. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.04.006

Orts Del'Immagine, A., Seddik, R., Tell, F., Airault, C., Er-Raoui, G., Najimi, M., Trouslard, J., & Wanaverbecq, N. (2015). A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.030

Orts-Del'Immagine, A., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Roussel, J., Baskaran, A., Langui, D., Koëth, F., Bivas, P., Lejeune, F.-X., Bardet, P.-L., & Wyart, C. (2020). Sensory Neurons Contacting the Cerebrospinal Fluid Require the Reissner Fiber to Detect Spinal Curvature In Vivo. *Current Biology: CB*, *30*(5), 827-839.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.071

Orts-Del'Immagine, A., Kastner, A., Tillement, V., Tardivel, C., Trouslard, J., & Wanaverbecq, N. (2014). Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PloS One*, *9*(2), e87748. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087748

Orts-Del'Immagine, A., Trouslard, J., Airault, C., Hugnot, J.-P., Cordier, B., Doan, T., Kastner, A., & Wanaverbecq, N. (2017). Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Neuroscience*, *343*, 39-54. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.028

Orts-Del'Immagine, A., Wanaverbecq, N., Tardivel, C., Tillement, V., Dallaporta, M., & Trouslard, J. (2012). Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *The Journal of Physiology*, *590*(Pt 16), 3719-3741. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227959

Orts-Del'Immagine, A., & Wyart, C. (2017). Cerebrospinal-fluid-contacting neurons. *Current Biology: CB*, *27*(22), R1198-R1200. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.017

Osseward, P. J., & Pfaff, S. L. (2019). Cell type and circuit modules in the spinal cord. *Current opinion in neurobiology*, *56*, 175-184. https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.03.003

P

Pappenheimer, J. R., Miller, T. B., & Goodrich, C. A. (1967). Sleep-promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep-deprived goats. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, *58*(2), 513-517. https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.513

Pearson, K. G. (2004). Generating the walking gait: Role of sensory feedback. *Progress in Brain Research*, *143*, 123-129. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)43012-4

Pearson, K. G. (2008). Role of sensory feedback in the control of stance duration in walking cats. *Brain Research Reviews*, *57*(1), 222-227. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.014

Pedroni, A., & Ampatzis, K. (2019). Large-Scale Analysis of the Diversity and Complexity of the Adult Spinal Cord Neurotransmitter Typology. *iScience*, *19*, 1189-1201. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.010

Petracca, Y. L., Sartoretti, M. M., Di Bella, D. J., Marin-Burgin, A., Carcagno, A. L., Schinder, A. F., & Lanuza, G. M. (2016). The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord. *Development (Cambridge, England)*, *143*(5), 880-891. https://doi.org/10.1242/dev.129254

Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., & Svoboda, K. (2007). Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nature Neuroscience*, *10*(5), Article 5. https://doi.org/10.1038/nn1891

Picton, L. D., Bertuzzi, M., Pallucchi, I., Fontanel, P., Dahlberg, E., Björnfors, E. R., Iacoviello, F., Shearing, P. R., & El Manira, A. (2021). A spinal organ of proprioception for integrated motor action feedback. *Neuron*, *109*(7), 1188-1201.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.018

Piperno, G., & Fuller, M. T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *The Journal of Cell Biology*, *101*(6), 2085-2094. https://doi.org/10.1083/jcb.101.6.2085

Prendergast, A. E., Jim, K. K., Marnas, H., Desban, L., Quan, F. B., Djenoune, L., Laghi, V., Hocquemiller, A., Lunsford, E. T., Roussel, J., Keiser, L., Lejeune, F.-X., Dhanasekar, M., Bardet, P.-L., Levraud, J.-P., van de Beek, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Wyart, C. (2023). CSF-contacting neurons respond to Streptococcus pneumoniae and promote host survival during central nervous system infection. *Current Biology: CB*, *33*(5), 940-956.e10. https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.039

Prinz, A. A. (2006). Insights from models of rhythmic motor systems. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(6), 615-620. https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.001

Privat, A. (1977). The ependyma and subependymal layer of the young rat : A new contribution with freeze-fracture. *Neuroscience*, *2*(3), 447-457. https://doi.org/10.1016/0306-4522(77)90010-0

Proske, U., & Gandevia, S. C. (2012). The proprioceptive senses : Their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiological Reviews*, *92*(4), 1651-1697. https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2011

Reali, C., Fernández, A., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2011). GABAergic signalling in a neurogenic niche of the turtle spinal cord. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 23), 5633-5647. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214312

Redzic, Z. B., Preston, J. E., Duncan, J. A., Chodobski, A., & Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: From development to aging. *Current Topics in Developmental Biology*, *71*, 1-52. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)71001-2

Redzic, Z. B., & Segal, M. B. (2004). The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(12), 1695-1716. https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.005

Reiber, H. (2003). Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *21*(3-4), 79-96.

Ringers, C., Olstad, E. W., & Jurisch-Yaksi, N. (2020). The role of motile cilia in the development and physiology of the nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *375*(1792), 20190156. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0156

Riondel, P., Jurčić, N., Mounien, L., Ibrahim, S., Ramirez-Franco, J., Stefanovic, S., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., & Seddik, R. (2024). Evidence for Two Subpopulations of Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons with Opposite GABAergic Signaling in Adult Mouse Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *44*(22), Article 22. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2289-22.2024

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, *397*(6716), 251-255. https://doi.org/10.1038/16697

Rodríguez, E. M., Rodríguez, S., & Hein, S. (1998). The subcommissural organ. *Microscopy Research and Technique*, *41*(2), 98-123. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M

Roseberry, T. K., Lee, A. M., Lalive, A. L., Wilbrecht, L., Bonci, A., & Kreitzer, A. C. (2016). Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell*, *164*(3), 526-537. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.037

Russ, D. E., Cross, R. B. P., Li, L., Koch, S. C., Matson, K. J. E., Yadav, A., Alkaslasi, M. R., Lee, D. I., Le Pichon, C. E., Menon, V., & Levine, A. J. (2021). A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. *Nature Communications*, *12*(1), 5722. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25125-1

Russo, R. E., Fernández, A., Reali, C., Radmilovich, M., & Trujillo-Cenóz, O. (2004). Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *The Journal of Physiology*, *560*(Pt 3), 831-838. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072405

Russo, R. E., & Hounsgaard, J. (1999). Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *72*(4), 329-365.

S

Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*, *128*(6), 309-316. https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002

Segal, M. B. (1993). Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *16*(4), 617-638. https://doi.org/10.1007/BF00711896

Seitz, R., Löhler, J., & Schwendemann, G. (1981). Ependyma and meninges of the spinal cord of the mouse. A light-and electron-microscopic study. *Cell and Tissue Research*, *220*(1), 61-72. https://doi.org/10.1007/BF00209966

Sen Gupta, P., Prodromou, N. V., & Chapple, J. P. (2009). Can faulty antennae increase adiposity? The link between cilia proteins and obesity. *The Journal of Endocrinology*, *203*(3), Article 3. https://doi.org/10.1677/JOE-09-0116

Sengul, G. (2013). *Atlas of the spinal cord: Of the rat, mouse, marmoset, rhesus, and human*. https://www.semanticscholar.org/paper/Atlas-of-the-spinal-cord-%3A-of-the-rat%2C-mouse%2C-and-Sengul/2e120d340e57dfbd930ed82ef15cacf3e9be08b6

Sengupta, M., & Bagnall, M. W. (2023). Spinal Interneurons: Diversity and Connectivity in Motor Control. *Annual Review of Neuroscience*, *46*, 79-99. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-083122-025325

Shadrach, J. L., Gomez-Frittelli, J., & Kaltschmidt, J. A. (2021). Proprioception revisited: Where do we stand? *Current Opinion in Physiology*, *21*, 23-28. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2021.02.003

Sherrington, C. On the proprio-ceptive system, especially in its reflex aspect. Brain 29, 467–482 (1907).

Shik, M. L., & Orlovsky, G. N. (1976). Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiological Reviews*, *56*(3), 465-501. https://doi.org/10.1152/physrev.1976.56.3.465

Shimosegawa, T., Koizumi, M., Toyota, T., Goto, Y., Yanaihara, C., & Yanaihara, N. (1986). An immunohistochemical study of methionine-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-like immunoreactivity-containing liquor-contacting neurons (LCNs) in the rat spinal cord. *Brain research*, *379*(1), 1-9.

Sian, J., Gerlach, M., Youdim, M. B., & Riederer, P. (1999). Parkinson's disease: A major hypokinetic basal ganglia disorder. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *106*(5-6), 443-476. https://doi.org/10.1007/s007020050171

Siembab, V. C., Smith, C. A., Zagoraiou, L., Berrocal, M. C., Mentis, G. Z., & Alvarez, F. J. (2010). Target selection of proprioceptive and motor axon synapses on neonatal V1-derived Ia

inhibitory interneurons and Renshaw cells. *The Journal of Comparative Neurology*, *518*(23), 4675-4701. https://doi.org/10.1002/cne.22441

Simon, M. J., & Iliff, J. J. (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1862*(3), 442-451. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014

Song, J., Dahlberg, E., & El Manira, A. (2018). V2a interneuron diversity tailors spinal circuit organization to control the vigor of locomotor movements. *Nature Communications*, *9*(1), 3370. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05827-9

Spitzer, N. C., & Lamborghini, J. E. (1976). The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(5), 1641-1645. https://doi.org/10.1073/pnas.73.5.1641

Spitzer, N. C., & Ribera, A. B. (1998). Development of electrical excitability in embryonic neurons: Mechanisms and roles. *Journal of Neurobiology*, *37*(1), 190-197.

Sternberg, J. R., Prendergast, A. E., Brosse, L., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Orts-Del'Immagine, A., Castillo, L., Djenoune, L., Kurisu, S., McDearmid, J. R., Bardet, P.-L., Boccara, C., Okamoto, H., Delmas, P., & Wyart, C. (2018). Pkd2l1 is required for mechanoception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. *Nature Communications*, *9*(1), 3804. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06225-x

Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 293. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293

Stoeckel, M.-E., Uhl-Bronner, S., Hugel, S., Veinante, P., Klein, M.-J., Mutterer, J., Freund-Mercier, M.-J., & Schlichter, R. (2003). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities : Light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, *457*(2), 159-174. https://doi.org/10.1002/cne.10565

Strazielle, N., Mutin, M., & Ghersi-Egea, J. F. (2005). Les plexus choroïdes : Une interface dynamique entre sang et liquide cephalo-rachidien. *Morphologie*, *89*(285), 90-101. https://doi.org/10.1016/S1286-0115(05)83244-8

Stuart, D. G., & Hultborn, H. (2008). Thomas Graham Brown (1882—1965), Anders Lundberg (1920-), and the neural control of stepping. *Brain Research Reviews*, *59*(1), 74-95. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.06.001

T

Takakusaki, K. (2008). Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain Research Reviews*, *57*(1), 192-198. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.024

Takakusaki, K. (2013). Neurophysiology of gait: From the spinal cord to the frontal lobe. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *28*(11), 1483-1491. https://doi.org/10.1002/mds.25669

Takakusaki, K., Chiba, R., Nozu, T., & Okumura, T. (2016). Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *123*(7), 695-729. https://doi.org/10.1007/s00702-015-1475-4

Takeoka, A., Vollenweider, I., Courtine, G., & Arber, S. (2014). Muscle spindle feedback directs locomotor recovery and circuit reorganization after spinal cord injury. *Cell*, *159*(7), 1626-1639. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.019

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

Tegnér, J., Matsushima, T., el Manira, A., & Grillner, S. (1993). The spinal GABA system modulates burst frequency and intersegmental coordination in the lamprey: Differential effects of GABAA and GABAB receptors. *Journal of Neurophysiology*, *69*(3), 647-657. https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.3.647

Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., & Pfaff, S. L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, *79*(6), 957-970. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90027-2

Tuthill, J. C., & Azim, E. (2018). Proprioception. *Current Biology: CB*, *28*(5), R194-R203. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.064

U

Ulrich, D., & Huguenard, J. R. (1997). GABA(A)-receptor-mediated rebound burst firing and burst shunting in thalamus. *Journal of Neurophysiology*, *78*(3), 1748-1751. https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.3.1748

V

Vassort, G., & Fauconnier, J. (2008). Les canaux TRP (transient receptor potential)—Une nouvelle famille de canaux à expression variée. *médecine/sciences*, *24*(2), Article 2. https://doi.org/10.1051/medsci/2008242163

Vieira, M., & Saraiva, M. J. (2014). Transthyretin : A multifaceted protein. *BioMolecular Concepts*, *5*(1), 45-54. https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0038

Vígh, B., Manzano e Silva, M. J., Frank, C. L., Vincze, C., Czirok, S. J., Szabó, A., Lukáts, A., & Szél, A. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and Histopathology*, *19*(2), 607-628.

Vigh, B., & Vigh-Teichmann, I. (1998). Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microscopy Research and Technique*, *41*(1), 57-83. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R

Vigh, B., Vigh-Teichmann, I., & Aros, B. (1977). Special dendritic and axonal endings formed by the cerebrospinal fluid contacting neurons of the spinal cord. *Cell and Tissue Research*, *183*(4), 541-552.

Vigh, B., Vigh-Teichmann, I., Röhlich, P., & Oksche, A. (1983). Cerebrospinal fluid-contacting neurons, sensory pinealocytes and Landolt's clubs of the retina as revealed by means of an electron-microscopic immunoreaction against opsin. *Cell and Tissue Research*, *233*(3), 539-548.

Vigh-Teichmann, I., & Vigh, B. (1989). The cerebrospinal fluid-contacting neuron: A peculiar cell type of the central nervous system. Immunocytochemical aspects. *Archives of Histology and Cytology*, *52 Suppl*, 195-207.

Vinay, L., Barthe, J. Y., & Grillner, S. (1996). Central modulation of stretch receptor neurons during fictive locomotion in lamprey. *Journal of Neurophysiology*, *76*(2), 1224-1235. https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.2.1224

Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E., & Pflieger, J. F. (2002). Development of posture and locomotion: An interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *40*(1-3), 118-129. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00195-9

W

Welsh, M. J., Price, M. P., & Xie, J. (2002). Biochemical basis of touch perception: Mechanosensory function of degenerin/epithelial Na+ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(4), 2369-2372. https://doi.org/10.1074/jbc.R100060200

Whelan, P., Bonnot, A., & O'Donovan, M. J. (2000). Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *Journal of Neurophysiology*, *84*(6), 2821-2833. https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.6.2821

Wichmann, T. O., Damkier, H. H., & Pedersen, M. (2021). A Brief Overview of the Cerebrospinal Fluid System and Its Implications for Brain and Spinal Cord Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, *15*, 737217. https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.737217

Wilson, A. C., & Sweeney, L. B. (2023). Spinal cords: Symphonies of interneurons across species. *Frontiers in Neural Circuits*, *17*. https://doi.org/10.3389/fncir.2023.1146449

Woo, S.-H., Lukacs, V., de Nooij, J. C., Zaytseva, D., Criddle, C. R., Francisco, A., Jessell, T. M., Wilkinson, K. A., & Patapoutian, A. (2015). Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nature Neuroscience*, *18*(12), 1756-1762. https://doi.org/10.1038/nn.4162

Woodcock, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in Neurology*, *4*, 18. https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00018

Wu, G., Markowitz, G. S., Li, L., D'Agati, V. D., Factor, S. M., Geng, L., Tibara, S., Tuchman, J., Cai, Y., Park, J. H., van Adelsberg, J., Hou, H., Kucherlapati, R., Edelmann, W., & Somlo, S.

(2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nature Genetics*, *24*(1), 75-78. https://doi.org/10.1038/71724

Wu, G., & Somlo, S. (2000). Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *69*(1), 1-15. https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2943

Wu, M.-Y., Carbo-Tano, M., Mirat, O., Lejeune, F.-X., Roussel, J., Quan, F. B., Fidelin, K., & Wyart, C. (2021). Spinal sensory neurons project onto the hindbrain to stabilize posture and enhance locomotor speed. *Current Biology: CB*, S0960-9822(21)00740-5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.05.042

Wyart, C., Del Bene, F., Warp, E., Scott, E. K., Trauner, D., Baier, H., & Isacoff, E. Y. (2009). Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, *461*(7262), 407-410. https://doi.org/10.1038/nature08323

X

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D. J., Nicholson, C., Iliff, J. J., Takano, T., Deane, R., & Nedergaard, M. (2013). Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6156), 10.1126/science.1241224. https://doi.org/10.1126/science.1241224

Y

Yang, J., Wang, Q., Zheng, W., Tuli, J., Li, Q., Wu, Y., Hussein, S., Dai, X.-Q., Shafiei, S., Li, X.-G., Shen, P. Y., Tu, J.-C., & Chen, X.-Z. (2011). Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) inhibits the function of TRP-type channel Pkd2L1 through physical interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305854

Yue, W. W. S., Touhara, K. K., Toma, K., Duan, X., & Julius, D. (2024). Endogenous opioid signalling regulates spinal ependymal cell proliferation. *Nature*, *634*(8033), 407-414. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07889-w

Z

Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., & Miles, G. B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*, *64*(5), Article 5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017

Zelenin, P. V., Vemula, M. G., Lyalka, V. F., Kiehn, O., Talpalar, A. E., & Deliagina, T. G. (2021). Differential Contribution of V0 Interneurons to Execution of Rhythmic and Nonrhythmic Motor Behaviors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *41*(15), 3432-3445. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1979-20.2021

Zeng, H., & Madisen, L. (2012). Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Progress in Brain Research*, *196*, 193-213. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59426-6.00010-0

Zhang, G., Vidal Pizarro, I., Swain, G. P., Kang, S. H., & Selzer, M. E. (2014). Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection. *The Journal of Comparative Neurology*, *522*(6), 1316-1332. https://doi.org/10.1002/cne.23485

Zhang, J., Lanuza, G. M., Britz, O., Wang, Z., Siembab, V. C., Zhang, Y., Velasquez, T., Alvarez, F. J., Frank, E., & Goulding, M. (2014). V1 and v2b interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion. *Neuron*, *82*(1), 138-150. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.013

Zhang, J., Weinrich, J. A. P., Russ, J. B., Comer, J. D., Bommareddy, P. K., DiCasoli, R. J., Wright, C. V. E., Li, Y., van Roessel, P. J., & Kaltschmidt, J. A. (2017). A Role for Dystonia-Associated Genes in Spinal GABAergic Interneuron Circuitry. *Cell Reports*, *21*(3), 666-678. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.079

Zhang, Y., Narayan, S., Geiman, E., Lanuza, G. M., Velasquez, T., Shanks, B., Akay, T., Dyck, J., Pearson, K., Gosgnach, S., Fan, C.-M., & Goulding, M. (2008). V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron*, *60*(1), 84-96. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.027

Zhong, G., Droho, S., Crone, S. A., Dietz, S., Kwan, A. C., Webb, W. W., Sharma, K., & Harris-Warrick, R. M. (2010). Electrophysiological characterization of V2a interneurons and their locomotor-related activity in the neonatal mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(1), 170-182. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4849-09.2010

ANNEXES

VIII – ANNEXES

1) Crozat, Elysa, Edith Blasco, Jorge Ramirez-Franco, Priscille Riondel, Nina Jurčić, Riad Seddik, Caroline Michelle, Jérôme Trouslard, et Nicolas Wanaverbecq. 2024. « Spinal cerebrospinal fluid contacting neurons are a conserved sensory neuronal population along the mouse spinal cord ». bioRxiv 2024.10.10.617653. doi: 10.1101/2024.10.10.617653.

2) Gerstmann Katrin, Nina Jurčić, Edith Blasco, Severine Kunz, Felipe de Almeida Sassi, Nicolas Wanaverbecq, et Niccolò Zampieri. 2022. « The Role of Intraspinal Sensory Neurons in the Control of Quadrupedal Locomotion ». Current Biology: CB 32(11):2442-2453.e4. doi: 10.1016/j.cub.2022.04.019.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Spinal cerebrospinal fluid contacting neurons are a conserved sensory neuronal population along the mouse spinal cord

CROZAT Elysa*, BLASCO Edith*, RAMIREZ-FRANCO Jorge*, RIONDEL Priscille, JURČIĆ Nina, SEDDIK Riad, MICHELLE Caroline, TROUSLARD Jérôme & WANAVERBECQ Nicolas#

Institut de Neurosciences de la Timone, SpiCCI team, Marseille Université (AMU) & CNRS, UMR7289, Marseille, France.

* CE, BE & RFJ Contributed equally to this work as first authors.
# Correspondence should be addressed to: nicolas.wanaverbecq@univ-amu.fr (WN)

Cerebrospinal Fluid contacting neurons (CSF-cNs) are present in all vertebrates around the medullo-spinal central canal. They are GABAergic, selectively express PKD2L1, a member of the TRP channel superfamily, and are thought to represent a novel sensory system intrinsic to the central nervous system. Using histology, we found that CSF-cNs form a homogeneous population, distributed along the whole spinal cord and mainly located in the ventral region of the central canal. Patch-clamp recordings reveal conserved intrinsic properties and voltage-dependent conductance expression. Spinal CSF-cNs express PKD2L1 channels and ASICs, acting as sensory receptors for extracellular pH changes. They express both inhibitory ($GABA_A$, glycine) and excitatory (glutamate, cholinergic) synaptic receptors as well as functional $GABA_B$ and muscarinic receptors, but not glutamatergic metabotropic ones, to modulate Ca^{2+} channels.
CSF-cNs represent a functionally homogeneous population that might integrates sensory signals along the central canal to modulate body functions by regulating local spinal networks. Demonstrating such a function represents the future challenge in the field.

Keywords: Cerebrospinal fluid contacting neuron; spinal cord; central canal; PKD2L1; voltage-dependent conductance; ligand-gated receptos

INTRODUCTION

Neurons in contact with cerebrospinal fluid (CSF-cNs) are present around the central canal (CC) in numerous vertebrate species[1–9] but remain functionally under-characterized[10] in mammals. These GABAergic bipolar neurons have a unique morphology, with their soma located beneath or within the ependymocyte monolayer lining the CC[1–9]. They project a single dendrite toward the CC lumen, ending in a ciliated protrusion that contacts the CSF[7,9,11,12]. Their axon extends into the ventral spinal cord (SC), and form long, bilateral fiber bundles at the median fissure[5,11,13–15]. Unlike the long range sparse GABAergic projections[16] observed in the hippocampus[17] and the inferior olive[18], CSF-cNs form a unique dense network of ascending fibers running along several SC segments and extending collaterals within the spinal tissue with recurrent synapses onto CSF-cNs[14,15].

In juvenile rats[9], CSF-cNs exhibit spontaneous action potential (AP) firing, mediated by sodium and potassium voltage-dependent channels, and they also express voltage-dependent calcium channels (Ca_V 2.2 and Ca_V 3.1-3)[19,20,21]. CSF-cNs appear integrated in a neuronal network receiving primarily inhibitory inputs ($GABA_A$ and glycine receptors)[12,19], as well as excitatory ones (AMPA/kainate receptors)[6,19]. They also exhibit homo- and heterosynaptic modulations through metabotropic GABAergic receptors ($GABA_B$-Rs)[19]. These neurons express PKD2L1, a channel sensitive to pH, and osmolarity changes (chemosensitivity)[12,22–25] as well as CSF flow, and SC bending (mechanosensitivity)[26–28]. Additionally, they express acid-sensing ion channels (ASICs) and both channels are capable of modulating CSF-cN excitability[22,24]

Morphological[6,8,29,30] and phenotypic[8,30–32] differences suggest CSF-cNs are regrouped in two subpopulations. CSF-cNs present in the CC ventral region exhibit immature phenotypes[5,8,29–31] combined with single AP firing[8,30]. Dorso-lateral CSF-cNs have a more mature phenotype and tonic AP discharge[8,29–31]. In lumbar segments, the two subpopulations also differ in their responses to GABAergic signaling, either inducing depolarization or hyperpolarization[33].

In zebrafish larvae, CSF-cNs selectively activate motor neurons and interneurons, influencing swimming behavior[26,34,35]. In mice, they play a role in controlling posture, balance[15], and locomotion[14]. Finally, they have been shown to respond to bacterial toxins, suggesting a potential role in the body's immune defense[36]. More recently, it was shown that, following SC injury, CSF-cN constitutive activation through κ-opioid signaling is halted leading to disinhibition of ependymal cell proliferation to promote scar formation[10].

Anatomical and functional evidence suggest that CSF-cNs serve as a novel sensory or interoceptive system intrinsic to the CNS. Due to their distinct properties and distribution along the SC, these neurons may integrate into specific spinal networks to modulate body functions.

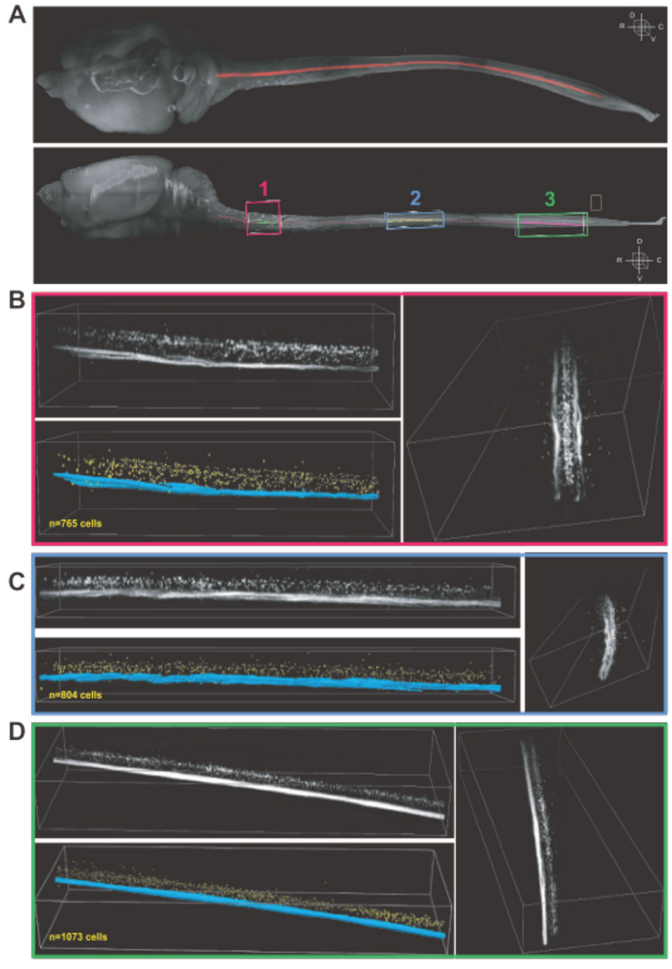
This study investigated, in the mouse SC, the distribution, morphology, and properties of CSF-cNs, a neuronal population that still remains enigmatic. Histological analyses reveal that CSF-cNs form a dense population along the SC axis, primarily located in the CC ventral region. Electrophysiological recordings show that they share similar intrinsic properties along the SC and express functional $GABA_A$, glycine, glutamate and cholinergic receptors. Additionally, functional $GABA_B$ and muscarinic receptors, but not glutamatergic metabotropic ones, modulate Ca^{2+} channels activity.

CSF-cNs would represent a functionally homogenous neuronal population integrating sensory signals to modulate specific spinal networks and body functions both in physiological and pathological conditions. Further research is required to characterize in-depth CSF-cN functional connectivity combined with behavioral studies. This represents the future challenge in the field to gain a deeper understanding of their integration into local spinal networks and function(s).

RESULTS

CSF-cN morphology and distribution along the central canal axis

CSF-contacting neurons (CSF-cNs) are found along the entire CC in various vertebrate species, exhibiting a consistent morphology[1–9]. In this study, we assessed the distribution and density of CSF-cNs in the mouse SC using the PKD2L1-Cre::tdTomato mouse model, to selectively label CSF-cNs with fluorescent tdTomato protein. CNS tissue was cleared using the vDISCO[37,38] method and imaged *via* light sheet microscopy, allowing 3D visualization of the entire SC. ***Figure 1A*** shows the anatomy of the CNS (tissue autofluorescence) and the localization of CSF-cNs along the CC (red line). Imaging of cervical, thoracic, and lumbar regions at higher magnification (Boxes 1-3 in ***Fig. 1A, Bottom***) reveals CSF-cN cell bodies distributed along the CC in all segments (***Fig. 1B-D***). Their axons projected into the ventral SC, forming bilateral fiber bundles ***(Fig.1B-D, Right*** ventral view). These neurons were also found in distal ventral regions, consistent with previous studies[13]. 3D reconstruction images were segmented to quantify CSF-cN cell bodies (yellow



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 1 - Localization of CSF-contacting neurons in the mouse Central Nervous System. A) Top. Dorsal view of the full rostro-caudal distribution of the CSF-cN system (red) within the mouse CNS (grey). Bottom. Lateral view of the image shown in the Top panel. Three boxes are indicated to depict representative cervical (1, red), thoracic (2, blue), and lumbar (3, green) regions acquired at higher magnifications. Boxes sizes are in µm along the Rostro-caudal (RC) x Latero-Median (LM) x Dorso-Ventral (DV): (1) 1764.75 x 1825.50 x 1726.00; (2) 3076.13 x 1784.25 x 818.00; (3) 3734.25 x 1228.50 x 1192.00. **B-D)** Higher magnification views and segmentation for the cervical (B), thoracic (C) and lumbar (D) SC segments for the boxes labelled in panel 1A Bottom as 1, 2 or 3 respectively (see color code in A). For each panel: Top Left, Higher magnification views of the respective boxes illustrated in **Fig. 1A**, **Bottom** panel with the same orientation. **Bottom Left**. 3D representation of the segmentation and cell counting of CSF-cNs for each SC segments (see methods; CSF-cNs in yellow and axon bundles in blue). **Right**. 90° rotation view of the image in the Top Left panel. Dimensions of the box are for the RC x LM x DV axes (in µm): cervical segment (B), 1764.75 x 913.25 x 463.00; thoracic segment (B), 3076.13 x 658.15 x 322.00 and lumbar segment (D), 3734.25 x 1228.50 x 492.00.

objects) as well as their axonal projection (labelled in blue; ***Fig.1B-D, Bottom***). To better resolve CSF-cN distribution and quantification along the CC axis, we acquired images using a higher magnification objective (12x; see ***Supplementary Figure 1***). Due to the small size of CSF-cNs, clustering tendencies, and tissue shrinkage from the clearing method, we faced technical limitations and reached microscopy optical limits to resolve and identify single CSF-cN somatas (see ***Supplementary Figure 2***). Further analysis was carried out using thin sections and confocal microscopy (***Figure 2A***). Results show that CSF-cNs are present in all SC segments but at a higher density in the lumbar compared to thoracic and cervical regions (***Fig. 2B***). A larger proportion of CSF-cNs is located in the ventral CC (***Fig. 2A, Right; 2C***) and neurons are closer to the CC in cervical and lumbar segments but further away in the thoracic one (***Fig. 2D***).

These findings suggest that, along the SC, CSF-cNs form a homogenous population with a conserved morphology and a predominantly ventral localization and a larger density in the lumbar region.

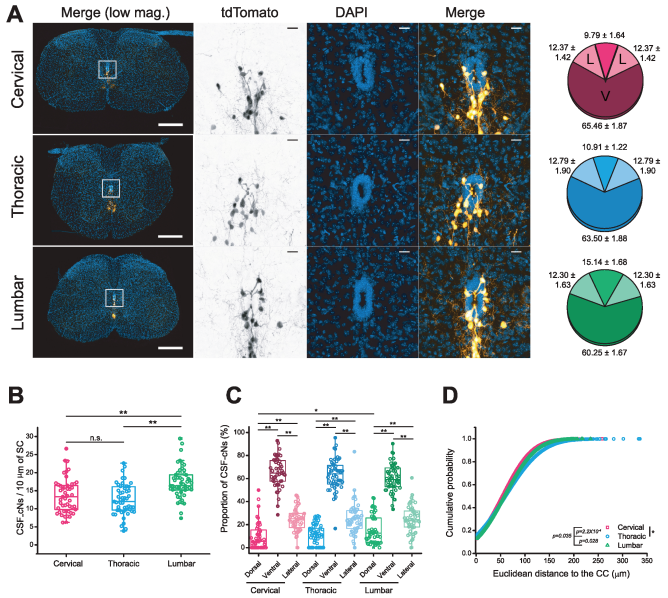


Figure 2 - Confocal analysis of CSF-cNs distribution in the mouse spinal cord. A) Left. Confocal images of tdTomato fluorescence in 3 weeks old PKD-tdTomato mouse at cervical (**Top** panels), thoracic (**Middle** panels), and lumbar (**Bottom** panels) levels of the SC. tdTomato fluorescence is depicted as inverted greyscale image when presented alone, and as an Orange hot lookup table in merge images. DAPI is depicted as Azure lookup table. Scale bar=200 µm in **Left** panels; 20 µm in Middle and Right panels. **Right**. Pie plots of CSF-cN distribution in dorsal, lateral, and ventral quadrants at cervical (**Top**, red), thoracic (**Middle**, blue) and lumbar (**Bottom**, green) levels of the SC.
B) Density of CSF-cNs per 10 µm of SC at cervical (red), thoracic (blue), and lumbar (green) levels of the SC. **C)** CSF-cNs distribution at the different levels of the SC. The color code corresponds to the one depicted in figure 1A. Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's test. *p<0.05; **p<0.01. For the sake of clarity, only significant comparisons are indicated. **D)** Cumulative distribution function plot of the Euclidean distances of CSF-cNs to the lumen of the CC at cervical (red), thoracic (blue), and lumbar (green) levels of the SC. Kolmogorov-Smirnov test. ***p<0.001.

Along the rostro-caudal axis CSF-cNs exhibit similar intrinsic properties

CSF-cNs intrinsic properties and firing pattern

CSF-cNs are found along the entire CC axis. However, only medullar CSF-cNs in mice have been extensively studied[12,22]. Here we characterized the intrinsic properties of lumbar (L-), thoracic (T-), and cervical (C-) CSF-cNs to determine if they form a homogenous population. Consistent with previous studies in the brainstem[12,22], spinal CSF-cNs have a high input resistance (R_m, 3.6±2.3 GΩ; N=191, n=659) and small membrane capacitance (C_m, 5.5±2.8 pF; N=191, n=659), with a fast membrane time constant (τ_m, 0.09±0.05 ms; N=191, n=659) in agreement with their small soma and dendritic arborization. When comparing across spinal segments, L-CSF-cNs displayed a higher R_m, while T-CSF-cNs had the lowest C_m (***Table 1***).

In current-clamp mode (CC, I=0), resting membrane potentials (RMP) is on average -55±19 mV (N=25, n=95), with L-CSF-cNs being more hyperpolarized compared to more depolarized CSF-cNs in anterior regions (***Table 1***; aCSF and intracellular solution A, ***Supplementary Tables 1 and 2***). AP discharge patterns were also assessed. In line with previous findings in juvenile rats[9] and postnatal mice[8], spinal CSF-cNs exhibit either tonic or single spike discharges. Following a current injection step (+20 pA, 200-500 ms duration and membrane potential at -60 mV, DC current: -10 to -15 pA), 58% of the neurons showed tonic AP firing (38 cells out of 65 recorded), while 42% fired a single AP (27 cells out of 65 recorded; ***Table 2***). Comparative analysis revealed that most L-CSF-cNs and C-CSF-cNs had single AP discharges while T-CSF-cNs exhibited a primarily tonic pattern (***Table 2***). However, these differences were not statistically significant and did not depend on the neuron's position around the CC. Overall, the findings suggest that while CSF-cNs share similar properties and appear to form a largely homogenous population throughout the SC, although some regional exist.

Table 1 - Intrinsic properties of CSF-cNs along the rostro-caudal central canal axis.

Spinal Segment		Cervical (C)	Thoracic (T)	Lumbar (T)
Input resistance	R_m	3.6 ± 2 GΩ	3.7 ± 2 GΩ	3.6 ± 3 GΩ
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=9.3472; degree of freedom (df)=2; p=0.009 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C vs. T, p=0.3227, ns; C vs. L, p=0.0479, ns & T vs.L, p=0.0094, **				
Membrane capacitance	C_m	5.6 ± 2.9 pF	4.8 ± 2.3 pF	6.3 ± 2.9 pF
Kruskal-Wallis's test: χ^2=39.891; df=2; p=2.17.10^{-9} Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.400, ns; C *vs.* L, p=0.531, ns & T *vs.*L, p=0.094, ns				
Membrane time constant	τ_m	92 ± 58 µs	86 ± 49 µs	90 ± 3 µs
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=4.1196; df=2; p=0.1275 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.3227, ns; C *vs.* L, p=0.0479, ns & T *vs.*L, p=0.0094, **				
N (animals), n (cells)		50, 227	65, 239	70, 193
Resting Membrane Potential	RMP	-46 ± 4 mV	-45 ± 6 mV	-52 ± 9 mV
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=17.613; df=2; p=0.00015 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.73535, ns; C *vs.* L, p=0.00714, ** & T *vs.*L, p=0.00016, ***				
N (animals), n (cells)		6, 20	10, 41	9, 34

Table 2 - CSF-cNs exhibit either a single spike or tonic AP discharge pattern.

Spinal cord Segments		Cervical (C)	Thoracic (T)	Lumbar (T)
Firing pattern	Single Spike (%)	67%	39%	71%
	Number of cells	14/21	9/23	15/21
	Tonic (%)	33%	61%	29%
	Number of cells	7/21	14/23	6/21
N (animals), n (cells)		10, 21	12, 23	9, 21
Fisher's exact test: 2, 5.576; degree of freedom (df) 2; P=0.0616				

CSF-cN modulation by extracellular pH through the activity of PKD2L1 and ASICs

In agreement with their expression of PKD2L1 channels[5,12,22,23,28], we observed spontaneous unitary PKD2L1 activity in CSF-cNs recorded at V_h -80 mV (aCSF with all synaptic receptors blocked, see *Material and Methods*), with an average current amplitude of -13±2 pA and an open probability (NPo) of 0.03±0.04 (N=23, n=60; ***Supplementary Figure 3***). No differences were found in amplitude or NPo across spinal segments. PKD2L1, a sensory chemoreceptor, responds to pH changes[12,22,23]. Exposure to alkaline pH (pH 9; ***Supplementary Figure 3A-D***) causes no change in current amplitude (-13±2, -13±2 and -13±2 pA in control, pH 9 and Wash, respectively; N=13, n=32; *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=2.7856, df=2, p(χ^2)=0.2484 and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: CTR *vs.* pH 9, p=0.36; CTR *vs.* Wash, p=0.36 and Wash *vs.* pH 9, p=0.57) but increased NPo by 20% (16±30%) from 0.04±0.05 to 0.16±0.12 before returning to baseline value upon Wash (0.08±0.1; *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=27.219, df=2, p(χ^2)=1.229.10^{-6} and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: CTR *vs.* pH 9, p=1.3.10^{-7}; CTR *vs.* Wash, p=0.16162 and Wash *vs.* pH 9, p=0.00045; N=13, n=32). Again, all spinal CSF-cNs show a similar response to alkaline pH exposure (***Supplementary Figure 3A-B***).

PKD2L1 acts as a AP generator at the single channel level and exposure to alkaline pH increases PKD2L1 activity as well as CSF-cN excitability in the *medulla*[22]. In recordings conducted in current-clamp mode at RMP (aCSF with all synaptic receptors blocked, see *Material and Methods*), all spinal CSF-cNs exhibit an increase in the AP firing frequency from 1.6±2.1 Hz in control to 2.4±2.4 Hz under alkaline pH, which also reversed upon Wash (frequency in Wash: 1.4±2.0 Hz; ***Supplementary Figure 3C, D***; *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=9.4037, df=2, p(χ^2)= 0.009079 and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: CTR *vs.* pH 9, p=0.012; CTR *vs.* Wash, p=0.902 and Wash *vs.* pH 9, p=0.012; N=12, n=32).

In contrast, exposure to acidic pH (pH 5; same extracellular and intracellular solutions as above) inhibited PKD2L1 activity, reducing the current amplitude from -13±2 pA in control to 0.9±2.1 pA in pH5 (***Supplementary Figure 3E***), followed by a recovery to -14±2 pA upon Wash (N=10, n=28; *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=55.896, df=2, p(χ^2)= 7.282.10^{-13} and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: CTR *vs.* pH5, p=3.9.10^{-16}; CTR *vs.* Wash, p=0.27 and Wash *vs.* pH5, p=3.9.10^{-16}). NPo also decreased reversibly under acidic conditions from 0.024±0.018 in control to 0.001±0.001 in the presence of acidic solution (***Supplementary Figure 3E,F***; Wash: 0.048±0.076; N=10 n=28; *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=52.84, df=2, p(χ^2)=3.357.10^{-12} and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

rank sum test with continuity correction: CTR *vs.* pH5, p=7.1.10^{-10}; CTR *vs.* Wash, p=0.95 and Wash *vs.* pH5, p=8.2.10^{-10}).

Additionally, acidic pH triggered in all spinal CSF-cNs a large transient inward current (on average -801±411 pA; N=10, n=24) followed by a persistent phase (***Supplementary Figure 3G***), typical of ASICs activation and previously reported in medullar CSF-cNs[12,22] (see also Jalavand and Colleagues[24]). The ASICs currents had similar amplitude in all spinal CSF-cNs recorded (C: -712±289 pA; T: -685±189 pA and L: -1005±599 pA (n=8 for each segments); *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=0.74, df=2, p(χ^2)=0.6907 and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: C *vs.* T, p=0.76; C *vs.* L, p=0.96 and T *vs.* L, p=0.76). During the persistent phase of ASICs current, PKD2L1 channels were inhibited (colored boxes in ***Supplementary Figure 3G*** and above). In current-clamp recordings at RMP, ASICs activation led on average to a +37±9 mV depolarization (***Supplementary Figure 3H, I_1***; N=11, n=38) that was large enough to trigger APs in all spinal CSF-cNs (***Supplementary Figure 3H, I_2***).

In conclusion, spinal CSF-cNs maintain conserved intrinsic properties with a depolarized membrane potential and exhibit chemosensory functions, responding to extracellular pH variations.

Spinal CSF-cNs express functional sodium, potassium and calcium voltage-dependent channels

Marichal and colleagues[9] showed functional sodium (Na_V) and potassium (K_V) voltage-dependent conductances in juvenile rat CSF-cNs. We analyzed mouse spinal CSF-cNs to identify the presence and types of voltage-dependent conductances.

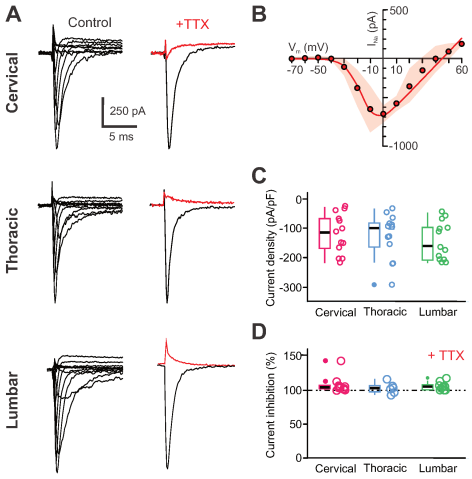


Figure 3 - CSF-cNs express functional TTX-sensitive sodium voltage-dependent channels. A) Left. Representative whole-cell current traces recorded in response to V_{Step} from -70 mV to +60 mV (+10 mV increments for 50 ms) from V_h -80 mV to elicit Na^+ current in a CSF-cN at the cervical (Top), thoracic (Middle) and lumbar (Bottom) levels. Right. Na^+ whole-cell currents elicited with a voltage step to +10 mV from V_h -70 mV in control (black trace) and in the presence of 0.5 µM TTX (red traces) recorded in the CSF-cNs illustrated Left. **B)** Average current-voltage relationship (IV-curve) for the Na^+ currents recorded in CSF-cNs at all levels and generated from the peak current amplitude measured for each V_{Step} and presented against the respective V_{Step}. **C)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the Na^+ peak current density recorded in control at a V_{Step} of +10 mV from V_h -80 mV from CSF-cNs at each segment of interest (cervical, red: -132±74 pA.pF^{-1} (N=8, n=23); thoracic, blue: -91±40 pA.pF^{-1} (N=8, n=13) and lumbar, green: -129±63 pA.pF^{-1} (N=4, n=20); (Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=2.2544, df=2, p=0.3239; posthoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. L, p=0.88, T vs. C and T vs. L p=0.29). **D)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged TTX inhibition (in percent) of the Na^+ current inhibition by 108±12 %, 103±8 % and 106±6 % for cervical (N=4, n=12), thoracic (N=4, n=8) and lumbar (N=2, n=6), respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=0.65025, df=2, p(χ^2)=0.7224 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.83; C vs. L, p=0.87 and T vs. L, p=0.83). In **C** and **D**, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

We first analyzed Na^+ voltage-dependent currents. Recordings of spinal CSF-cNs in voltage-clamp mode at V_h -70 mV with specific solutions to isolate I_{Na} currents (Na_V solution and intracellular solution B, ***Supplementary Tables 1 and 2***) reveals fast, inactivating inward currents in all cells during incremental voltage steps (V_{Step} from -70 to +60 mV, ΔV=+10 mV, 100 ms; ***Fig. 3A***). The current activates at V_{Step} more depolarized than -40 mV, peaks at 0 mV with an average current amplitude of -712±450 pA (N=10, n=41) and a current density of -124±67 pA.pF^{-1} (N=10, n=41; ***Fig. 3B, C***). Subsequently the current decreases for more depolarized V_{Step} and reversed above +50 mV in agreement with the calculated sodium equilibrium potential (E_{Na}=+46 mV, ***Supplementary Table 1***). We did not observe difference in the Na^+ current amplitude between C-, T- and L-CSF-cNs (***Fig. 3C***). Tetrodotoxine (TTX, 0.5 µM) completely blocked the current confirming expression of functional TTX-sensitive Na_V channels in spinal CSF-cNs (***Fig. 3D***; inhibition by 106±9% from -141±71 in control to 8±11 pA.pF^{-1} in TTX (N=10, n=28); cervical, red: -139±65 pA.pF^{-} and 8±11, pA.pF^{-1} (N=4, n=12); thoracic, blue: -178±92 pA.pF^{-1} and 10±14 pA.pF^{-1} (N=4, n=6) and lumbar, green: -122±61 pA.pF^{-1} and 7±9 pA.pF^{-1} (N=2, n=10) in control and TTX, respectively; *ANOVA.lme*: F=25.87, df=5 and 50, p(F)=8.582.10^{-13} and *Tukey (EMM) post-hoc* test to compare CTR *vs.* TTX within the different regions: ***,p<0.0001 in cervical, thoracic and lumbar segments. There is no difference between CTR and TTX between regions).

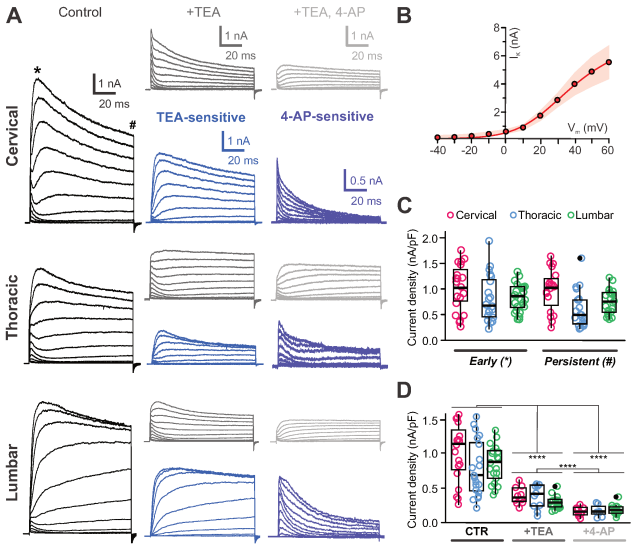


Figure 4 - Delayed rectifier and A-type voltage-dependent potassium channels are present in CSF-cNs. A) Representative whole-cell current traces recorded in response to V_{Step} from -40 to +60 mV (increments of 10 mV, 100 ms) from V_h -80 mV in control (black traces), in the presence of TEA (grey traces) and in the presence of TEA and 4-AP (light grey traces). cervical, thoracic and lumbar levels, from Top to Bottom. For each level the TEA- (Blue traces) and 4-AP-senstive (violet) currents are presented (see Results for more details). **B)** Control average current-voltage relationship (IV-curve) for the K^+ currents recorded in CSF-cNs from all levels. **C)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the peak K^+ current density recorded in control (V_{Step} +60 mV from V_h -80 mV) for the peak/early (E,*) and persistent (P, #) currents (cervical, red: 1039±450 and 976±408 pA.pF^{-1} (N=4, n=19); thoracic, blue: 814±453 and 612±364 pA.pF^{-1} (N=4, n=21) and lumbar, green: 855±267 and 758±243 pA.pF^{-1} (N=2, n=20) - E and P in order; ANOVA.lme: F=3.35, df=5 and 114, p(F)=0.007349 and Tukey (EMM) post-hoc test to compare E vs. P within the different regions and between regions; * and ** for p<0.05 and <0.01, respectively). **D)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the peak K^+ current density for CSF-cNs recorded (V_{Step} +60 mV from V_h -80 mV) in the 3 regions of interest in control (CTR), in the presence of TEA (+TEA) and of TEA + 4-AP (+4-AP). (C, red: 1039±450, 397±128168±64 pA.pF^{-1} (N=4, n=19, 10, 10); T, blue: 814±453, 380±178 and 176±87 pA.pF^{-1} (N=5, n=20,10, 7) and L, green: 855±267, 296±88 and 196±67 pA.pF^{-1} (N=5, n=21, 19, 17); data given for CTR, +TEA and +4-AP, respectively; ANOVA.lme: F=22.73, df=8 and 124, p(F)<2.2.10^{-16} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare CTR vs. +TEA, CTR vs. +4-AP and +TEA vs. +4-AP within the different regions and between the different regions; *, ** and *** for p<0.05, <0.01 and <0.001, respectively). In C and D, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

In juvenile rats[9], delayed rectifier (I_{KD}) and A-type K^+ currents (I_A) were identified. To determine the functional expression of voltage-dependent K^+ channels (K_V) in mouse spinal CSF-cNs, we conducted recordings at V_h -80 mV using specific solutions to isolate K_V currents (K_V solution and intracellular solution A, ***Supplementary Tables 1 and 2***) and applied a 50 ms pre-step to -100 mV, followed by V_{Step} from -40 to +60 mV (ΔV=+10 mV, 100 ms; ***Fig. 4A***). The elicited current had an average current amplitude at the peak of 5478±2012 pA and a current density of 900±402 pA.pF^{-1} at +60 mV (N=14, n=60). The I–V curve (***Fig. 4B***), in agreement with the potassium reversal potential (E_K=-94 mV, ***Supplementary Table 1***), shows outward currents activated for V_{Step} larger than -30 mV and the current increased proportionally to the V_{Step} amplitude. Typically, the activated currents presented an initial transient phase (Peak (E, *): 900±402 pA.pF^{-1} followed by a persistent one (Persistent (P, #): 778±368 pA.pF^{-1}; N=14, n=60) lasting for the whole duration of V_{Step}.

Application of TEA (10 mM) reduced the current by 56±18% (current density of 344±131 pA.pF^{-1}; N=14, n=39; ***Fig. 4A***, current traces +TEA and ***Fig. 4D***) and the TEA-sensitive (digital subtraction of the current recorded in control minus that in TEA; blue traces in ***Fig. 4A***) exhibited characteristic kinetics of I_{KD} (***Fig 4A***). Adding 4-AP (4 mM; +4-AP) further decreased the current by 44±29% (amplitude of 183±69 pA.pF^{-1}; N=14, n=34; ***Fig 4A and D***). The 4-AP sensitive current (digital subtraction of the current recorded in TEA only minus that in TEA and 4-AP; violet traces in ***Fig.4A***) exhibit fast-rising phase, and rapid inactivation compatible with I_A (***Fig. 4A***). The remaining current was likely non-selective or K^+ leak currents.

In a previous report, we indicated that mouse medullar CSF-cNs express functional voltage-dependent Ca^{2+} channel (Ca_V) mainly of the N-type ($Ca_V2.2$)[19] while in juvenile rat[9] they appear to express both High (HVA) and Low Voltage-Activated (LVA) Ca^{2+} conductances. To investigate this in spinal CSF-cNs, we isolated Ca^{2+} currents (Ca_V solution and intracellular solution B, ***Supplementary Tables 1 and 2***) and recorded neurons at V_h -80 mV with V_{Step} from -40 to +30 mV (ΔV=+10 mV, 100 ms). The elicited inward currents show a fast rise, an initial transient decrease followed by a persistent steady-state current. They also exhibit fast tail currents upon repolarization of the membrane potential (***Fig. 5A***). At V_h -60 mV, the I-V curve revealed that currents activate at V_{Step} larger than -40 mV, peaks at 0 mV (***Fig. 5A, B***), with an average current

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

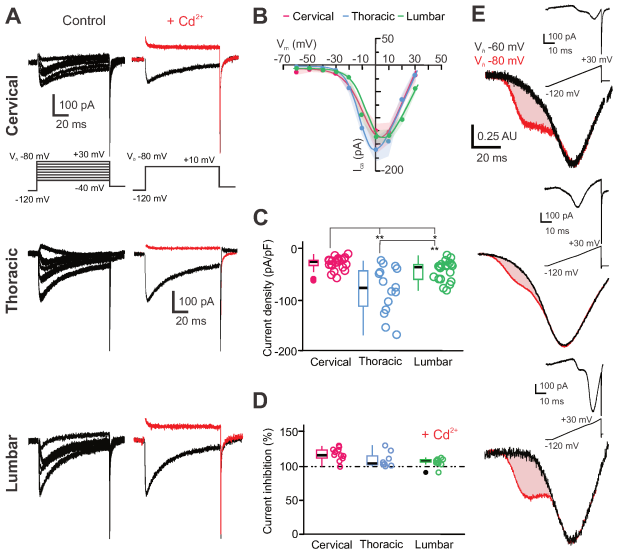


Figure 5 - CSF-cNs express calcium channels of the high and low voltage-activated types. A) Left. Representative whole-cell current traces recorded in response to V_{Step} from V_{Step} -40 mV to +30 mV (V_{Step}, 10 mV increments, 100 ms) from V_h -80 mV with a prepulse to -120 mV to elicit I_{Ca} in a CSF-cN at the cervical (Top), thoracic (Middle) and lumbar (Bottom) levels. Right. Ca^{2+} whole-cell currents elicited with a voltage step to +10 mV from V_h - 80 mV in control (black trace) and in the presence of 200 µM Cd^{2+} (red traces) recorded in the CSF-cNs illustrated Left. **B)** Average current-voltage relationship (IV-curve) for the I_{Ca} recorded from V_h -60 mV in CSF-cNs at the cervical (red, N=10, n=41), thoracic (blue, N=10, n=41) and lumbar (green, N=10, n=41) using a ramp protocol for current against time and subsequently converted as current against voltage relationship. **C)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the Ca^{2+} peak current density recorded in control at a V_{Step} of +10 mV from V_h -80 mV and measured at the steady state in CSF-cNs from each segment of interest (cervical, red: -29±12 pA.pF^{-1} (N=2, n=22); thoracic, blue: -81±46 pA.pF^{-1} (N=5, n=15) and lumbar, green: -44±20 pA.pF^{-1} (N=10, n=21); Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=20.143, df=2, p(χ^2)=4.226.10^{-5} and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=5.6.10^{-5}; C vs. L, p=0.0049 and T vs. L, p=0.0110). **D)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged Cd^{2+} inhibition (in percent) of I_{Ca} (inhibition by 118±9 % for C- (N=2, n=11); 110±11 % for T- (N=5, n=8) and 106±6 % for L-CSF-cNs (N=10 n=10) , respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=0.38571, df=2, p(χ^2)=0.8246 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, C vs. L and T vs. L, p=0.97, respectively). In **C** and **D**, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above). **E)** Averaged Ca^{2+} IV-Curves converted the recordings obtained using a ramp protocol from V_h -80 mV (red traces) and -60 mV (black traces) for CSF-cNs at the cervical to the lumbar levels (Top to Bottom; see Methods for more details). The red shaded area indicates the LVA (T-type channel) currents. Note that the data are normalized to the peak and presented in arbitrary units (AU) for a better comparison. Inset illustrates the activation protocol and an elicited representative recording for each region of interest.

amplitude of -278±168 pA and current density of -48±34 pA.pF^{-1} (N=17, n=58; ***Fig. 5C***). T-CSF-cNs showed the largest Ca^{2+} current peak amplitude while it was the smallest in C-CSF-cNs (***Fig. 5C***). Altogether the properties of the currents recorded agree with those mediated by Ca_V and this observation was further confirmed by a current block of 112±10 % from -46±39 pA.pF^{-1} in control to 4±4 pA.pF^{-1} in the presence of Cd^{2+} (200 µM, pressure application; ***Fig. 5A, Right and D***; N=17, n=29), a Ca_V selective blocker (. In juvenile rat[9] and mouse thoracic segment, CSF-cNs were suggested to also express LVA Ca_V of the T-type (Ca_V 3.3) that are inactivated for membrane potential around -60 mV. Using ramp protocols from V_h -80 mV, revealed a characteristic 'shoulder' in all spinal CSF-cNs (average amplitude: -51±32 pA, membrane potential: -29±7 mV (N=19, n=172); ***Fig. 5E***). This shoulder was not observed in recordings carried out at V_h -60 mV, a membrane potential where T-type Ca^{2+} (Ca_V 3) are known to be inactivated (***Fig. 5E***). Note that the current traces illustrated in ***Figure 5E*** have been normalized to the peak value for a better visualization. These results demonstrate that spinal CSF-cNs express both HVA and LVA Ca_V, with T-CSF-cNs having higher Ca^{2+} current density.

Altogether, spinal CSF-cNs express functional Na_V, along with K_V of the delayed rectifier- (I_{KD}) and A-type (I_A), which are similarly distributed along the CC axis and would be responsible for the AP generation. Additionally, all spinal CSF-cNs express both HVA and LVA Ca_V, with higher current density in T-CSF-cNs.

CSF-cN express the major ionotropic synaptic receptors

Mice medullar CSF-cNs express synaptic ionotropic receptors, including GABAergic, glycinergic, and AMPA/Kainate glutamatergic receptors[12], mediating spontaneous and electrically evoked synaptic responses[19]. To assess the expression of these receptors in spinal CSF-cNs, we performed voltage-clamp recordings at V_h -80 mV and applied selective agonists by pressure. GABA (1 mM, 30 ms; ***Fig. 6A***) and glycine (1 mM, 100 ms; ***Fig. 6C***) elicited fast and large inward currents (with E_{Cl}=+5 mV, aCSF and intracellular solution C, ***Supplementary Tables 1 and 2***) in all CSF-cNs. The average current densities of -321±36 pA.pF^{-1} (N=6, n=36) and -529±64 pA.pF^{-1} (N=8, n=32) for GABA and glycine application, respectively (***Fig. 6B, D***). The currents were blocked in the presence of their selective antagonist, gabazine (Gbz,10 µM; 97.6±0.3 %; N=6, n=27) and strychnine (Stry,1 µM; 95.5±1.0 %; N=9, n=23), respectively and therefore mediated by $GABA_A$ and glycine receptor activation (***Fig. 6B***, red traces). The current recorded were mediated by GABA and glycine receptor-mediated currents were blocked by gabazine (97.6±0.3%; N=6, n=27) and strychnine (95.5±1.0%; N=9, n=23). GABA currents were highest in T-CSF-cNs, while glycine currents were larger in L-CSF-cNs. When comparing the data along the CC axis, $GABA_A$-mediated currents were the highest in T-CSF-cNs compared to C- and L-CSF-cNs (***Fig. 6A, B***). In contrast, glycine-mediated current where similar in C- and T-CSF- but larger in L-CSF-cNs (***Fig. 6C, D***).

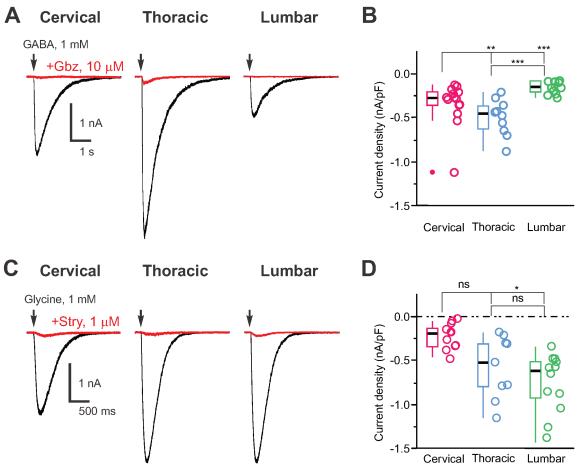
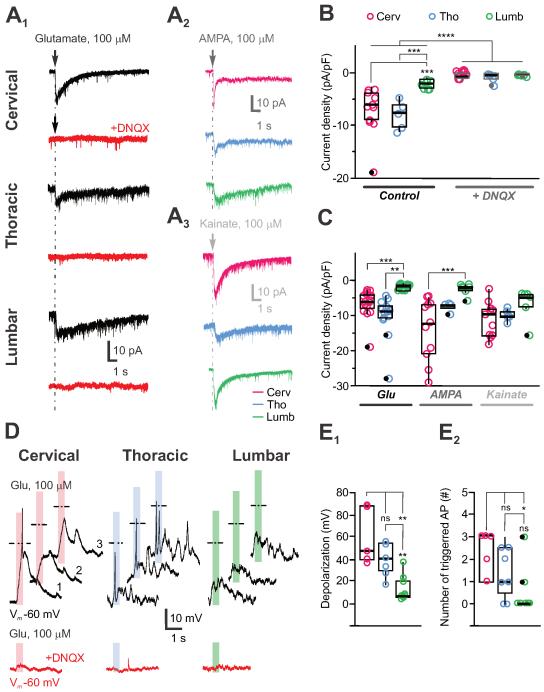


Figure 6 - CSF-cNs express different density of $GABA_A$ and glycine receptors. A) Representative whole-cell current traces recorded at V_h -80 mV in response to pressure application of GABA (1 mM, 30 ms) in control (black traces) and in the presence of gabazine (Gbz,10 µM; red traces), a selective $GABA_A$ receptor antagonist, in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (**Left to Right**). **B)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the GABA-mediated current densities recorded in control at V_h -80 mV (cervical, red: -342±250 pA.pF^{-1}, N=2, n=14; thoracic, blue: -495±204 pA.pF^{-1}, N=2, n=10 and lumbar, green: -153±69 pA.pF^{-1}, N=2, n=12; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=17.975, df=2, p(χ^2)=1.25.10^{-4} and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.02602; C vs. L, p=0.00306 and T vs. L, p=0.00011). **C)** Representative whole-cell current traces recorded at V_h -80 mV in response to pressure application of glycine (1 mM, 30 ms) in control (black traces) and in the presence of strychnine (Stry,10 µM; red traces), a selective glycine receptor antagonist, in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (**Left to Right**). **D)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the glycine-mediated current densities recorded in control at V_h -80 mV (cervical, red: -232±146 pA.pF^{-1}, N=2, n=11; thoracic, blue: -584±351 pA.pF^{-1}, N=9, n=10 and lumbar, green: -761±340 pA.pF^{-1}, N=6, n=12; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=14.979, df=2, p(χ^2)=5.589.10^{-4} and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.03; C vs. L, p=5.3e-05 and T vs. L, p=0.25). In **B** and **D**, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

Next, medullar CSF-cNs express functional AMPA/Kainate receptors[12,22], and our results show that pressure application of glutamate (100 µM, 100-500 ms) induces inward currents in all spinal CSF-cNs with an average current amplitude and density of -22±14 pA and -6±5 pA.pF^{-1} and characterized by slow kinetics similar to those observed in medullar CSF-cNs (***Fig. 7A1***) (N=22, n=46), *Kruskal-Wallis rank sum* test: χ^2=32.74, df=2, p(χ^2)= 7.773.10^{-8} and a post hoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction*: C *vs.* T, p=0.0015; C *vs.* L and T *vs.* L, p<0.0001). These currents



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 7 - Slow kinetics-low amplitude AMPA/Kainate glutamatergic receptors modulate CSF-cN excitability. A) Representative whole-cell current traces recorded in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (Top to Bottom) at V_h -80 mV in response to pressure application of glutamate (100 µM, 100 ms and 500 ms for the lumbar region; **A1**), AMPA (100 µM, 30 ms; **A2**) and Kainate (100 µM, 30 ms; **A3**). In **A1**, the representative currents recorded in the presence of DNQX (400 µM; red traces) upon Glutamate applications are illustrated for each segment below the control traces. Arrows and dashed lines in A_1, A_2 and A_3 indicate tilme of agoist application. **B)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the glutamate-mediated currents recorded at V_h -80 mV in control (Left) and in the presence of DNQX (Right) for the 3 segments of interest (-7±5, -8±3 and -2±1 pA.pF^{-1} in Control and 0.5±0.6, -0.8±1.0 and 0.2±0.2 pA.pF^{-1} in DNQX for the cervical (red, N=2, n=11), thoracic (blue, N=2, n=5) and lumbar (green, N=2, n=7) segments, respectively; ANOVA.lme: F=13.83, df=5 and 40, p(F)=7.362.10^{-6} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare Control and DNQX currents within each region and Control vs. DNQX currents between the different regions; *** and **** for p<0.01 and <0.001, respectively). **C)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the current densities recorded at V_h -80 in CSF-cNs from the cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green) in response to pressure application of glutamate (Glu), AMPA and Kainate (-7±4, -14±9 and -11±5 pA.pF^{-1}; -10±6, -8±1 and -10±2pA.pF^{-1} and -2±1, -2±2 and -6±4 pA.pF^{-1} in cervical (red, N=3, n=16, 11 and 11), thoracic (blue, N=3, n=13, 4 and 5) and lumbar (green, N=3, n=17, 7 and 6) segments, respectively. Data and n are given Glu-, AMPA- and Kainate-mediated current, respectively; ANOVA.lme: F=7.907, df=8 and 81, p(F)=8.36.10^{-8} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare Glu-, AMPA- and Kainate-mediated currents within each region and between the different regions; *, ** and *** for p<0.05, <0.01 and <0.001, respectively). **D)** Representative traces of the membrane potential changes recorded at V_m -60 mV in current-clamp mode in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (Left to Right) in response to pressure application of glutamate (100 µM, 100 ms). Bottom traces in red are membrane potential changes recorded upon Glutamate application in the presence of DNQX. Shaded colored bars indicates the duration of the agonist application and dashed lines the 0 mV voltage. **E1)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged depolarization levels of the membrane potential in CSF-cNs from the cervical (red, N=2, n=5), thoracic (blue, N=3, n=7) and lumbar (green, N=2, n=9) in response to pressure application of glutamate (Depolarization level: +60±26, +13±11 and +48±30 mV for C, T and L, respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=11.957, d=2, p(χ^2)=2.533.10^{-3} and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.530; C vs. L and T vs. L, p=0.005). **E2)** Summary box-and-whiskers plots of the average number of AP triggered in CSF-cNs from the cervical (red, N=2, n=5), thoracic (blue, N=3, n=7) and lumbar (green, N=2, n=9) in response to pressure application of glutamate (AP number: 2.2±1.1, 1.4±1.3 and 0.4±1.0 for C, T and L, respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=7.5111, df=2, p(χ^2)=0.02339 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.302; C vs. L, p=0.0034 and T vs. L, p=0.117). In **B, D** and **E**, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

were present across spinal segments but were significantly smaller in L-CSF-cNs (***Fig. 7B***) (aCSF and intracellular solution C, ***Supplementary Tables 1 and 2***). AMPA/Kainate receptor activation was confirmed by the selective current inhibition in the presence of DNQX (400 µM; 91±2% current inhibition). AMPA (100 µM, ***Fig. 7A2***) and Kainate (100 µM, ***Fig. 7A3***) produced similar responses, while NMDA (100 µM) did not induce currents, suggesting the expression of AMPA/Kainate but not NMDA receptors in spinal CSF-cNs. In current-clamp mode at -60 mV (DC current injection of -10 to -15 pA; (aCSF and intracellular solution A, ***Supplementary Tables 1 and 2***), glutamate application caused significant depolarization (+36±6.5 mV, ***Fig. 7D, E1***; N=4, n=21), with larger depolarizations in C- and T-CSF-cNs than L-CSF-cNs (***Fig. 7E1***). This depolarization led to AP firing in C- and T-CSF-cNs but not in L-CSF-cNs (***Fig. 7E2***), and was absent with DNQX blockade (***Fig. 7D***, red traces).

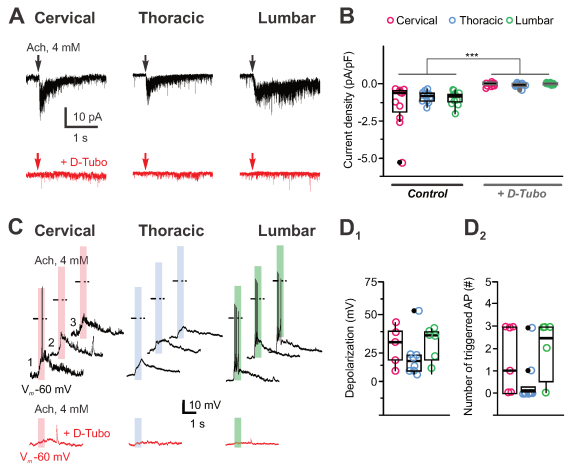


Figure 8 - Nicotinic cholinergic receptors modulate CSF-cN excitability. A) Representative whole-cell current traces recorded in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (Left to Right) at V_h -80 mV in response to pressure application of acetylcholine (ACh, 4 mM for 500 ms). The representative currents recorded in the presence of D-tubocurarine (D-Tubo, 100-200 µM; red traces) upon ACh applications are illustrated for each segment below the control traces. **B)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged amplitude of the ACh-mediated currents recorded at V_h -80 mV in control (Left) and in the presence of D-tubocurarine (Right) for the 3 segments of interest (-1.4±1.5, -0.9±0.4 and -0.9±0.5 pA.pF^{-1} in Control and -0.0±0.1, -0.1±0.1 and 0.0±0.1 pA.pF^{-1} in D-Tubo for the cervical (red, N=8, n=11), thoracic (blue, N=13, n=12) and lumbar (green, N=7, n=11) segments, respectively; ANOVA.lme: F=9.192, df=5 and 62, p(F)=1.39.10^{-6} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare Control and D-Tubo currents within each region and between the different regions; ** and *** for p<0.01 and <0.001, respectively). **C)** Representative traces of the membrane potential changes recorded at V_m -60 mV in current-clamp mode in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (Left to Right) in response to pressure application of ACh (4 mM, 500 ms). Bottom traces in red are membrane potential changes recorded upon ACh application in the presence of D-Tubo. Shaded colored bars indicates the duration of the agonist application and dashed lines the 0 mV voltage. **D1)** Summary box-and-whiskers plots of the averaged depolarization levels of the membrane potential in CSF-cNs from the cervical (red, N=4, n=5), thoracic (blue, N=3, n=7) and lumbar (green, N=4, n=9) in response to pressure application of ACh (Depolarization level: 27±15, 2-18±15 and 27±15 mV for C, T and L, respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=1.3411, d=2, p(χ^2)=0.5114 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=1.0; C vs. L, p=0.62 and T vs. L, p=0.62). **D2)** Summary box-and-whiskers plots of the average number of AP triggered in CSF-cNs from the cervical (red, N=4, n=5), thoracic (blue, N=3, n=7) and lumbar (green, N=4, n=9) in response to pressure application of ACh (AP number: 1.4±1.5, 0.5±1.1 and 1.8±1.5 for C, T and L, respectively; Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=3.1265, df=2, p(χ^2)=0.2095 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: C vs. T, p=0.36; C vs. L, p=0.77 and T vs. L, p=0.33). In **B** and **D**, Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

Finally, we tested for functional nicotinic cholinergic receptors (nACh-Rs; see Corns and colleagues[39]) expression in CSF-cNs from all spinal segments. Acetylcholine application (ACh, 4 mM for 500 ms; aCSF and intracellular solution D, ***Supplementary Tables 1 and 2***) elicits current with an average amplitude of -9.5±8.0 pA and current density of -1.2±0.1 pA.pF^{-1} (N=28, n=65; ***Fig. 8A, B***) and was blocked by 94±19% (N=28, n=34; ***Fig. 8A1***, red traces, ***8B***) with D-tubocurarine (D-Tubo, 100-200 µM). T-CSF-cNs exhibit the smallest current amplitude (***Fig. 8B***). In current-clamp recordings at -60 mV (DC current injection of -10 to -20 pA; aCSF and intracellular solution A, ***Supplementary Tables 1 and 2***), ACh application depolarized the membrane potential by +23±15 mV (N=10, n=19; ***Fig. 8C, D1***), triggering APs except in T-CSF-cNs, likely due to their lower nACh-R-mediated current (***Fig. 8C, D2***). This depolarization was absent in the presence of D-Tubocurarine (***Fig. 8C***, Bottom) In contrast to findings in juvenile rats[9], where CSF-cNs express functional P2X purinergic receptors, we were unable to replicate these results in mouse spinal CSF-cNs, as no ATP-γ-S-mediated current was detected.

Our data show that spinal CSF-cNs express functional $GABA_A$, glycine, AMPA/Kainate glutamatergic, and nACh receptors. Activation of AMPA/Kainate and nACh receptors modulates CSF-cN excitability and can trigger AP firing.

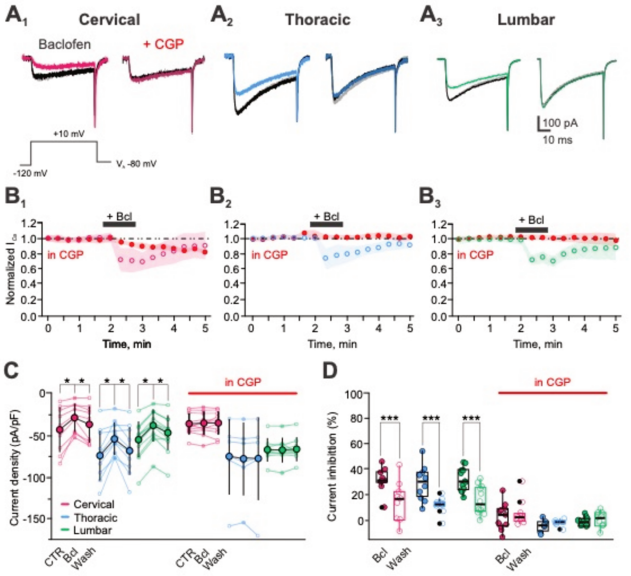


Figure 9 - Metabotropic GABA receptors are functional in CSF-cNs and inhibit calcium channels. A) Representative I_{Ca} traces elicited at the peak with a voltage step to +10 mV from V_h -80 mV and recorded in CSF-cNs from the cervical (**A1**, red), thoracic (**A2**, blue) and lumbar segments (**A3**, green) in control (black traces), in response to pressure application of baclofen alone (Bcl; Left, colored traces) or in the presence of CGP (+CGP 2 µM; Right, colored traces) and after agonist Wash (grey traces). **B)** Averaged time courses of I_{Ca} peak amplitude recorded in CSF-cNs from the cervical (red; N=4, n=9), thoracic (blue; N=3, n=10) and lumbar (green; N=4, n=12) segments (from Left to Right). Bcl was applied at 100 µM by pressure for 40 s, as indicated by the black bar (+Bcl) and data were normalized to the baseline/control period before agonist application. Colored open circle: in Bcl alone; Red full circle: in the presence of CGP and SD: colored shaded area around the mean. **C)** Summary plots for the average peak I_{Ca} density before (CTR), during Bcl application and after agonist washout (Wash) in the absence (Left) or presence (Right, in CGP, red bar) of CGP. Filled colored circles: mean±SD; open colored circles: single data point; the color code represents the regions of interest: cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green). Bcl alone: -42±27, -28±17 and -36±22 pA.pF^{-1}(N=2, n=9); -73±30, -53±20 and -67±29 pA.pF^{-1} (N=3, n=10) and -56±22, -39±19 and -48±21 pA.pF^{-1} (N=3, n=12) (Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=6.7051, df=2, p(χ^2)=0.035 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: CTR vs. Bcl, p=0.036; CTR vs. Wash, p=0.327 and Wash vs. Bcl, p=0.145). Bcl in CGP: -35±13, -34±14 and -34±14 pA.pF^{-1} (N=3, n=11); -74±45, -77±44 and -76±50 pA.pF^{-1} (N=3, n=16) and -66±14, -66±15 and -65±15 pA.pF^{-1} (N=3, n=9) (Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=0.026215, df=2, p(χ^2)=0.987 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: CTR vs. Bcl, CTR vs. Wash and Wash vs. Bcl, p=0.99, respectively). In the absence or presence of CGP, data are given in the order CTR, Bcl and Wash and for C, T and L, respectively. Note that amplitude for the I_{Ca} recorded in T-CSF-cNs are significantly larger (see **Fig. 5C**). **D)** Summary box-and-whiskers plots for the I_{Ca} inhibition induced before (Bcl) and after (Wash) agonist application and in the absence (Left) and presence (Right; in CGP, red bar) of CGP for the 3 regions of interest (C, red; T, blue and L, green). Bcl alone: 32±10 and 15±16% (N=2, n=9); 25±14 and 7±6% (N=3, n=10) and 32±9 and 16±11% (N=3, n=12) during and after Bcl application, respectively (Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=22.98, df=1, p(χ^2)=1.637.10^{-6} and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: Bcl vs. Wash, p=3.6.10^{-7}). Bcl in CGP: 3±11 and 3±13% (N=2, n=11); -5±5 and -2±3 % (N=3, n=6) and 0±4 and 1±6% (N=3, n=6) (Kruskal-Wallis rank sum test: χ^2=0.90566, df=1, p(χ^2)=0.3413 and a post hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction: Bcl vs. Wash, p=0.35). In the absence or presence of CGP, data are given in the order Bcl and Wash for C, T and L, respectively. Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Voltage-gated calcium channels modulation by metabotropic receptors

Spinal CSF-cNs express functional ionotropic receptors for the major neurotransmitters (GABA, Glutamate and ACh) and in the *medulla*, we indicated that they also express their metabotropic subtypes capable of regulating Ca_V activity[19]. We investigated whether spinal CSF-cNs also express functional metabotropic receptors, and if these receptors modulate Ca_V activity postsynaptically. To test this, we elicited I_{Ca} at V_h -80 mV by applying a V_{Step} to +10 mV for 100 ms to record peak I_{Ca} (Ca_V modulation solution and intracellular solution B, ***Supplementary Tables 1 and 2***). Before each step, a 50 ms hyperpolarizing step to -120 mV was used to fully deactivate all Ca^{2+} channel subtypes. This protocol was repeated every 20 seconds under control conditions before pressure-applying agonists for a given metabotropic receptor.

We first assessed whether $GABA_B$ receptor ($GABA_B$-Rs) activation modulates Ca_V in spinal CSF-cNs (***Fig. 9***). In control conditions, the peak Ca^{2+} current (I_{Ca}) had an average amplitude of -58±28 pA.pF^{-1} (N=8, n=31), which decreased to -40±21 pA.pF^{-1} (N=8, n=31) upon pressure application of Baclofen (Bcl, 100 µM, for 40 s) to selectively activate $GABA_B$-Rs (***Fig. 9A, C***). The Bcl-mediated inhibition of I_{Ca} over time is shown in ***Figure 9B*** for CSF-cNs across the spinal regions. On average, Bcl inhibited I_{Ca} by 30±11% (N=8, n=31; ***Fig. 9D, Left***). This inhibition was reversible, with currents recovering to -51±26 pA.pF^{-1} (N=8, n=31), reaching 87±12% of control values. Although T-CSF-cNs had the largest I_{Ca} amplitudes, $GABA_B$-R activation similarly inhibited currents across segments (***Fig. 9B-D***). In the presence of CGP54626A (2 µM, a $GABA_B$-R antagonist), I_{Ca} amplitude was –55±29 pA.pF^{-1} (N=8, n=26), and Bcl application failed to inhibit I_{Ca} (average amplitude: -55±30 pA.pF^{-1}, inhibition by 0±8%; N=8, n=26; ***Fig. 9D, Right***).

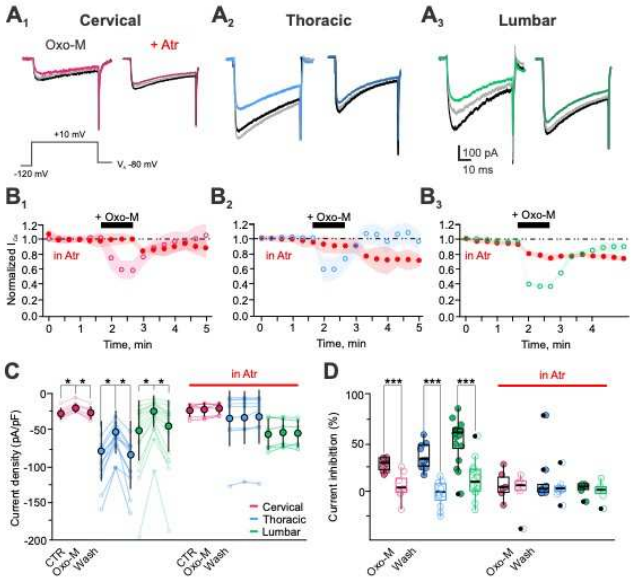


Figure 10 - In CSF-cNs muscarinic activation reversibly inhibits calcium channels. A) Representative I_{Ca} traces elicited at the peak with a voltage step to +10 mV from V_h -80 mV and recorded in CSF-cNs from the cervical (**A1**, red), thoracic (**A2**, blue) and lumbar (**A3**, green) in control (black traces), in response to pressure application of Oxotremorine-M alone (Oxo-M; Left, colored traces) or in the presence of atropine (+Atr 10 µM; Right, colored traces) and after agonist Wash (grey traces). **B)** Averaged time courses of I_{Ca} peak amplitude recorded in CSF-cNs from the cervical (red; N=2, n=6), thoracic (blue; N=4, n=11) and lumbar (green; N=3, n=16) segments (from Left to Right). Oxo-M was applied at 100 µM by pressure for 30 s, as indicated by the black bar (+ Oxo-M) and data were normalized to the baseline/control period before agonist application. Colored open circle: in Oxo-M alone; Red full circle: in the presence of Atr (in Atr) and SD: colored shaded area around the mean. **C)** Summary plots for the average peak I_{Ca} density before (CTR), during Oxo-M application and after agonist washout (Wash) in the absence (Left) or presence (Right, in Atr, red bar) of Atr. Filled colored circles: mean±SD; open colored circles: single data point; the color code represents the regions of interest: cervical (red; N=2, n=9, 6), thoracic (blue; N=4, n=11, 9) and lumbar (green; N=3, n=16, 6) in Oxo-M alone: -27±7, -20±5 and -26±8 pA.pF^{-1}; -78±40, -52±29 and -83±46 pA.pF^{-1} and -50±40, -24±21 and -44±34 pA.pF^{-1} (ANOVA.lme: F=6.23, df=8 and 99, p(F)=1.654.10^{-6} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare CTR, Oxo-M and Wash within a segment and between segments; *p<0.5). Oxo-M in Atr: -23±9, -22±9 and -21±8 pA.pF^{-1}; -34±38, -33±36 and -32±37 pA.pF^{-1} and -56±22, -54±19 and -55±19 pA.pF^{-1} (ANOVA.lme: F=1.736, df=8 and 54, p(F)=0.1112 and Tukey (EMM) post-hoc test to compare CTR, Oxo-M and Wash within a segment and between segments). In the absence or presence of Atr, data are given in the order CTR, Oxo-M and Wash and for C, T and L, respectively. **D)** Summary box-and-whiskers plots for I_{Ca} inhibition induced before (Oxo-M) and after (Wash) agonist application and in the absence (Left) and presence (Right; in Atr, red bar) of Atr for the 3 regions of interest (C, red; T, blue and L, green). Oxo-M alone: 27±7 and 5±13% (N=2, n=9); 35±13 and -41±14% (N=3, n=11) and 51±23 and 6±32% (N=3, n=16) (ANOVA.lme: F=17.74, df=5 and 66, p(F)= 3.422.10^{-9} and Tukey (EMM) post-hoc test to compare inhibition in Oxo-M and during Wash within a segment and between segments; *,** and *** p<0.05, 0.01 and <0.001). Oxo-M in Atr: 7±15 and 1±20% (N=2, n=6); 13±25 and 4±12% (N=3, n=9) and 3±7 and 0±11% (N=3, n=6) (ANOVA.lme: F=0.5616, df=5 and 36, p(F)= 0.7286 and Tukey (EMM) post-hoc test to compare inhibition in Oxo-M and during Wash within a segment and between segments. In the absence or presence of Atr, data are given in the order Oxo-M and Wash for C, T and L, respectively. Single data points for all the recorded cells at each level are presented with colored opened circle (same color code as above).

We next tested the effect of muscarinic cholinergic receptor (mACh-Rs) activation on I_{Ca} modulation. Using the same protocol as for $GABA_B$-Rs, Oxotremorine-M (Oxo-M, 100 µM, selective mACh-R agonist) was pressure-applied while recording Ca^{2+} peak currents in C-, T-, and L-CSF-cNs (***Fig. 10***). The average Ca^{2+} peak current was -53±39 pA.pF^{-1} (N=9, n=36) in control and decreased to -31±25 pA.pF^{-1} (N=9, n=36) after Oxo-M application (***Fig. 10A-C***). On average, Oxo-M inhibited Ca^{2+} currents by 40±20% (N=9, n=31; ***Fig. 10D, Left***). This inhibition was reversible, with Ca^{2+} currents recovering to -51±40 pA.pF^{-1} (N=9, n=36). The modulation was consistent across the CC axis (***Fig. 10B-D***). In the presence of atropine (Atr, 10 µM, a selective mACh-R antagonist), I_{Ca} amplitude was -38±30 pA.pF^{-1} (N=9, n=21), and Oxo-M) failed to inhibit Ca^{2+} currents (amplitiude of -36±28 pA.pF^{-1} and inhibition by 8±19%; N=9, n=21; ***Fig. 10D, Right***). We tested I_{Ca} modulation *via* metabotropic glutamatergic receptors (mGlu-Rs) by applying glutamate (100 µM, 40 s) but observed no reduction in current amplitude, indicating that Ca_V in CSF-cNs are not modulated by mGlu-R activation.

In summary, our results show that all tested spinal CSF-cNs express functional $GABA_B$- and mACh-Rs, whose activation inhibits post-synaptic Cav. $GABA_B$- and mACh-Rs activation induced a similar inhibition of I_{Ca} in all spinal CSF-cNs. Notably, we did not observe any modulation from mGlu-Rs, which have been shown to inhibit Ca^{2+} currents in other neuronal populations.

DISCUSSION

CSF-cNs have been extensively studied in zebrafish larvae[5,27–29,34,35,40], in lamprey[6,23,24], and, to some extent, in mice[7,8,12,13,19,20,22,32] and rat[9,11]. Our study provides an in-depth analysis of CSF-cN distribution and properties along the mouse SC from cervical to lumbar segments. We find that spinal CSF-cNs exhibit a conserved morphology, are densely distributed along the entire SC axis, and are primarily located ventrally. Functionally, they share intrinsic and chemosensory properties with mouse medullary CSF-cNs[12,22]. We show that spinal CSF-cNs express Na_V and K_V channels, LVA and HVA Ca^{2+} channels that are modulated by metabotropic GABAergic and muscarinic receptors but not by mGlu-Rs. They also express functional classical inhibitory and excitatory ionotropic synaptic receptors. Overall, spinal CSF-cNs represent a morphologically and functionally homogeneous sensory neuronal population.

Spinal CSF-cNs form a dense morphologically homogenous neuronal network

Our study confirms and extends prior reports[7,8,13,20], showing that in mice, CSF-cNs are distributed around the central canal (CC) along the entire rostro-caudal axis of the SC, exhibiting a characteristic and conserved morphology[5,7,9,11,32,33]. These neurons are either intra-ependymal, embedded within the ependymal layer, or subependymal, located below the CC, with a large dendrite extending into the CC lumen[7,9,11,33,33]. We show that CSF-cNs form a dense interconnected neuronal population, with approximately 10 to 20 cells per 10 µm of tissue depth across the entire CC axis. The SC length for a 6 weeks-old mouse and is ~3.75 cm (3750 µm) and based on our confocal images the CSF-cN density is ~14 cells/10 µm, then we estimate that ~52,500 CSF-cNs would be present in the whole SC. Bjugn and Gundersen[41] estimated that ~6.4 million neurons are found in the whole SC grey matter and therefore spinal CSF-cNs would only represent 0.9% of the total SC neuronal population. Spinal CSF-cNs are predominantly found in the ventral region, comprising about 60% of the total. This ventral localization contrasts with the lateral distribution observed in the medulla[7] (but see also Kútna and colleagues[32]) and suggest an anatomical reorganization along the medullo-spinal axis. We also confirm the presence of PKD2L1-expressing neurons (tdTomato$^+$) in more distal ventral locations along the SC[13]. While we noted differences in the localization and density of cervical CSF-cNs, no functional difference was associated with these anatomical descriptions (see below).

Reports from studies in lamprey suggest that intra- and subependymal CSF-cNs represent two distinct subpopulations (type I and II)[6]. This property is also observed in embryonic and postnatal mice, where dorsally located CSF-cNs express Olig2 (CSF-cNs') and latero-ventral ones express Nkx2.2 and Nkx6.1 (CSF-cNs")[8,30]. A similar organization is observed in zebrafish larvae[29]. It has been suggested that ventral CSF-cNs may have a 'more' immature neuronal phenotype, which aligns with findings in older mice showing that CSF-cNs largely conserve an immature profile (expression of Nkx2.2, Nkx6.1, doublecortin and low levels of the Neuronal Nuclear protein)[7,8,12,29-31]. Nevertheless in older mice unlike in zebrafish or postnatal mice, medullo-spinal CSF-cNs subpopulations do not cluster specifically around the CC[7,13,31], possibly due to developmental reorganization.

In zebrafish larvae, CSF-cNs have distinct projection paths and postsynaptic targets based on their dorso-ventral location, with ventral CSF-cNs showing longer projections, more branching, and a larger arborization area[29]. These neurons would have different postsynaptic targets[26,29,35,42]. Our study shows that CSF-cN axons project to the median fissure in the SC, forming long ascending fiber bundles in the lumbar to cervical segments. Nakamura and colleagues[14] further demonstrated that CSF-cNs primarily project rostrally with a number of collaterals that is the highest in the dorsal part of cervical and the ventral lumbar segments. This higher density of CSF-cN projection in cervical and lumbar segments could be related to specific local spinal network and the associated function. Using selective viral retrograde tracing from the lumbar region, it was confirmed in mice that CSF-cNs project to rostral segments and form functional synaptic contacts with more rostral CSF-cNs[15]. This observation would further

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

support the presence of two CSF-cN subpopulations in the SC. However, in mice CSF-cNs in ventral or dorsal regions could not be selectively labelled to demonstrate specific axonal projection paths *i.e.* postsynaptic targets relative to their localization around CC and rostro-caudal segments.

At the presynaptic level, it was shown that CSF-cNs project along the CC axis in an ascending manner to contact other CSF-cNs[15] and monosynaptic retrograde tracing indicates that CSF-cNs are mainly contacted by GABAergic neurons although glutamatergic presynaptic partners have also been identified[15]. Nevertheless, the precise phenotype and localization within the spinal tissue of these presynaptic partners remains unknown and further investigation are needed to resolve this issue.

There might be phenotypical and anatomical evidence pointing towards the existence of two CSF-cN subpopulations in mice that would receive inputs from and project to specific presynaptic and postsynaptic partners, respectively, to date, no experimental data are available to support this organization and demonstrate its functional relevance in the different medullo-spinal segments. One might hypothesize that these identified subpopulations may differ by their integration in local networks (*i.e.* specific pre- and postsynaptic partners) to serve a modulatory function specific to a given medullo-spinal segment (see below). This hypothesis, that is investigated at the neuroanatomical level by several research groups in the field, is the first fundamental step to allow the characterization of CSF-cN functional connectivity and to allow the better understanding of CSF-cN function in the CNS.

Along the spinal central canal, CSF-cNs exhibit similar cellular properties

CSF-cNs have been primarily studied at the behavioral level in zebrafish[5,27–29,34,35,40] and to a lesser extent at the cellular one in mouse medullo-spinal tissues[12,19,20,22,33,39,43]. Across these models, CSF-cNs share common properties, including high input resistance in the Giga-ohm range and small membrane capacitance, in agreement with their small soma size and limited dendritic branching. Our data show that spinal CSF-cNs exhibit conserved intrinsic properties along the rostro-caudal axis, from the *medulla* to the lumbar SC, with no significant functional differences across spinal segments.

PKD2L1, a hallmark of medullo-spinal CSF-cNs[5,12,22,23,28], is confirmed in our study as being expressed and functional along the SC. This non-selective cationic channel is modulated by extracellular pH and can trigger APs, influencing CSF-cN excitability[22]. We found that PKD2L1 is activated by alkaline pH and inhibited by acidic pH, while spinal CSF-cNs also respond to acidic pH via ASICs activation. Both mechanisms affect CSF-cN excitability, supporting a conserved sensory function along the CC. Although chemosensitivity has been demonstrated using non-physiological stimuli, further research is needed to identify the receptors that respond to chemical clues present in the CSF.

We observed that T- and C-CSF-cNs exhibit a depolarized RMP of approximately -50 mV, consistent with previous findings for medullar CSF-cNs[12,22]. In contrast, L-CSF-cNs display a more hyperpolarized RMP of around -65 mV, a result recently reported using the less invasive cell-attached recording technique[33]. This suggests that L-CSF-cNs may have different ionic conductances or reduced PKD2L1 activity, contributing to their hyperpolarized membrane potential. However, our study shows no differences in the expression of major K_V channels or PKD2L1 activity.

In postnatal mice[8] and juvenile rat[9], CSF-cNs were shown to form two major neuronal subpopulations present in different region around the CC, exhibiting different state of maturity and firing patterns (see above). In older mice, we have shown that two medullar CSF-cN population can be distinguished based on their maturity state and firing pattern[12,22] an observation confirmed for spinal CSF-cNs in this study. However, in older mice and in contrast to the data obtained in zebrafish or postnatal mice[8], medullo-spinal CSF-cNs are not regrouped in specific clusters but rather distributed around the CC. One can argue that during development and maturation CSF-cNs may redistribute around the CC or might undergo developmental process to change their phenotypical and functional properties. Dedicated developmental studies are required to address this specific point. We also observed that C- and L-CSF-cNs exhibit mainly a single spike firing pattern while thoracic neurons fire mostly tonically. This result suggests different properties and ionic conductances expression for CSF-cNs along the rostro-caudal axis. This might also depend on the specific network CSF-cNs are inserted in as well as to the exposure to given bioactive signals. Further, CSF-cNs are present in the so-called spinal niche in contact with the CSF and appear to interact with ependymal cells[10]. One could suggest that they might change functional properties as a function of the physio-pathological state as recently demonstrated following SC injury[10]. The observed difference could also be explained by the properties of the networks CSF-cNs are inserted in as cervical and lumbar segments contain motor networks mostly exhibiting phasic activities (locomotor output) while in thoracic regions autonomous centers would have a more sustained activity. However, one has to remain cautious in concluding about AP discharge activity when using whole-cell patch-clamp technique especially in neurons with small somatas. An answer to this point could be addressed *in vivo* using imaging approaches (calcium and voltage sensitive probes) or electrophysiological recordings.

Marichal and colleagues[9] demonstrated that in juvenile rats CSF-cNs express functional TTX-sensitive Na^+ and K^+ voltage-dependent channels, including delayed-rectifier (K_{DR}) and A-type (K_V 1) channels. Our findings align with these reports, showing that spinal CSF-cNs express Na_V channels at similar densities, mediating only transient and TTX-sensitive currents, as we did not observe any persistent or TTX-resistant Na^+ currents. Regarding K_V, all CSF-cNs exhibit large K^+ currents, characterized by a fast, transient phase followed by a persistent one. In agreement with previous reports[9], our pharmacological analysis reveals that spinal CSF-cNs express 4-AP-sensitive fast and transient currents along with TEA-sensitive persistent currents. This indicates that, as in juvenile rats[9], mouse spinal CSF-cNs express K_{DR} and K_V 1 channels at similar densities. These Na_V ad K_V channels likely underlie AP generation in spinal CSF-cNs. However, unlike Marichal and colleagues[9], we did not observe differences in current amplitude or density based on the firing pattern (single spike *vs.* tonic) of CSF-cNs. It is possible that modulation of these channels by intracellular signaling pathways, potentially activated by agents circulating in the CSF, could differentially modulate CSF-cN excitability. Such modulation might directly affect AP properties or indirectly influence them through PKD2L1, which could subsequently trigger AP firing.

In juvenile rats[9] and more recently in the mouse thoracic SC[20], CSF-cNs were shown to express functional Ca_V channels, including the T-type LVA subtype (Ca_V 3). We previously reported the absence of Ca_V 3 channels in mouse medullary CSF-cNs, where N-type channels (Ca_V 2.2, HVA) were highly expressed[19]. However, in mouse spinal CSF-cNs, we now demonstrate HVA expression along with LVA channel subtypes as indicated by the characteristic 'current shoulder' observed when neurons were held at -80 mV, but not -60 mV, prior to Ca_V activation. The presence of T-type Ca^{2+} channel might contribute to CSF-cN excitability as well as Ca^{2+} signaling[33], particularly through rebound burst firing after inhibitory synaptic inputs that hyperpolarize the cells, enabling T-type channel activation. We also found that thoracic CSF-cNs had the highest expression level of Ca_V channels, as reflected in the larger amplitude of I_{Ca} densities recorded in this region. This suggests that Ca^{2+} signaling is differentially regulated along the SC axis, with higher Ca_V density in thoracic segments.

We investigated the modulation of CSF-cN activity and Ca^{2+} signaling by examining Ca_V modulation via G protein-coupled receptors (GPCRs). Consistent with previous findings in the brainstem[19], we found that Ca_V channels in all spinal CSF-cNs are reversibly inhibited following $GABA_B$-R activation and also indicate a modulation by mACh-Rs. Both GABAergic and cholinergic GPCR activations led to similar levels of Ca_V inhibition, likely mediated through the classical Gβγ pathway[44]. Interestingly, we did not observe any Ca_V inhibition via glutamatergic GPCRs, suggesting that either these receptors are not expressed in CSF-cNs or they do not modulate Ca_V in this population. As reported for medullary CSF-cNs[19] and more recently in lumbar segments[33], we found no evidence for functional GIRK channels in spinal CSF-cNs, as $GABA_B$-R activation failed to induce outward currents in all recorded neurons.

Here, we confirm our previous findings in medullary CSF-cNs and show that PKD2L1 is expressed in CSF-cNs along the SC axis, exhibiting spontaneous activity and contributing to CSF-cN excitability[22]. Supporting their chemosensory role[22–24,27,28], we report that spinal CSF-cN excitability is modulated by extracellular acidification through activation of ASICs or by alkalinization *via* increased PKD2L1 channel open probability. CSF-cNs are capable of differentiating pH changes by responding to both increases and decreases in pH through specific ionic channels. It is likely that bioactive compounds in the CSF activate intracellular pathways, modulating CSF-cN activity either directly or indirectly through PKD2L1 or other receptors[10,36], though these compounds (such as neurotransmitters, metabolites, or neuropeptides) remain largely unidentified in mice. In zebrafish larvae, PKD2L1 integrates mechanical signals by detecting CSF flow and SC bending, interacting with the Reissner fiber[27,28]. A similar mechanosensitivity was suggested in mouse thoracic CSF-cNs, although strong mechanical stimuli were required to modulate their excitability[20]. We were not able to confirm this result, since in our hands pressure application of agonists or aCSF failed to induce changes in PKD2L1 activity. Identifying the precise sensory stimuli to which CSF-cNs respond remains a critical open question in mice and is essential for understanding their function.

CSF-cNs express classical synaptic receptors to be player of intraspinal networks

CSF-cNs might integrate circulating signals to sense the CNS homeostatic state. On the other hand, they appear to be integrated along the CC within intra-medullary and spinal networks, which are involved in regulating CNS activity and body physiology. Recent studies[14,15] have begun to explore CSF-cN connectivity, but limited information is still available regarding their presynaptic partners. In mice, medullary CSF-cNs express $GABA_A$, glycine, and glutamatergic receptors and primarily exhibit spontaneous GABAergic and

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

glycinergic synaptic activity at low frequencies (~1 Hz)[19] and both GABAergic and glutamatergic synaptic currents were evoked in medullary CSF-cNs[19]. However, the identity and localization of these presynaptic partners remain unknown. Our study shows that along the spinal CSF-cNs also express functional $GABA_A$, $GABA_B$, and glycine receptors, with large inhibitory currents elicited by exogenous agonists, suggesting robust inhibitory control. In the lumbar region, CSF-cNs were found to form two subpopulations, one depolarized and the other hyperpolarized by $GABA_A$ receptor activation[33]. Although this has not yet been confirmed in thoracic and cervical regions, it is plausible that similar subpopulations exist. Furthermore, we show that spinal CSF-cNs express AMPA/kainate-type glutamatergic receptors, whose exogenous activation induces small, slow-kinetic currents, consistent with reports from the medulla[19]. This contrasts with the large, fast AMPA currents seen in other neurons or those electrically evoked in medullary CSF-cNs. Additionally, CSF-cNs along the spinal CC axis express muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. Despite the small amplitude of these glutamatergic and cholinergic ionotropic currents, due to the high CSF-cN input resistance, receptor activation can induce significant depolarization and even trigger APs. Thus, activation of glutamatergic and cholinergic ionotropic receptors in CSF-cNs likely modulates their excitability. Within the spinal tissue numerous GABAergic, glutamatergic and cholinergic interneurons are present and shape spinal activity and outputs (somatic and autonomous motor systems). Recent reports[14,15] and our data indicate that CSF-cNs express the major synaptic receptors and appear receiving inputs from or project to spinal interneurons. Therefore, CSF-cNs might be key player in the SC circuitry in the mammals by bidirectionally interacting with different neuronal populations to regulate CNS activity.

Spontaneous synaptic activity has been observed in medullar CSF-cNs, but not in spinal CSF-cNs (our study), raising questions about the source of neurotransmitters and their release conditions in activating spinal CSF-cNs. Neurotransmitters might be released via synaptic contacts with glutamatergic, GABAergic, and cholinergic neurons within the SC, nevertheless, except for recurrent connectivity among CSF-cNs as source for GABA[14,15], functional contacts with CSF-cNs remain to be definitively demonstrated. Another potential origin could be paracrine release from neurons in the surrounding parenchyma, but this seems unlikely, as no baseline current changes were observed upon exposure to selective antagonists. However, one cannot rule out a loss or 'dilution' of such paracrine transmission in *in vitro* models where slice preparation is perfused with aCSF. Additionally, neurotransmitters have been shown to be present in the CSF and might activate CSF-cNs via their protrusions as suggested by a recent study indicating that CSF-cNs can be activated by κ-opiods released by neighboring cells[10]. Such a route of activation remains to be demonstrated. Nevertheless, there are growing anatomical evidence indicating that CSF-cNs appear integrated within specific spinal network and one major challenge in the coming years will be to further characterize the presynaptic partners of CSF-cNs and understand how they are activated. Gerstmann and colleagues[15] used monosynaptic retrograde neuronal tracing to show that L-CSF-cNs are primarily contacted by GABAergic neurons, with some glutamatergic input as well. Extending this type of characterization to the entire SC and testing functional connectivity *in vivo* will be crucial.

Concluding remarks

Altogether, the data collected in this study contribute to the better understanding CSF-cNs functions and suggest they represent a homogenous population present along the medullo-spinal axis that form an interconnected neuronal network to act as a coordinated sensory system. Nevertheless, the signals circulating in the CSF or present in the parenchyma that they respond to in physiological or pathological states remain to be fully identified. In physiological and pathological conditions, CSF-cNs would integrate sensory signals and in turn modulate, along the medullo-spinal axis, specific networks regulating or controlling either motor[14,15,26,34,35], autonomous or even regenerative functions[10].

As such, we propose that CS-cNs represent a novel actor of the interoceptive system capable of informing the CNS about its state and at the same time modulating specific physio-pathological outputs according to the segment there are located in.

The challenge in the coming years to demonstrate the role of CSF-cNs as interoceptors will be to characterize their connectivity, since, as Kolmer suggested it "*In many of these cases, precise anatomical knowledge was a prerequisite for physiological research*"[45].

MATERIAL AND METHODS

Animal ethics / Ethical approval

All experiments were conducted in conformity with the rules set by the *EC Council Directive* (2010/63/UE) and the French "*Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône* (DDPP13)" (Project License Nr: APAFIS 44331,2023071917567777 & 33336, 202110181902 2439. WN and License for the Use of Transgenic Animal Models Nr: DUO-5214). Protocols used agree with the rules set by the *Comité d'Ethique de Marseille* (CE71), our local Committee for Animal Care and Research. All animals were housed at constant temperature (21°C), in an enriched environment, under a standard 12h light-12h dark cycle, with food (pellet AO4, UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) and water provided *ad libitum*. Every precaution was taken to reduce to the minimal the number of animals used and minimize animal stress during housing and prior to experiments.

Animal models

We used wild type C57 Black6J (Charles River), PKD2L1-Cre ($Pkd2l1^{tm1(cre)}$; MGI ID: 6451758; a generous gift Emily Leman), and Choline Acetyl Transferase-Cre (ChAT-Cre; $Chat^{tm2(cre)Lowl}$; The Jackson Laboratory, MGI ID: 5475195; RRID:IMSR_JAX:006410) mice. PKD2L1- and ChAT-Cre animals were cross-breed with *flex*-tdTomato mice ($Gt(ROSA)26^{Sortm14\ (CAG-tdTomato)Hze}$, The Jackson Laboratory, MGI ID: 3809524; RRID:IMSR_JAX:007914) to generate PKD2L1-Cre (PKD-tdTomato)- and ChAT (ChAT-tdTomato)-Cre::*flex*-tdTomato mice and to selectively express the tdTomato fluorescent protein in the neuronal population of interest. Animal of either sex were used for histology as well as for electrophysiological recordings (3-6 Weeks old mice).

AAV injections

3–5-week-old mice were deeply anesthetized with isoflurane and placed in a stereotaxic frame. Meloxicam (5 $mg.Kg^{-1}$; Metacam, Boehringer Ingelheim),), a non-steroïdian anti-inflammatory compound, was administered intraperitoneally at least 30 minutes before surgery. Before making a skin incision, lidocaine (5 $mg.Kg^{-1}$; Lurocaïne, Vetoquinol) was administered subcutaneously under the zone to be incised. Craniotomy was performed using a motorized drill (78001 Microdrill, RWD life sciences) using drill bits diameters of 1 mm (WPI) in the following coordinates (AP 0.0, ML 1.0 mm; DV 1.6 mm) and 700 nL of AAV1-hSyn-EGFP viral particles at $2x10^{13}$ $GC.mL^{-1}$ were delivered using a Nanoject-III system (Drummond Scientifc Company) at a rate of 4 $nL.s^{-1}$.

Histology and imaging

Tissue collection for imaging and microscopy

Animals were injected 30 minutes prior to the procedure with Meloxicam (5 mg/Kg 30 min prior to procedure). Subsequently mice were anesthetized with intraperitoneal administration of 100 mg/Kg ketamine (Virbac) and 10 mg/Kg xylazine (Rompun, Bayer). Before skin incisions, the local antalgic lidocaine (5 mg/Kg; Lurocaïne, Vetoquinol) was injected subcutaneously. Afterwards, animals were transcardially perfused with 20 mL of ~37°C PBS 0.1M followed by 20 mL of ice-cold 4% paraformaldehyde (EMS, 15714S) in PBS 0.1M. SC were removed by laminectomy and the meninges were gently separated prior to overnight fixation at 4°C in the same fixative solution. For clearing experiments, brain plus SC were dissected and post-fixed overnight at 4°C in the same fixative solution under gentle shaking.

Routine histology and confocal microscopy

SC were cut in three segments corresponding to cervical, thoracic and lumbar regions. Afterwards, each one of the segments was included in a low melting point agarose block (4% in PBS). These blocks were glued to a vibratome (HM 650V, Microm, Thermo Scientific) stage, and coronal slices (50 µm) of SC were collected as floating sections. After incubation in 1.5µg/mL of DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) in 0.1M PBS (15 min, RT), sections were washed one last time in PBS and mounted in Vectashield (H-1900-10, Vector laboratories). Slides were kept at 4°C until use. 8-bits z-stacks images were acquired on a Zeiss LSM-700 Confocal scanning microscope equipped with ZEN 2009 software (Zeiss) using an EC Plan-Neofluar 10x, 0.30 NA objective, zoom=0.7x, or a Plan-Apochromat 20x, 0.8 NA objective, zoom=1x or 1.5x. Optical thickness was 4.45 µm for 10x acquisitions and 0.75 µm for 20x acquisitions.

Clearing and light sheet microscopy

For SC clearing, the vDISCO protocol[37,38] was followed with minimal modifications. Since SCs are highly myelinated tissues, to facilitate the access of nanobodies to CSF-cNs, a detergent-based delipidation step derived from the SHANEL[46] protocol was pre-applied before boosting the endogenous tdTomato signal. Briefly, brain plus SCs were incubated in a solution containing 10% wt/vol 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS, 1479.1 Carl Roth), 25% vol/vol N-Methyldiethanolamine (N-MDEA, 471828 Sigma-Aldrich), 0.05% Sodium Azide in Type 1 diH20 during 24 h at 37°C. After washing in 0.1M PBS (3 times; 2h/ea), samples were transferred to the permeabilization solution containing 0.5% vol/vol Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), 5mM Methyl-β-Cyclodextrin (332615, Sigma-Aldrich), 0.3M Glycine (G7126, Sigma-Aldrich), 1.5% vol/vol Normal Goat Serum (S-1000, Vector laboratories), 0.05% wt/vol Sodium Azide in 0.1M PBS, and incubated 48h at 37 °C. Subsequently, samples were transferred to permeabilization solution containing 1:600 vol/vol FluoTag anti-RFP Alexa647 (N0404-AF647-L, NanoTag Biotechnologies; RRID:IMSR_JAX:007914) and incubated during 5 days at 37 °C. Afterwards, samples were washed 3 times for 2h/ea, and once o/n in washing solution containing 0.5% vol/vol Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), 1.5% vol/vol Normal Goat Serum (S-1000, Vector laboratories) in 0.1M PBS at RT. Then, samples were washed 4 times (2h/ea) in 0.1M PBS at RT and the clearing process was immediately started. To preserve the SC in a linear disposition, samples were gently stretched and pinned with 0.15mm-diameter stainless steel entomology pins to a thin 4% wt/vol low melting agarose block before clearing. For clearing, samples were incubated at RT in the following gradient of Tetrahydrofuran (THF, 186562, Sigma-Aldrich) in Type 1 H20, 1h/ea step: 50% vol/vol THF, 70% vol/vol THF, 80% vol/vol THF, 100% vol/vol THF, and o/n in 100% THF. After dehydration, samples were incubated in Dichlorometane (DCM, 270997, Sigma-Aldrich) 1h at RT, and finally in Benzyl Alcohol-Benzyl Benzoate 1:2 vol/vol (BABB, 305197 and B6630 respectively, Sigma-Aldrich) at RT until transparency. All incubations were performed under gentle shaking on an orbital shaker. Prior to imaging, samples were transferred to Ethyl cinnamate (ECI, W243000, Sigma-Aldrich) since it was the medium used for imaging.

Light-Sheet microscopy imaging

16-bits image stacks were acquired using an Ultramicroscope Blaze (Miltenyi Biotec) equipped with the following lasers and filter sets [laser (emission/bandwidth)]: 445(480/40), 488(525/50), 515(540/30), 561(595/40), 639(680/30). For acquisition of the autofluorescence signal (to get the whole morphology of the brain plus SC) the 445(480/40) configuration was used; for acquisition of the boosted tdTomato signal, 639(680/30) configuration was used. The following objectives were used depending on the acquisition needs: 1.1x objective, 0.1 NA, ≤ 17mm WD; 4x Objective, 0.35 NA, ≤ 17mm WD; 12x Objective, 0.35 NA, ≤ 11mm WD. When Tile scans were obtained, a minimum of 20% overlapping was used to ensure a proper stitching of the tiles. Exposure time was 100-200 ms and laser power was adjusted depending on the intensity of the fluorescent signal (to prevent saturation) and on the magnification used. The light-sheet width was kept at 80% for low magnification imaging and at 20% for high magnification imaging. The z-Stacks shown in figure 1A have a voxel size of 8.21 x 8.21 x 7.09 µm (x, y, z respectively). The z-Stacks shown in figure 1 B, 1C and 1D have a voxel size of 1.625 x 1.625 x 2 µm (x, y, z respectively). The z-Stack shown in ***Supplementary Fig.2C, D*** has a voxel size of 0.65 x 0.65 x 2 µm (x, y, z respectively).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Image processing

Image analysis and rendering was performed on a workstation equipped with an 8 core Intel Xeon Silver 4215R processor (128Gb RAM) and a NVIDIA GeForce RTX 3090 (24 Gb) graphics card. FIJI[47] and Chimera X[48,49] were used for image processing, visualization, and rendering. Light-sheet image tiles were stitched with BigStitcher[50] plugin and further processed in FIJI. For Image rendering, a rolling ball background subtraction[51] was used over both channels with a radius size according to the particles of interest (Width of the SC in 445(480/40) and diameter of CSF-cNs axon bundles in 639(680/30)) in the different images. Then, the channel containing the specific signal (AF647) was subsequently treated with Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) in FIJI using a block-size larger (in pixels) than the objects to be preserved in order to compensate fluorescence discrepancies between CSF-cNs somas and thin processes. The background signal corresponding to the surface of the SC was removed by thresholding the autofluorescence signal and creating a reduced selection (in pixels) over the tdTomato (AF647) signal. The function "Clear Outside" was then used in FIJI over this selection to remove surface background fluorescence ensuring that objects in the specific channel (AF 647) were preserved. This strategy did not compromise the objects of interest since CSF-cNs and their axon bundles are distant from the surfaces of the SC. Finally, for image rendering, an "Unsharp Mask" filter was used with a radius of 0.9 pixels and a Mask Weight of 0.7. Rendering was performed in Chimera X by loading the previously generated .tiff stacks and adjusting graphical parameters. "Maximum Intensity Projection" and "3d projection mode" were used when displaying volumes. For low-magnifications large field of view images in ***Figure 2***, individual z-stacks were acquired as positions and stitched through Grid Collection Stitching plugin in FIJI[52] to avoid edge artifacts derived from Tile acquisition in ZEN software. For high-magnification images in ***Figure 2***, Images were processed with CLAHE in order to avoid fluorescence discrepancies between the somas and the thin axonal processes of CSF-cNs since linear adjustment will inevitably result in saturation at the somatic level.

Acute spinal cord slice preparation

Coronal SC slices (from lumbar to cervical segments) were prepared as previously described[19]. Briefly, wildtype or transgenic mice were injected with Meloxicam (5 m/Kg; 30 min prior to procedure). Subsequently, they were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine–xylazine mixture (100 and 15 mg/kg, respectively) and injected on the site of surgery with Lurocaine (5 m/kg), a local antalgic. Next, animals were transcardially perfused with an ice-cold (0-4°C), oxygenated (95% O_2/5% CO_2) and low calcium/high magnesium slicing solution containing (in mM): NaCl 75, $NaHCO_3$ 33, NaH_2PO_4 1.25, KCl 3, $CaCl_2$ 0.5, $MgSO_4$ 7, glucose 15, sucrose 58, ascorbic acid 2, Na-pyruvate 2, myo-Inositol 3 (pH 7.3-7.4 and osmolarity of 300-310 mosmole.kg^{-1}). Following laminectomy and SC dissection, lumbar to cervical SC slices (250 µm thick) were cut with a vibratome (Leica VT1000S) in ice-cold cutting solution saturated with 95% O_2-5% CO_2. Slices were subsequently transferred to a recovery chamber and incubated at 35° C for 15-20 minutes in oxygenated artificial CSF (aCSF) containing (in mM): NaCl 115, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 1.25, KCl 3, $CaCl_2$ 2, $MgSO_4$ 2, glucose 15, ascorbic acid 2, Na-pyruvate 2, myo-Inositol 3 (pH 7.3-7.4 and osmolarity of 300-310 mosmole.kg-1) and then kept at room temperature to recover for 1 h. After recovery, slices were transferred one by one to the recording chamber.

Electrophysiological recordings.

CSF-cN visualization and recording of their intrinsic properties

For recordings, lumbar, thoracic, or cervical SC acute slices were transferred in a recording chamber mounted on an upright microscope (Zeiss Axioskop 1FS or Scientifica SliceScope Pro 1000) equipped with infra-red differential interference contrast illumination (IR-DIC or IR-Oblic) and a p1 or p300 Ultra precisExcite LED epifluorescence system (CooLED). CSF-cNs around the CC were visualized using a computer controlled digital camera (HQ2 CoolSnap, Photometrics, SciCam, Scientifica or XX) under epifluorescence illumination (exc. 520 nm/em. 610 nm, tdTomato fluorescence) and/or IR illumination with a 40x or 60x objective. Whole-cell patch-clamp recordings were performed at room temperature (~20°C) in current- and/or voltage-clamp mode using a Axopatch 200A or Multiclamp 700B amplifiers (Molecular Devices Inc.). Patch pipettes (3-7 MΩ) were pulled from borosilicate glass capillaries (OD: 1,5 mm, ID: 0,86 mm; Harvard Apparatus) using the vertical PC-100 puller (Narishige International Ltd) and filled with an internal solution (see detail in ***Supplementary Table 1***). Signals were low-passed filtered at 2-10 kHz and digitized between 10-50 kHz using a Digidata 1322A, 1440A, and 1500B interface driven by pClamp 9, 10 or 11 software (Molecular Devices). Series resistance (10-20 MΩ) was monitored throughout the experiment and unstable recording were discontinued (increase by more than 25% from its initial value). For voltage-clamp recordings, the series resistance was compensated by 70-80%. The liquid junction potential was left uncorrected. SC slices were perfused with oxygenated, and pH controlled (95% O_2/5% CO_2) artificial CSF (aCSF, 2.5 mL/min) and the composition was adapted according to the experiments conducted (see ***Supplementary Tables 1 and 2***).

The recording of CSF-cNs was confirmed based on the characteristic morphology observed (small round soma close or within the ependymal layer and a large dendrite ending in the CC with a round protrusion) from the cytosolic tdTomato as well as from Alexa488 or 594 Hydrazide (added to the intracellular solution, 10 µM; Invitrogen) fluorescence. The presence of spontaneous PKD2L1 channel activity was monitored as a further control. Resting membrane potential (RMP) was determined under current-clamp mode (I=0) and CSF-cN spontaneous or induced (step of 200-500 ms, -20 pA with increments of 10 pA, 10-12 sweeps) AP discharge were recorded in current-clamp mode either at RMP or a membrane potential set at -60 mV (current injection of -10 to -15 pA). The intrinsic properties (membrane resistance, r_m; time constant, τ and membrane capacitance, c_m) were determined from the current response elicited using a 10 ms voltage step to -10 mV from a holding potential set at -70 mV in voltage-clamp mode. Note that to account for potential difference in ionic channel and receptor expression as a function cell size, all current amplitudes are expressed as current density (current/C_m).

The characterization of CSF-cN modulation by pH was conducted either in voltage-clamp mode (V_h -80 mV) or current-clamp mode at RMP using standard aCSF complemented with antagonists against $GABA_A$, glycine, and glutamate receptors and a K-based intracellular solution (in mM: KCl 130; NaCl 10; $CaCl_2$ 1; $MgCl_2$ 1, HEPES 10, phosphocreatine 10; Mg-ATP 4; pH 7.35adjusted with KOH and osmolarity of 290 mosmole.kg^{-1}). Acidic (pH 5 (mM): NaCl 139; KCl 3; $MgCl_2$ 2; $CaCl_2$ 2; glucose 15; HEPES, 10, Na-Citrate 16; pH adjusted with HCl 1N and 310 mosmole.Kg^{-1}) or alkaline (pH 9 (mM): NaCl 145; KCl 3; $MgCl_2$ 2; $CaCl_2$ 2; glucose 15; HEPES 10, TAPS 10; pH adjusted with NaOH 1M and 310 mosmole.Kg^{-1}) solutions were applied by pressure for 10 (pH5) or 30 s (pH 9) using a glass patch pipette positioned close to the recorded neurons (see above).

Recording and characterization of voltage-gated currents

The expression in CSF-cNs of voltage-gated sodium (Na^+; Na_V), potassium (K^+; K_V) and calcium (Ca^{2+}; Ca_V) channels was assessed in voltage-clamp mode and specific ionic conductances isolated by specifically adapting the composition of the aCSF and the intracellular solution (see ***Supplementary Tables 1 and 2***).

Potassium, sodium and Calcium voltage-dependent currents were elicited while recording neurons at a holding potential (V_h) of -80 mV or -60 mV and voltage steps (V_{Step}) protocols applied to selectively activate a given ionic conductance (see *Results and Figures* for more details). Briefly, sodium voltage-gated channels were activated from a V_h of -80 mV and V_{Step} applied from -80 to +60 mV in 10 mV increments applied for 100 ms. Potassium voltage-dependent currents were elicited from V_h -80 mV with a voltage pre-step to -100 mV for 50 ms to ensure full reactivation of fast inactivating currents (*i.e.* I_A) followed by 100 ms V_{Step} ranging from -100 to +60 mV in 10 mV increments before stepping back to -80 mV. To activate I_{Ca}, neurons were recorded either from V_h set at -60 mV with voltage steps applied for 100 ms (V_{Step}, -40 mV to +30 mV, 10 mV increments) or a voltage-ramp protocol from a V_h of -60 mV and -80 mV (V_h -60 mV: ramp from -60 to +30 mV over 50 ms and 1.8 mV/ms; V_h -80 mV: 50 ms pre-step to -120 mV followed by a ramp from -120 to + 30 mV over 100 ms and 1.5 mV/ms). At the end of each recording, the analyzed conductance was blocked using a specific blocker (see ***Supplementary Tables 1 and 2***) to confirm its nature.

Recording of ligand-gated-mediated currents

To assess for the expression of GABAergic ($GABA_A$-Rs), glycinergic (Gly-Rs), glutamatergic (Glu-Rs) and nicotinic cholinergic (nACh-Rs) ionotropic synaptic receptors, CSF-cNs (lumbar to cervical) were recorded at a V_h of -80 mV and selective agonists applied by pressure using a patch pipette (~1 µM tip diameter), positioned at ~50 µm from the recorded cells and connected to pressure application system (Toohey Company, Picospritzer or WPI). We tested application of γ-amino butyric acid (GABA, 1 mM for 30 ms), glycine (Gly, 1 mM for 100 ms), acetylcholine (ACh, 4 mM for 500 ms), Glutamate (Glu, 100 µM for 100-500 ms). The recordings were performed in the presence of a cocktail of selective antagonists to selectively target one specific ionotropic receptor (see text for more details). To identify the glutamatergic ionotropic receptor subtypes potentially expressed in CSF-cNs, we tested application of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA; 100 µM for 100-500 ms), Kainate and N-methyl-D-aspartate acid (NMDA; 100 µM for 100-500 ms). We also tested expression of ionotropic purinergic receptors using pressure application of ATP-γ-S (1 mM for 100-500 ms) but failed to elicit any current. To confirm the nature of the tested receptors, we applied at the end of the recordings the agonist in the presence of the selective antagonist (see ***Supplementary Tables 1 and 2***).

Modulation of voltage-gated calcium currents by G-Protein Coupled Receptors

To assess whether postsynaptic voltage-gated Ca^{2+}channels are modulated by G-Protein Coupled Receptors (GPCRs), CSF-cNs were recorded in voltage-clamp mode using a specific intracellular solution (see ***Table 1***). Slices were perfused with oxygenated aCSF supplemented with 0.5 µM TTX, and 20 mM TEA-Cl to selectively isolate Ca^{2+}currents. Ca^{2+}currents were elicited from a V_h of -80 mV at the peak amplitude with a 100 ms voltage step to +10 mV preceded by a pre-pulse to -120 mV for 50 ms. Currents were recorded every 20 s over a 5 min period before (Control, CTR), during (Drug) and after (Wash) pressure application of a given GPCR agonist: baclofen (Bcl: 100 µM, 40 s) for $GABA_B$ receptors ($GABA_B$-Rs), oxotremorine-M (OxoM; 100 µM, 50 s) or acetylcholine (ACh; 1 mM, 40 s) for muscarinic cholinergic receptors (mACh-Rs). We also tested I_{Ca} modulation by metabotropic glutamate receptors (mGlu-Rs) using glutamate pressure application (Glu; 100 µM or 1 mM, 50 s) but failed to elicit any modulation of I_{Ca}.

Reagents

Unless otherwise stated, all chemicals and drugs were purchased from Sigma-Aldrich. Selective blockers or antagonists were applied to block/inhibit channels and receptors as follows: Na_V with tetrodotoxin (TTX, T-550, Alomone labs); K_v with tetraethylammonium (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP); Ca_V with cadmium (Cd^{2+}, Ca_V blocker); $GABA_A$ receptors with gabazine (Gbz, SR 95531; Ascent Scientific) and Picrotoxine; glycine with strychnine (Stry, Ascent Scientific) ; glutamate receptors with 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (DNQX, Tocris Bioscience); nACh-Rs with D-tubocurarine (D-Tubo) Tocris Bioscience); $GABA_B$-Rs with CGP54626A (CGP, Novartis Pharma AG); mACh-Rs with atropine (Atr). For the agonists: oxotremorine-M (Oxo-M, Tocris Bioscience), ATP-γ-S (Abcam Biochemicals) Baclofen (Bcl, Tocris), acetylcholine (ACh, Tocris Bioscience), α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA, Tocris Bioscience), Kainate and N-methyl-D-aspartate acid (NMDA, Tocris Bioscience), Kainate (Tocris Bioscience) and N-methyl-d-aspartate acid (NMDA, Tocris Bioscience), γ-aminobutyric acid (GABA, Tocris Bioscience), glycine (Gly, Sigma-Aldrich). Experiments were also performed using pressure application of aCSF in the absence of drugs to test for the artefacts or mechanicals responses. However, no changes in the holding current were observed in any of those control experiments confirming that effects were drug or test solution specific. More details about the experimental procedures and solution used are available in ***Supplementary Tables 1 and 2***.

Processing, analysis and statistics.

Cell counting in Light sheet microscopy images

Segmentation and cell counting in light sheet microscopy images was performed with FIJI (see ***Supplementary Figure 4*** for graphical explanation and workflow). Briefly, a rolling ball background subtraction of exactly the size of CSF-cNs soma diameter was used (~10 pixels). Afterwards, a difference of Gaussian filter in 2D was used (Sigma1=1, Sigma2=2) using the CLIJ2[53] version of "Difference of Gaussian Filter". Then, the "H-Maxima Local Maximum detection" plugin (from the SCF-MPI-CBG plugins) was used using a Threshold=1 and a Minimum grey value distance between two local optima=5. To remove the H-Maxima ascribable to the ventral axon bundles of CSF-cNs, a 3D signal of the axon bundles was created over the original images using the CLIJ version of the 3D object counter[54] and these objects loaded into the 3D manager from the 3D ImageJ suite[55] in order to remove the maxima found within the axon bundles. Afterwards, the remaining particles were filtered by size (<100 voxels) and sphericity in pixel units (>0.5) using the 3D manager, since large and non-spherical particles were found to correspond to very low fluorescence signals. The remaining objects were then plotted on an image stack of the same dimensions than the source one and labeled (as 16 bits images) using "3D simple segmentation" of the 3D ImageJ suite. To visually check for correspondence between the labels and CSF-cNs somas the command "Reduce labels to centroids" from CLIJ2 (see ***Supplementary Figure***) was used. To validate this cell counting strategy, independent acquisitions were made with a 12x objective over a region already imaged with the 4x objective, cells were counted likewise and the total number of cells in this region compared between the two acquisition modes (see ***Supplementary Figure 1***).

Cell counting and distribution of CSF-cNs in confocal images

Five 3-6 weeks mice were used for CSF-cNs quantification in confocal slices. 10 fields of view (FOV) were acquired per animal and SC segment (total 30 FOV/animal). To count CSF-cNs in confocal coronal slices, z-stacks of 10-20 images were acquired. Counting was aided by custom FIJI macros available upon reasonable request. In brief, the user was prompted to click in the center of CSF-cNs on a Maximal Projection image while being able to navigate in the z-stack in order to accurately resolved closely packed cells. Once all the cells were marked, the user was asked to define manually the dorsal and ventral regions on the CC (ventral fiber bundles served as bona fide indicators of SC orientation). Then, the number of cells in each quadrant and their percentages were automatically calculated, and the cell densities/10 µm of SC were expressed as

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

(Total number of CSF-cNs in the field of view x 10)/(Number of optical slices x Voxel depth). Afterwards the DAPI signal was automatically thresholded to create the contour of the CC, and the Euclidean distance (in microns) of each cell to this contour was calculated using the "Exact Euclidean Distance Transform (3D)" function in FIJI[56] along with the pixel size of the image.

OriginPro was used for statistical analyses and generating plots. Normality was tested for all conditions. Since at least one group was always found to not meet the normality assumption in every possible comparison, Kruskal-Wallis ANOVA followed by paired post-hoc *Dunn* test was used for cells densities and distributions. Results were considered significant when *p<0.05, **p<0.01. For comparing distances of CSF-cNs to the CC at different SC levels, Kolmogorov–Smirnov test was used. Since K-S test is extremely powerful over large data sets, results were considered significant when *p<0.001.

Electrophysiology

Passive properties were determined, in voltage-clamp mode at -70 mV, from the current responses to a -10 mV hyperpolarization step (V_{Step}). Membrane resistance (R_m) was calculated from the amplitude of the sustained current at the end of the voltage step ($R_m=V_{Step}/I_m$). Membrane capacitance (C_m) was estimated as the ratio between the cell decay time constant (τ_m), obtained from the exponential fit of the current decay, divided by R_s ($C_m \sim \tau_m/R_s$). Resting membrane potential was determined in current-clamp mode at I=0 just after the whole-cell configuration was achieved. AP discharge pattern was analyzed from trains of APs elicited by the injection DC current pulses using the 'threshold detection' routine from Clampfit 9-11 with a threshold set at 0 mV. Voltage and current responses to agonists were analyzed using the Clampfit 9-11 suite (Molecular Devices Inc.) and Microsoft Excel 2018-2024.

PKD2L1 unitary current analysis was conducted using the WinEDR v4.0.3 software (Strathclyde University) where all points histograms for the close (baseline) and the open (PKD2L1 unitary currents) states were generated on 500 bins over 20-30 s recording periods to determine the respective mean current. Histogram were fitted with gaussian curves defined by the following equation:

$$y(x) = \sum_{i=1\ldots n} \frac{A_i}{\sqrt{2\ \pi\sigma_i^2}} . exp\left(-\frac{(X-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}\right)$$

Where A_i corresponds to the area under the curve, X the current amplitude, μ_i the mean current and σ_i to the standard deviation. PKD2L1 unitary current amplitudes were calculated as the difference between the mean current values (μ_i) of the open and close states. The open probability (NPo) was computed from the area under the curve of the open state histogram. Data were analyzed in control, during pH solution application and following wash and compared. For ASICs, the peak amplitude was measure after subtracting the baseline current. Modulation of the spiking properties following exposure to pH solution, were analyzed from the RMP and the instantaneous AP frequency determined using the Clampfit (Molecular Device, Inc.) threshold detection routine.

For Na_V and K_V, the current-voltage relationship for a given conductance was constructed for each cell by plotting the Na^+ and K^+ current peak amplitude recorded for a given $V_{Step,}$ and the mean IV curve generated either by pooling the data for all cells recorded from the 3 segments. Ca_V mediated currents were elicited from V_h -60 mV or -80 mV with the voltage-ramp against time protocol. The Ca_V IV-curve was subsequently obtained by converting the data as current against voltage. For each level, to compare recordings elicited from V_h -80 and -60 mV and distinguish HVA and LVA channel activation, the holding current was subtracted from individual converted IV-curves, and average curves calculated and subsequently normalized to the peak (current amplitude are presents as arbitrary unit, AU). In the current traces represented to illustrate specific voltage-dependent channel activation against voltage, remaining capacity transients were digitally subtracted.

All data are expressed as mean±SD or SEM, as specified, and N and n correspond to the number of animal and data sample, respectively. They are represented with boxplots and whisker using the Tukey's method as well as single points to illustrate data distribution. In boxplots with whisker, for each data set, the median (represented as thick line) and the 25th to the 75th percentiles (lower and upper limits of each bar, respectively) are calculated. Next, the interquartile distance (IQR) is determined as the difference between the 25th and 75th percentiles, and the whisker limits or "inner fences" calculated as the 75th percentile plus 1.5 times IQR and the 25th percentile minus 1.5 times IQR. All data with either higher or lower than the inner fences are represented as individual data points and considered as outliers (circles on the plots).

Statistical analyses were carried out using the R Studio 3.3.1 statistical software (R Studio Team, 2015) in the R environment. Since, data did not meet the normality assumption (Shapiro normality test), we used non-parametric statistical tests. For results where data are only compared for one variable, we used *Kruskal-Wallis* one-way ANOVA statistical analysis and provide χ^2, degree of freedom (number of parameters-1, df), R^2 and p(χ^2) values, for the analyzed factor. To compare data within a SC segment in different condition (control, CTR *vs.* application of agonists or blockers) as well as between segments along the rostro-caudal axis, the "*non-linear mixed effect*" (nlme version 3.1–128 package[57]) was used. The distinction between CSF-cNs response in the different experimental conditions is considered a *Condition* variable, while the distinction between the different neurons along the CC rostro-caudal axis represents the *Region* variable. On one hand, in one neuron for a given Region, its response in one Condition (control *vs.* drugs application or wash) is assumed dependent of the other recording Condition, and the variable represents a dependent factor. On the other hand, the same variables represent independent factors when considered as a function of the Region (cervical, thoracic and lumbar). Therefore, the statistical analyses required using a mixed effect model considering in a hierarchical way both dependent (*Condition*) and independent variables (*Region*) as well as the interaction between the variables. The null hypothesis was set as the absence of difference between the data among each group. The nlme model was tested by using an analysis of the variance (ANOVA) and we provide the F-statistic (F), the degree of freedom (df) and the p(F) values for the given fixed factor tested (*Condition*, *Region*). Wherever an interaction between the *Region* and *Condition* factors was statistically significant, we reported the p-value. We further conducted a post-hoc *Tukey (EMM) post-hoc test* to test for Contrasts, pairwise comparisons and interaction as a function of the *Region* and the *Condition*. Statistical differences were considered as significant for * $p < 0.05$.

REFERENCES

1. Kolmer, W. Über das Sagittalorgan, ein zentrales Sinnesorgan der Wirbeltiere, insbesondere beim Affen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **13**, 236–248 (1931).
2. Agduhr, E. Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **66**, 223–360 (1922).
3. Vigh, B. & Vigh-Teichmann, I. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc. Res. Tech* **41**, 57–83 (1998).
4. LaMotte, C. C. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *J. Comp. Neurol.* **258**, 527–541 (1987).
5. Djenoune, L. *et al.* Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates. *Front Neuroanat* **8**, 26 (2014).
6. Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., Hill, R. H. & Grillner, S. Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J. Comp. Neurol.* **522**, 1753–1768 (2014).
7. Orts-Del'Immagine, A. *et al.* Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PLoS ONE* **9**, e87748 (2014).
8. Petracca, Y. L. *et al.* The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord. *Development* **143**, 880–891 (2016).
9. Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O. & Russo, R. E. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in 'standby mode'? *J. Neurosci* **29**, 10010–10024 (2009).
10. Yue, W. W. S., Touhara, K. K., Toma, K., Duan, X. & Julius, D. Endogenous opioid signalling regulates spinal ependymal cell proliferation. *Nature* 1–8 (2024) doi:10.1038/s41586-024-07889-w.
11. Stoeckel, M.-E. *et al.* Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol* **457**, 159–174 (2003).
12. Orts-Del'Immagine, A. *et al.* Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *J. Physiol. (Lond.)* **590**, 3719–3741 (2012).
13. Jurčić, N., Michelle, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N. & Kastner, A. Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. *Eur J Neurosci* (2021) doi:10.1111/ejn.15342.
14. Nakamura, Y. *et al.* Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *Elife* **12**, e83108 (2023).
15. Gerstmann, K. *et al.* The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion. *Curr Biol* **32**, 2442-2453.e4 (2022).
16. Urrutia-Piñones, J., Morales-Moraga, C., Sanguinetti-González, N., Escobar, A. P. & Chiu, C. Q. Long-Range GABAergic Projections of Cortical Origin in Brain Function. *Front. Syst. Neurosci.* **16**, (2022).
17. Freund, T. F. & Antal, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **336**, 170–173 (1988).
18. De Zeeuw, C. I. *et al.* Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci* **21**, 391–400 (1998).
19. Jurčić, N. *et al.* GABAB receptors modulate Ca2+ but not G protein-gated inwardly rectifying K+ channels in cerebrospinal-fluid contacting neurones of mouse brainstem. *J. Physiol. (Lond.)* **597**, 631–651 (2019).
20. Johnson, E. *et al.* Graded spikes differentially signal neurotransmitter input in cerebrospinal fluid contacting neurons of the mouse spinal cord. *iScience* **26**, 105914 (2023).
21. Rosenberg, A. B. *et al.* Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science* **360**, 176–182 (2018).
22. Orts-Del'Immagine, A. *et al.* A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology* **101**, 549–565 (2016).
23. Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Wallén, P. & Grillner, S. The Spinal Cord Has an Intrinsic System for the Control of pH. *Curr. Biol.* **26**, 1346–1351 (2016).
24. Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P. & Grillner, S. Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat Commun* **7**, 10002 (2016).
25. Huang, A. L. *et al.* The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **442**, 934–938 (2006).
26. Böhm, U. L. *et al.* CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat Commun* **7**, 10866 (2016).
27. Orts-Del'Immagine, A. *et al.* Sensory Neurons Contacting the Cerebrospinal Fluid Require the Reissner Fiber to Detect Spinal Curvature In Vivo. *Curr. Biol.* **30**, 827-839.e4 (2020).
28. Sternberg, J. R. *et al.* Pkd2l1 is required for mechanoception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. *Nat Commun* **9**, 3804 (2018).
29. Djenoune, L. *et al.* The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes. *Sci Rep* **7**, 719 (2017).
30. Di Bella, D. J. *et al.* Ascl1 Balances Neuronal versus Ependymal Fate in the Spinal Cord Central Canal. *Cell Rep* **28**, 2264-2274.e3 (2019).
31. Orts-Del'Immagine, A. *et al.* Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Neuroscience* **343**, 39–54 (2017).
32. Kutna, V., Sevc, J., Gombalová, Z., Matiašová, A. & Daxnerová, Z. Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochem.* (2013) doi:10.1016/j.acthis.2013.08.004.
33. Riondel, P. *et al.* Evidence for Two Subpopulations of Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons with Opposite GABAergic Signaling in Adult Mouse Spinal Cord. *J Neurosci* **44**, e2289222024 (2024).
34. Fidelin, K. & Wyart, C. Inhibition and motor control in the developing zebrafish spinal cord. *Curr. Opin. Neurobiol.* **26**, 103–109 (2014).
35. Hubbard, J. M. *et al.* Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. *Curr. Biol.* **26**, 2841–2853 (2016).
36. Prendergast, A. E. *et al.* CSF-contacting neurons respond to Streptococcus pneumoniae and promote host survival during central nervous system infection. *Curr Biol* **33**, 940-956.e10 (2023).
37. Cai, R. *et al.* Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections. *Nat Neurosci* **22**, 317–327 (2019).
38. Cai, R. *et al.* Whole-mouse clearing and imaging at the cellular level with vDISCO. *Nat Protoc* **18**, 1197–1242 (2023).
39. Corns, L. F. *et al.* Cholinergic Enhancement of Cell Proliferation in the Postnatal Neurogenic Niche of the Mammalian Spinal Cord. *Stem Cells* **33**, 2864–2876 (2015).
40. Wyart, C. *et al.* Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* **461**, 407–410 (2009).
41. Bjugn, R., Haugland, H. K. & Flood, P. R. Preservation of the ependyma of the mouse spinal cord by various vascular perfusion procedures. *J. Neurosci. Methods* **23**, 49–55 (1988).
42. Fidelin, K. *et al.* State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons. *Current Biology* **25**, 1–13 (2015).
43. Deuchars, S. A., Milligan, C. J., Stornetta, R. L. & Deuchars, J. GABAergic neurons in the central region of the spinal cord: a novel substrate for sympathetic inhibition. *J Neurosci* **25**, 1063–1070 (2005).
44. Ikeda, S. R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255–258 (1996).
45. Kolmer, W. Das „Sagittalorgan" der Wirbeltiere. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **60**, 652–717 (1921).
46. Zhao, S. *et al.* Cellular and Molecular Probing of Intact Human Organs. *Cell* **180**, 796-812.e19 (2020).
47. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
48. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* **27**, 14–25 (2018).
49. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* **30**, 70–82 (2021).
50. Hörl, D. *et al.* BigStitcher: reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples. *Nat Methods* **16**, 870–874 (2019).
51. Sternberg. Biomedical Image Processing. *Computer* **16**, 22–34 (1983).
52. Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**, 1463–1465 (2009).
53. Haase, R. *et al.* CLIJ: GPU-accelerated image processing for everyone. *Nat Methods* **17**, 5–6 (2020).
54. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**, 213–232 (2006).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

55. Ollion, J., Cochennec, J., Loll, F., Escudé, C. & Boudier, T. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* **29**, 1840–1841 (2013).
56. Borgefors, G. On Digital Distance Transforms in Three Dimensions. *Computer Vision and Image Understanding* **64**, 368–376 (1996).
57. Linear Mixed-Effects Models: Basic Concepts and Examples. in *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS* (eds. Pinheiro, J. C. & Bates, D. M.) 3–56 (Springer, New York, NY, 2000). doi:10.1007/0-387-22747-4_1.

ADDITIONAL INFORMATION

Data availability statement

The data of this manuscript are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Authors contributions

All experiments were performed in laboratories at the 'Institut des Neurosciences de la Timone (INT)' of Aix-Marseille University and CNRS, UMR 7289. Conception and design of the work: CE, BE, JN, RFJ, SR & WN. Acquisition, analysis, and interpretation of data for the work: CE, BE, JN, RFJ, SR, MC & WN. Drafting the work or revisiting it critically for important intellectual content: CE, BE, JN, RFJ, SR, MC, JT & WN. All authors have read and approved the final version of this manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

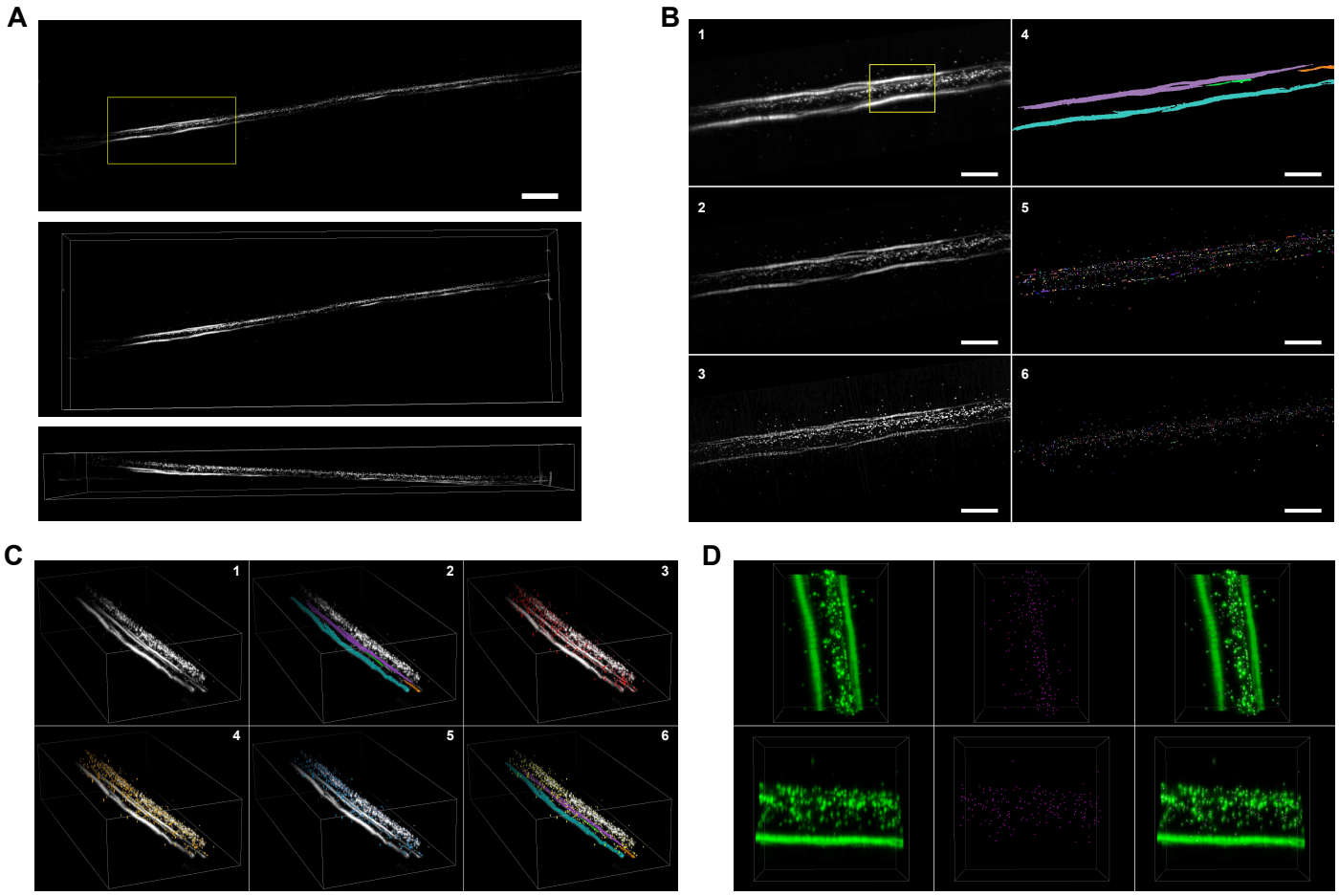
Funding

This research was supported by funding obtained from Aix-Marseille University (AMU), le Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS – INSB) et l'Agence National pour la Recherche (ANR-PRCI-MOTAC80C/A134/AN16HRJ NMF, ANR-PRC-MOTOX80C/213Z/AN20 HRJNMF & ANR-PRC-SYMPA80C/213Z/AN21 HRJNMF; WN).

Acknowledgments

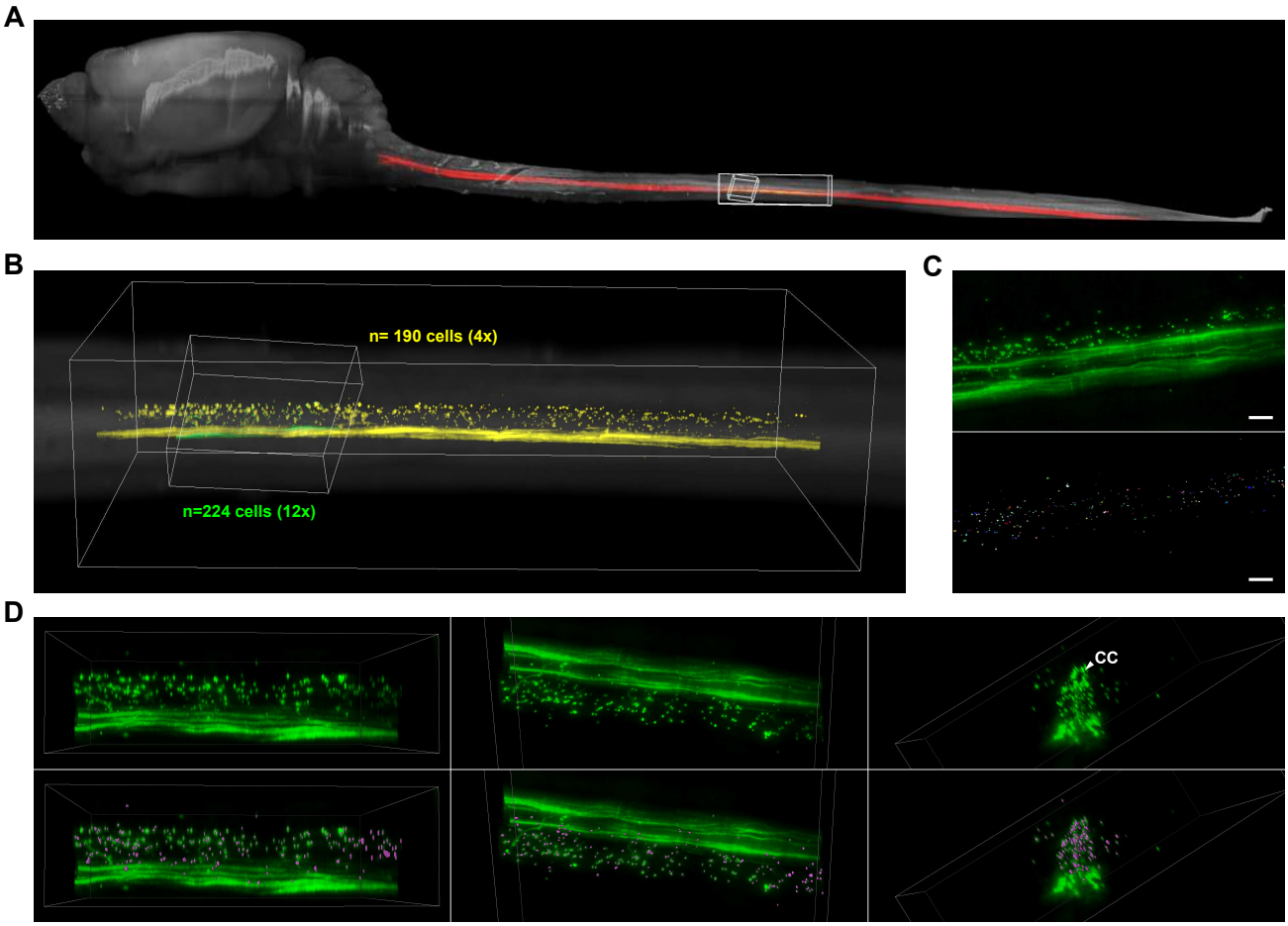
We acknowledge the 'Institut de Neurosciences de la Timone (INT)' technical facilities for their support in the study (*Neuro-Bio-Tools*: Molecular Biology (NeuroVir)/Histology (ConnectoVir) and *Photonic Neuroimaging* (INPHIM, light-sheet & confocal microscopy) as well as the *Mediterranean Primate Research Centre* (MPRC; UAR 2018), Animal facility).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



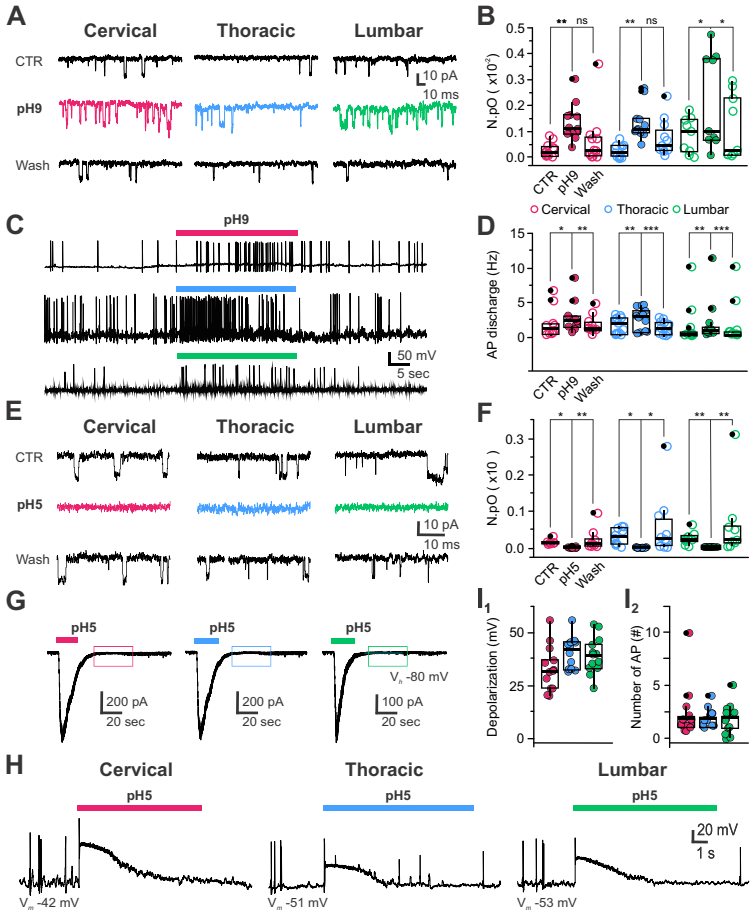
Supplementary Figure 1 - Comparison of the cell segmentation workflow and estimation of cell number at different light-sheet resolutions.
A) Full view corresponding to **Fig. 1A**, showing regions acquired at different light sheet resolutions (1x, full view; 4x, large box; 12x small box). **B)** Detailed view of the thoracic region boxed in **Supplementary Figure 1A**, showing the estimation for cell numbers at 4x (yellow) and 12x (green) in equivalent light-sheet microscopy stacks. Boxes sizes are in µm along the Rostro-caudal (RC) x Latero-Median (LM) x Dorso-Ventral (DV): 4x image (yellow) 3076.13 x 1784.25 x 818; 12x image (green) 692.90 x 703.95 x 211.25. **C)** Maximal projection of the region boxed in **Supplementary Figure 1B** in fluorescence (Top) and particle analysis of this same region (Bottom). Scale bar=50 µm. **D)** 3D views of the same region of the maximal projection depicted in **C** from lateral (**Left**), Top (**Middle**), and front views (**Right**). Fluorescence images are depicted in green (**Top**) and the result of the particle analysis workflow is merged in magenta (**Bottom**). CC: Central canal. Scale: see 1B.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



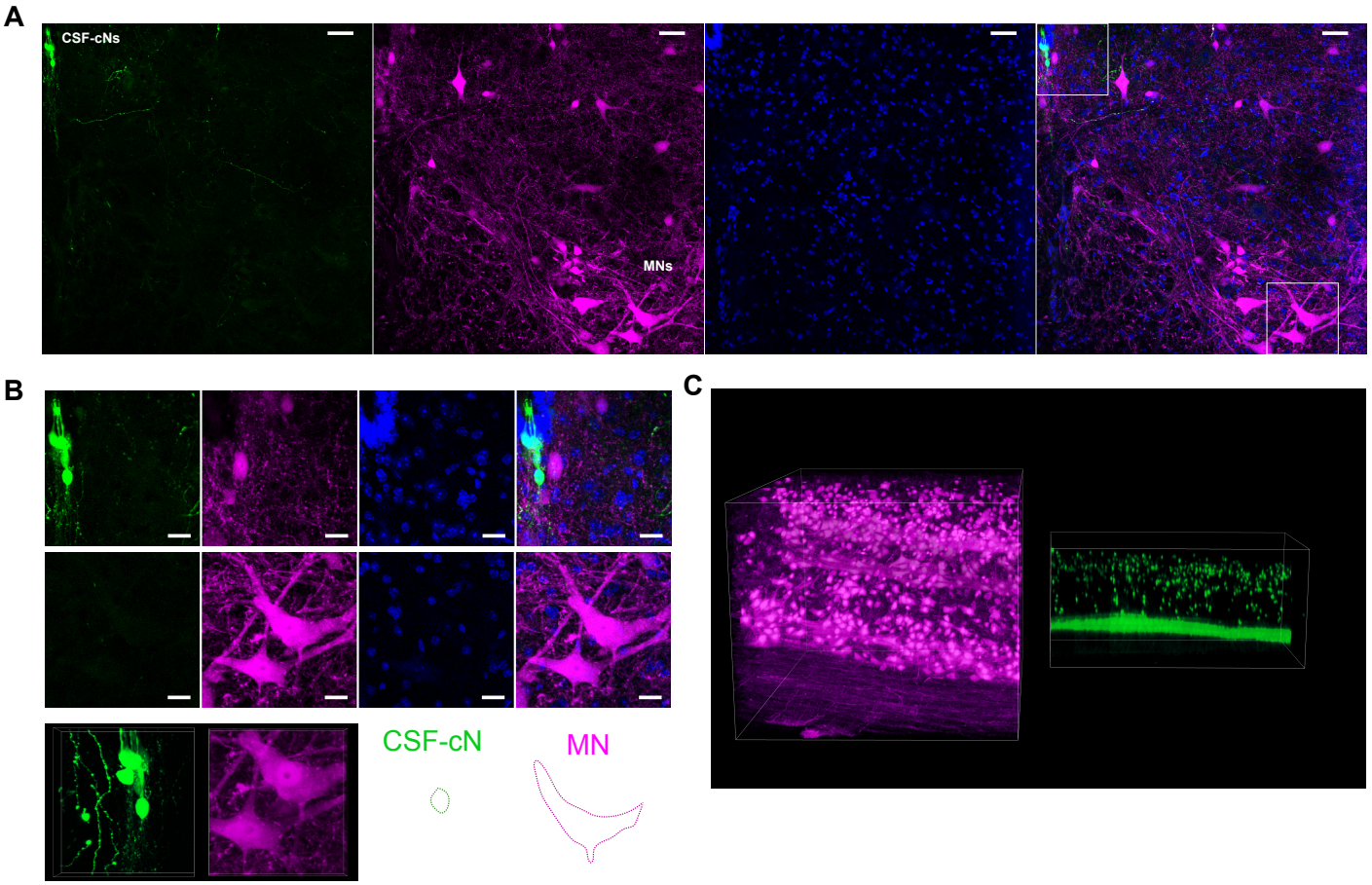
Supplementary Figure 2 - Size comparison of CSF-cNs to motor neurons using different microscopy techniques.
A) Confocal images of a large field of view showing CSF-cNs expressing EGFP (green) in a ChAT-tdTomato mouse ($ChAT^+$, in magenta and DAPI in blue). Expression of EGFP is triggered by intra cerebroventricular (ICV) injections of AAV1-hSyn-EGFP particles as previously described. Scale bar=50 µm. **B)** Detailed views of the field of view shown in A corresponding to the boxes depicted in the merge panel of A (Top). Scale bar=20 µm. **Bottom, Left.** 3D renderings of the neurons depicted in Top panels. **Bottom, Right**. silhouette of one CSF-cN (green) and one motor neuron (MN, magenta) for size comparison. **C)** Light-sheet microscopy images obtained at the highest possible magnification of the light-sheet microscope in ChAT-tdTomato animal showing MNs and other $ChAT^+$ neurons (magenta), and in a PKD-tdTomato animal showing CSF-cNs (green). Note that even at the highest magnification, the resolution of the light-sheet microscope combined to the DISCO clearing technique remains poor to resolve individual CSF-cN somatas. Boxes sizes are (RC x LM x DV in µm); for $ChAT^+$ neurons: 555 x 752 x 468; for CSF-cNs: 565 x 285 x 266 (in µm).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



Supplementary Figure 3 - CSF-cNs have chemosensory properties through modulation of PKD2L1 channels and ASICs.
A) Representative recordings in voltage-clamp mode at V_h -80 mV of PKD2L1 channel activity in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar regions (***Left to Right***) in control (Top), upon exposure to extracellular alkalinization (pH 9; colored traces; ***Middle***) and following washout (Wash, ***Bottom***).
B) Summary plots for the average channel open probability (NPo) in control (CTR), in pH 9 and after Wash for CSF-cNs from the cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green) segments (CTR: 0.027±0.027, 0.025±0.022 and 0.085±0.069; pH 9: 0.0.134±0.071, 0.135±0.068 and 0.215±0.183 and Wash: 0.064±0.100, 0.074±0.070 and 0.115±0.126 for C (N=3, n=12), T (N=6, n=11), and L Segments (N=4, n=9), respectively; Data are multiplied by 100 on the graph for a better visualization; *ANOVA.lme*: F=4.52, df=8 and 87, p(F)= 0.0001272 and *Tukey (EMM) post-hoc* test to compare CTR *vs.* pH 9, CTR *vs.* Wash and pH 9 *vs.* Wash within the different regions and between region; * and ** for p<0.05 and <0.01, respectively). **C)** Representative recordings in current-clamp mode at RMP (C: -59 mV; T: -47 mV and L: -41 mV) of CSF-cN AP firing activity in control, during pH 9 exposure (colored bars) from cervical, thoracic and lumbar segments (***Top to Bottom***). **D)** Summary plots for the average instantaneous AP frequency in control (CTR), in pH 9 and after Wash for CSF-cNs from the cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green) segments (CTR: 1.8±2.0, 1.5±1.2 and 1.4±2.9 Hz; pH 9: 2.8±2.4, 2.6±1.6 and 1.9±34.2 and Wash: 1.7±1.4, 1.2±0.9 and 1.5±3.1 Hz for C (N=4, n=10), T (N=5, n=13), and L Segments (N=3, n=12), respectively; *ANOVA.lme*: F=18.52, df=8 and 96, p(F)=$2.2.10^{-16}$ and *Tukey (EMM) post-hoc* test to compare CTR *vs.* pH 9, CTR *vs.* Wash and pH 9 *vs.* Wash within the different regions and between region; *, **, *** for p<0.05, <0.01 and <0.001, respectively). **E)** Representative recordings in voltage-clamp at V_h -80 mV of PKD2L1 channel activity in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar regions (***Left to Right***) in control (***Top***), upon exposure to extracellular acidification (pH 5; colored traces; ***Middle***) and following washout (Wash, ***Bottom***). **F)** Summary plots for the average channel open probability (NPo) in control (CTR), in pH 5 and after Wash for CSF-cNs from the cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green) segments (CTR: 0.015±0.006, 0.031±0.022 and 0.025±0.018; pH 5: 0.0.1±0.002, 0.001±0.001 and 0.000±0.000 and Wash: 0.022±0.030, 0.058±0.085 and 0.062±0.097 for C (N=3, n=9), T (N=4, n=10), and L Segments (N=3, n=9), respectively; Data are multiplied by 100 on the graph for a better visualization; *ANOVA.lme*: F=2.499, df=8 and 75, p(F)= 0.01835 and *Tukey (EMM) post-hoc* test to compare CTR *vs.* pH 5, CTR *vs.* Wash and CTR *vs.* Wash within the different regions and between region; * and ** for p<0.05 and <0.01, respectively). **G)** Representative current traces elicited in CSF-cNs recorded in voltage-clamp mode at V_h -80 mV in the cervical, thoracic and lumbar segments (***Left to Right***) upon pressure application of an acidic solution (pH 5, colored bars). The colored boxes during the persistent phases of the current illustrates the absence of PKD2L1 activity (see also ***Supplementary Figure 3E***). **H)** Representative voltage traces recorded in current-clamp mode at RMP (in CSF-cNs from the cervical, thoracic and lumbar segments (***Left to Right***) upon pressure application of an acidic solution (pH 5, colored bars). **I)** Summary plots for the average amplitude of the depolarization induced (**I_1**) and the number of AP triggered (**I_2**) following exposure to acidic pH in CSF-cNs from the cervical (red), thoracic (blue) and lumbar (green) segments. (**I_1**) Depolarization: +33±10 mV, +40±8 mV and +39±9 mV for cervical (N=5, n=13), thoracic (N=3, n=12) and lumbar segments (N=3 n=13) (*Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=4.9908, df=2, p(χ^2)= 0.08246 and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: C *vs.* T, p=0.12; C *vs.* L, p=0.12 and T *vs.* L, p=0.81). (I_2) Number of PA: 2.4±2.5, 1.8±0.9 mV and +1.8±1.4 mV for cervical (N=5 n=13), thoracic (N=3, n=12) and lumbar segments (N=3 n=13); *Kruskal-Wallis rank sum test*: χ^2=0.074495, df=2, p(χ^2)= 0.9634 and a posthoc *Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test* with continuity correction: C *vs.* T; C *vs.* L and T *vs.* L, p=0.98).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



Supplementary Figure 4 - Workflow for cell segmentation and estimation of cell number

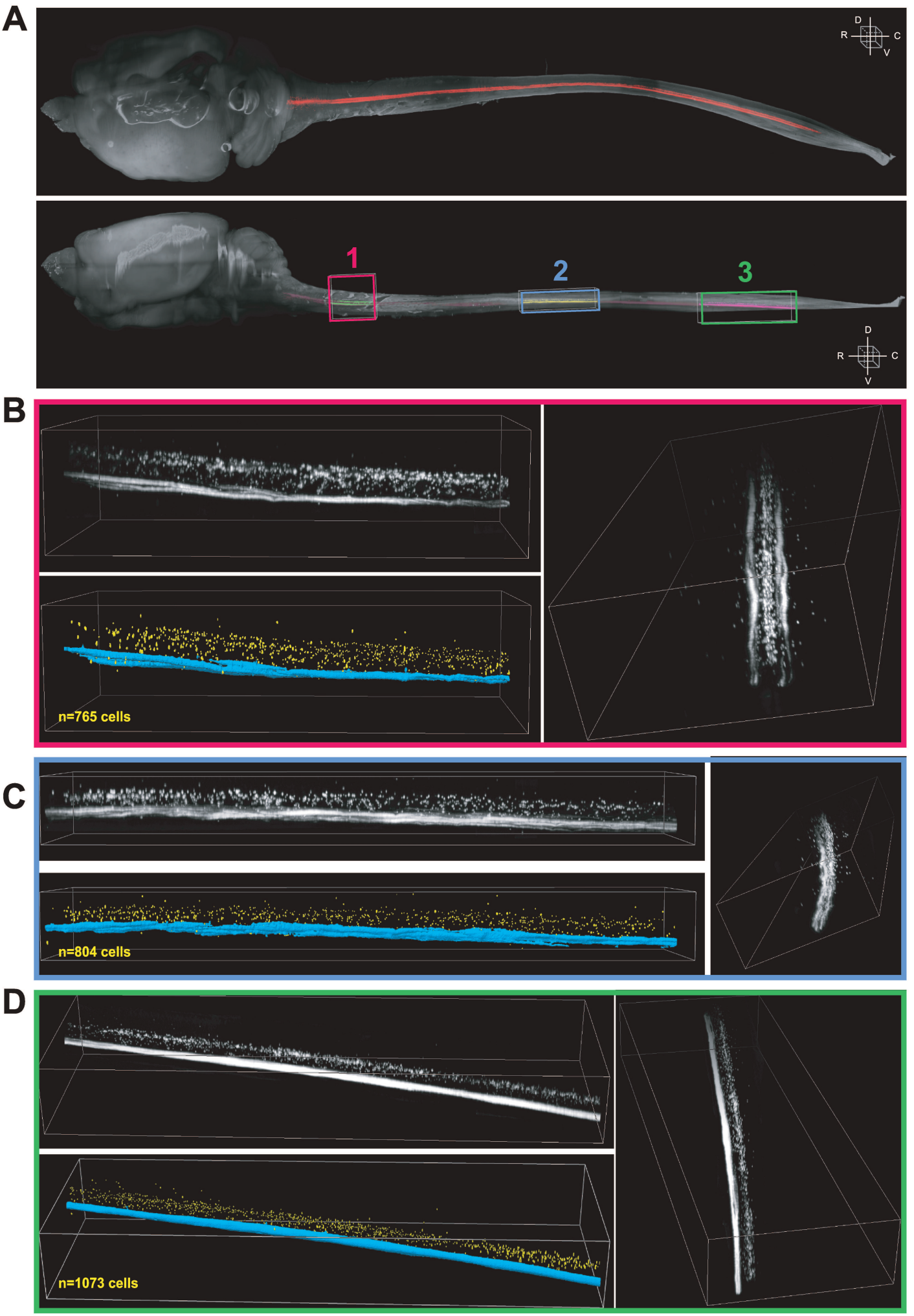
A) ***Top***. Maxima*l* projection of a segment corresponding to the cervical SC of a PKD-tdTomato mouse. The inset box corresponds to the region depicted in ***Fig. 1B*** and ***Supplementary Figure 1B***. ***Middle***, dorsal view of the 3D rendering for the region depicted in the Top panel. ***Bottom***. lateral view of the 3D rendering of the region depicted in the Top panel. Scale bar=500 µm. Dimensions of the box are (RC x LM x DV in µm) 7484.75 x 2632.50 x 841.75.

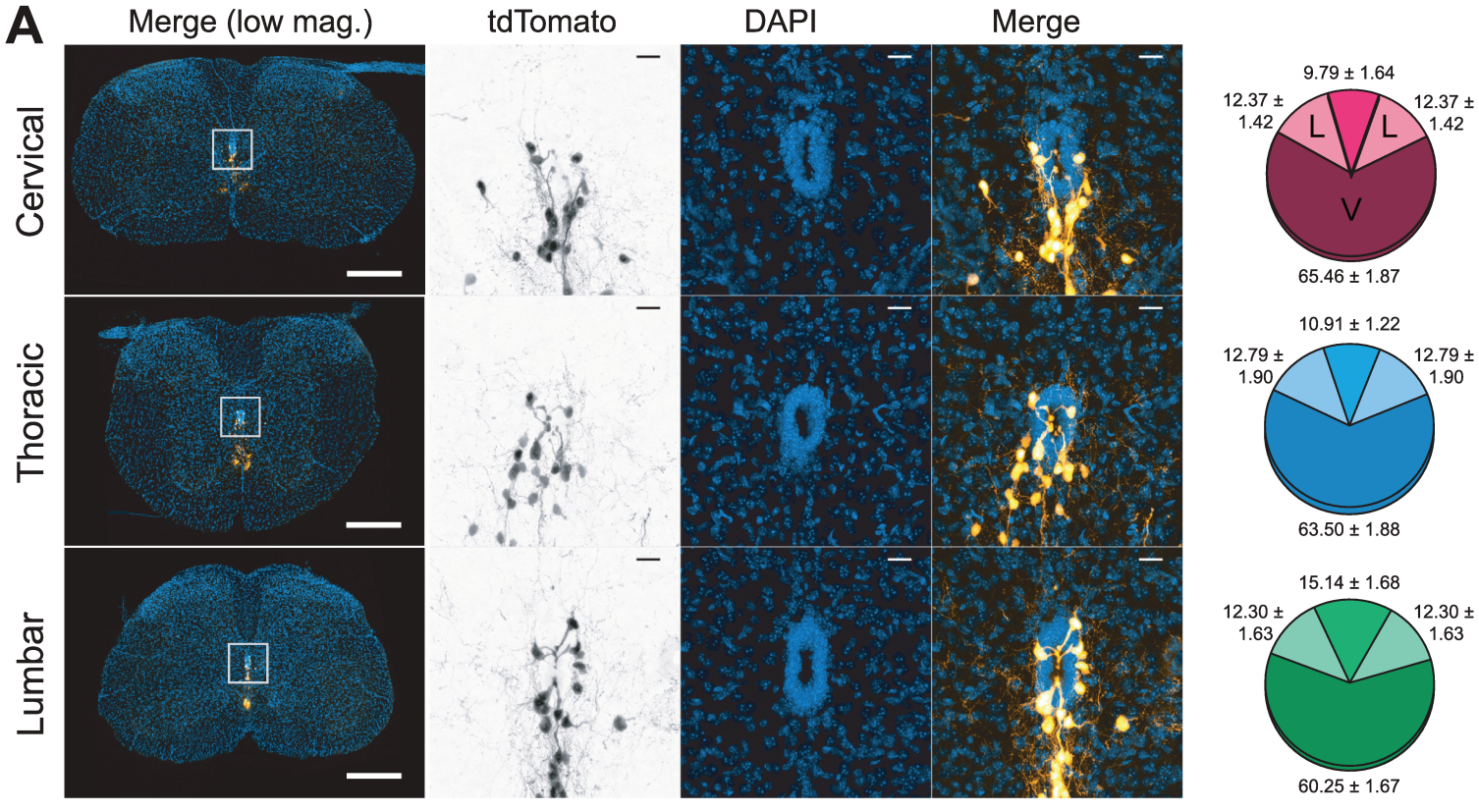
B) Graphic workflow for image segmentation of the inset in ***Supplementary Figure 1A*** (see methods). 1) Maximal projection of the inset shown in ***Supplementary Figure 1A***. 2) After rolling ball background subtraction r=10 pixels. 3) After Difference of Gaussians filter (sigma1=1, sigma2=2). 4) 3D objects corresponding to the ventromedial axon bundles of CSF-cNs. 5) H-Maxima obtained from the image depicted in 3). 6) H-Remaining particles after removing H-Maxima belonging to ventromedial axon bundles and filtering by volume and sphericity. Scale bar=200 µm.

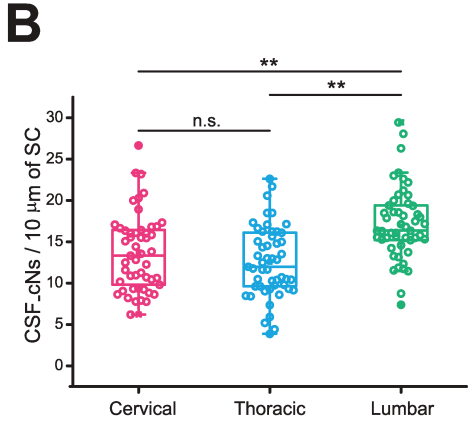
C) 3D representations of the views depicted in ***Supplementary Figure 1B***. 1) Corresponds to ***Supplementary Figure 1B,*** 1. 2) Corresponds to ***Supplementary Figure 1B***, 4. 3) corresponds to ***Supplementary Figure 1B, 5.*** 4) is ***Supplementary Figure 1B, 5*** after removing particles located in the ventral axon bundles. 5) After filtering by volume. 6) Merge of the final result of particle quantification and segmentation of the axon bundles. Dimensions of the box are (RC x LM x DV in µm) 1764.75 x 913.25 x 463.00.

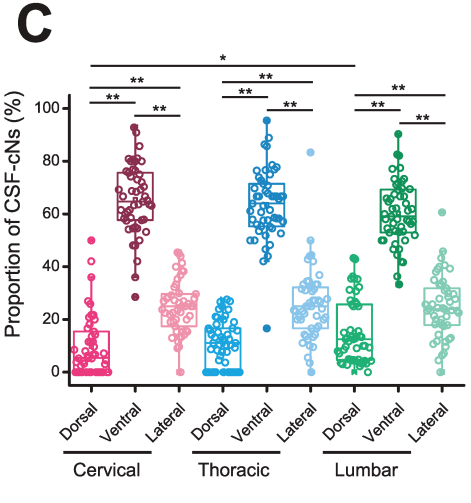
D) Inset of the box depicted in ***Supplementary Fig. 1B*** in dorsal (***Top***) and lateral (***Bottom***) views. ***Left.*** Fluorescence image of CSF-cNs. ***Middle.*** Centroids corresponding to particle analysis of this specific region. ***Right***. Merge of the centroids from particle analysis to the fluorescence microscopy images.

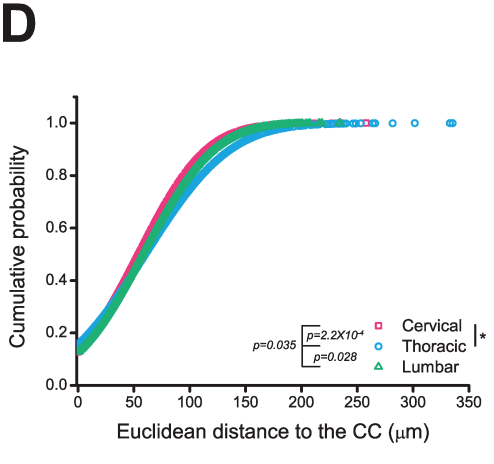
preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



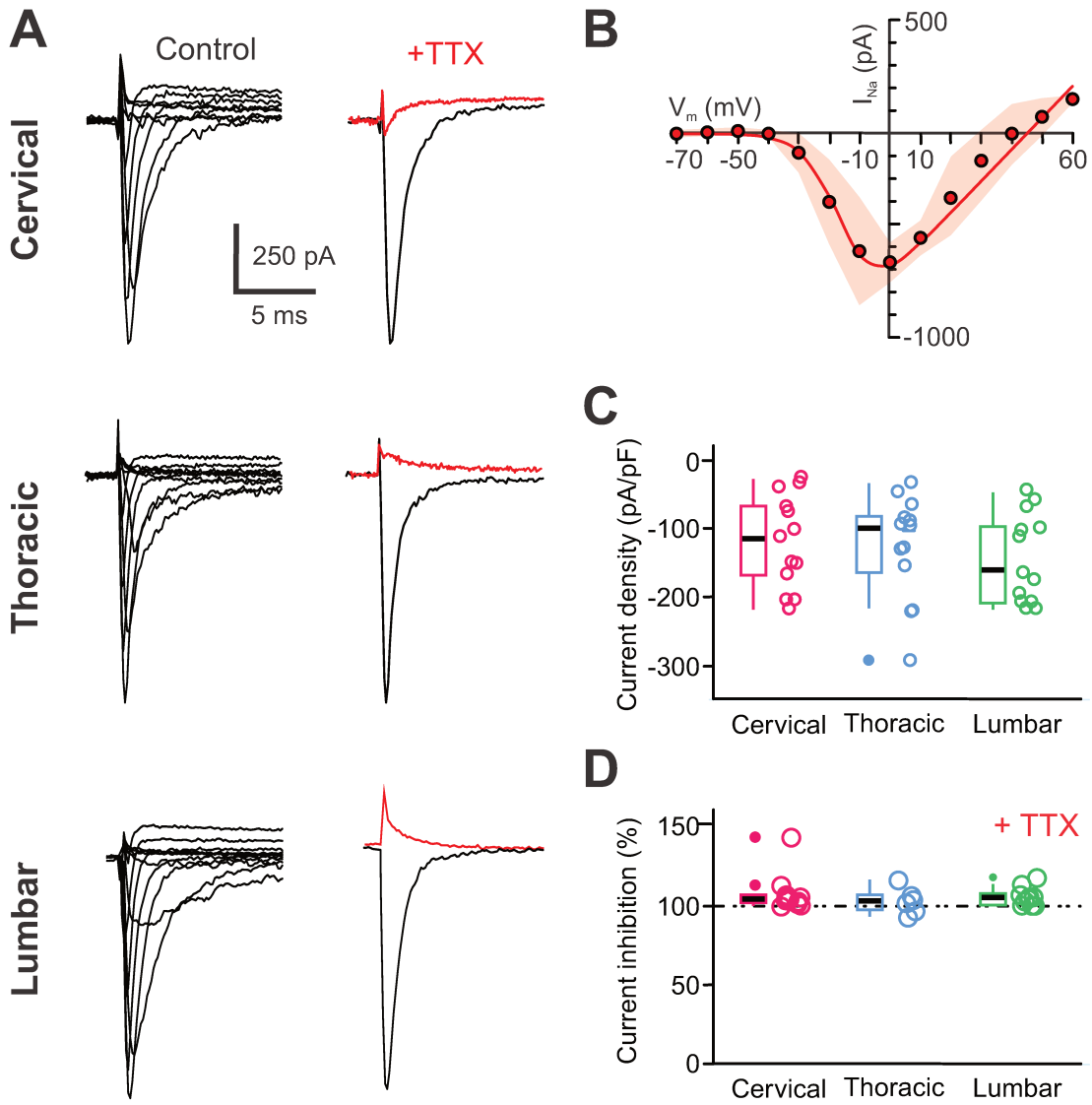

A
Merge (low mag.)
tdTomato
DAPI
Merge
Cervical
Thoracic
Lumbar
9.79 ± 1.64
12.37 ± 1.42
12.37 ± 1.42
L
L
V
65.46 ± 1.87
10.91 ± 1.22
12.79 ± 1.90
12.79 ± 1.90
63.50 ± 1.88
15.14 ± 1.68
12.30 ± 1.63
12.30 ± 1.63
60.25 ± 1.67


B
CSF-cNs / 10 µm of SC
n.s.
**
**
Cervical
Thoracic
Lumbar

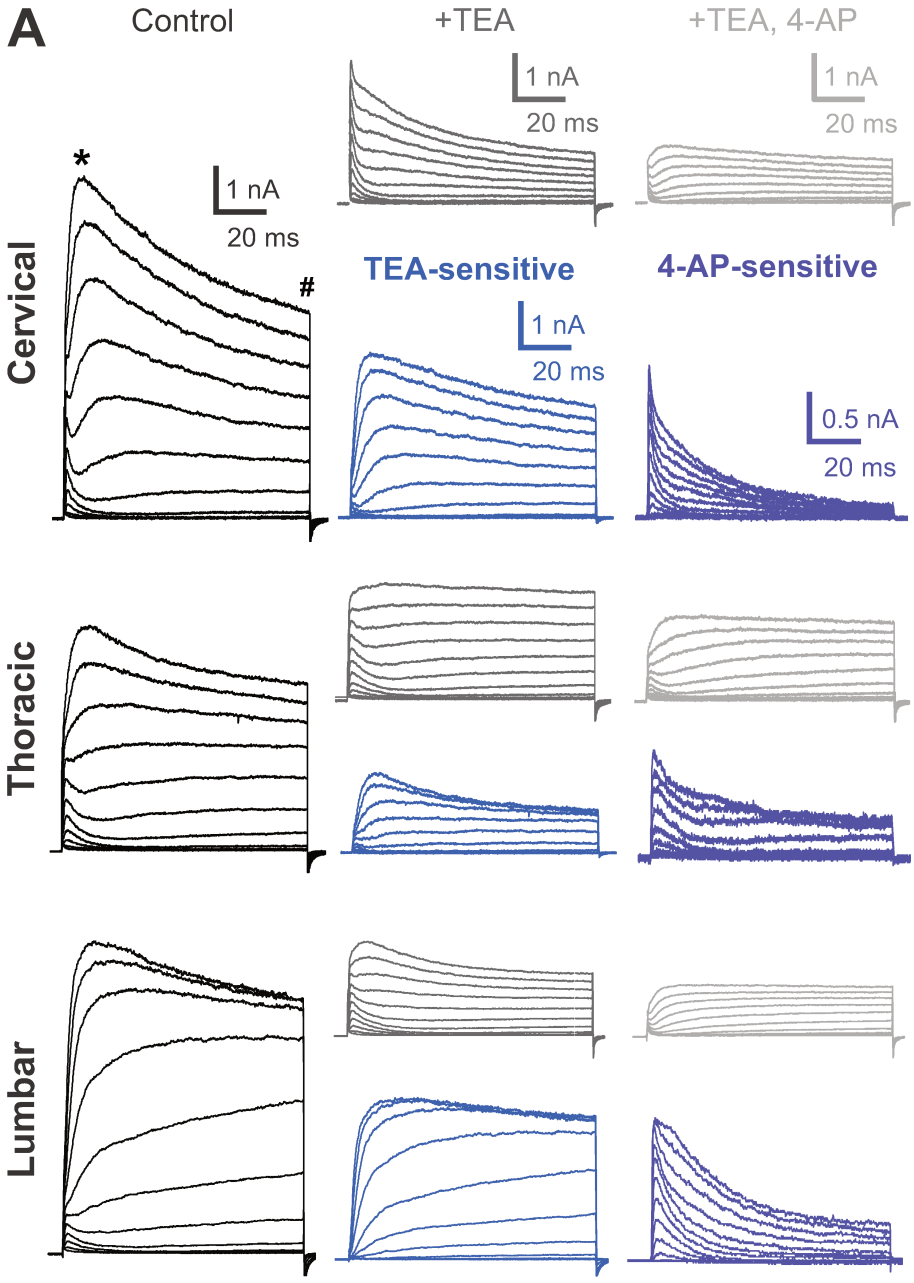

C
Proportion of CSF-cNs (%)
*
**
Dorsal
Ventral
Lateral
Cervical
Thoracic
Lumbar

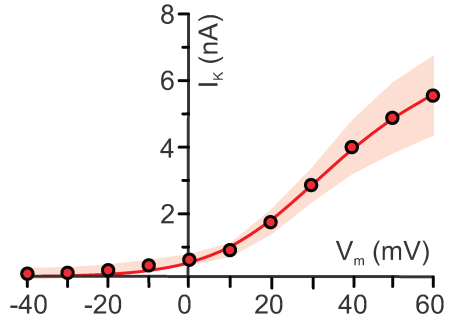

D
Cumulative probability
Euclidean distance to the CC (µm)
p=0.035
p=2.2X10-4
p=0.028
Cervical
Thoracic
Lumbar
*

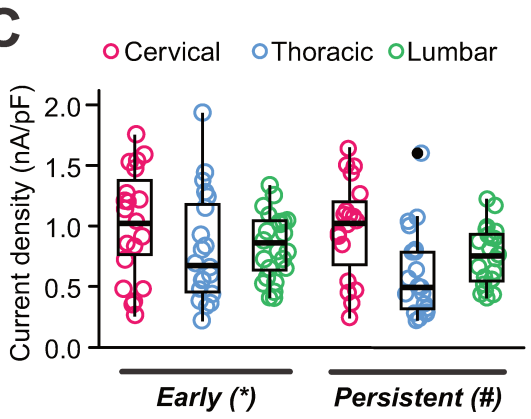
bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

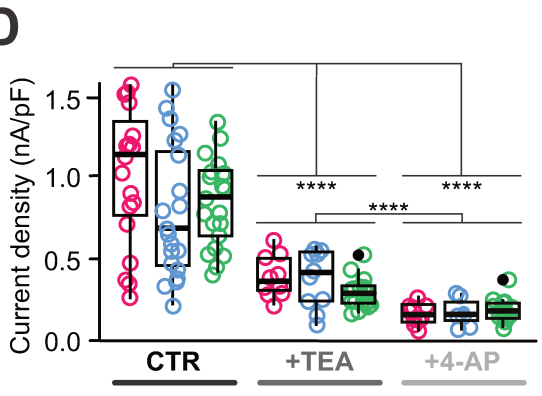


bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

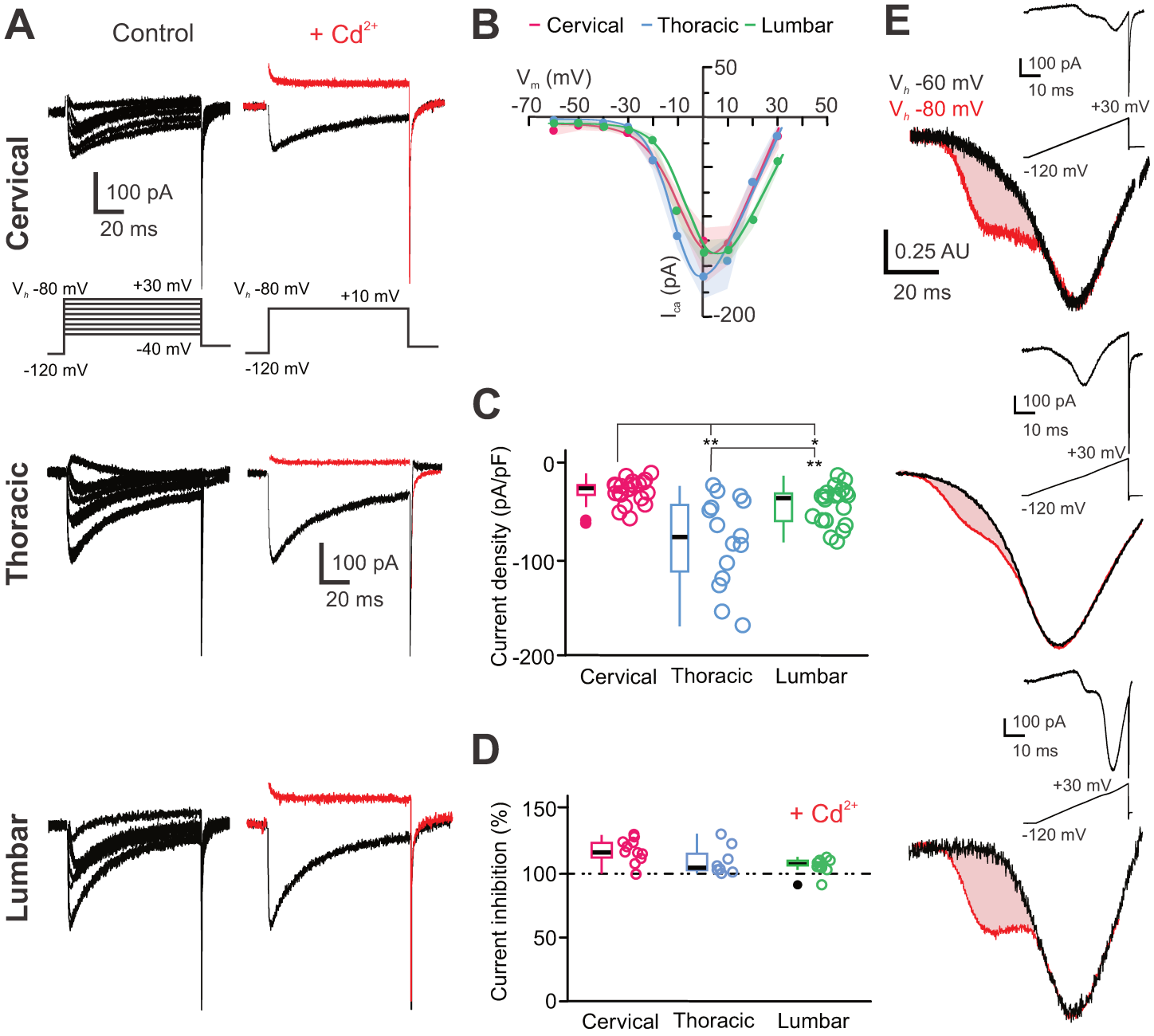




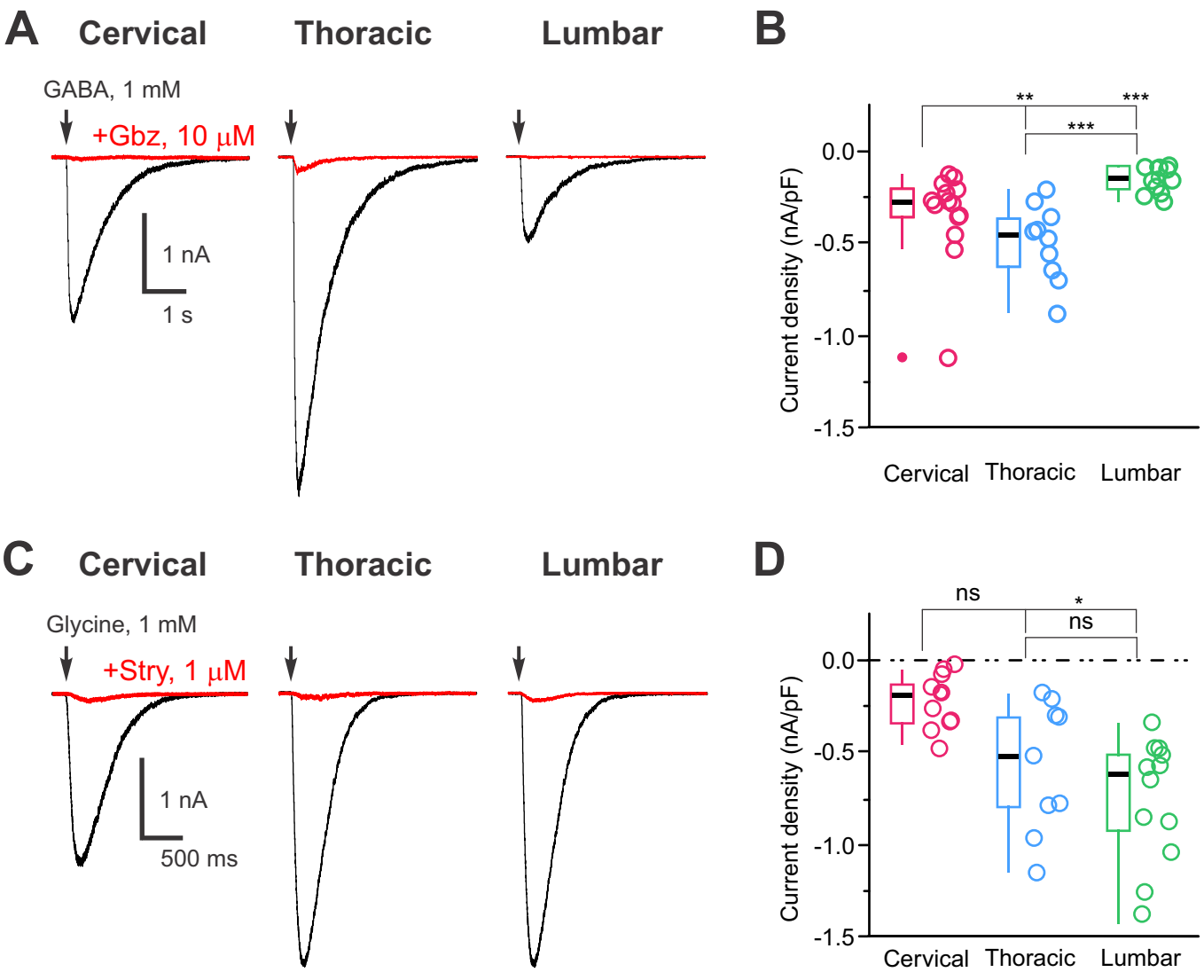




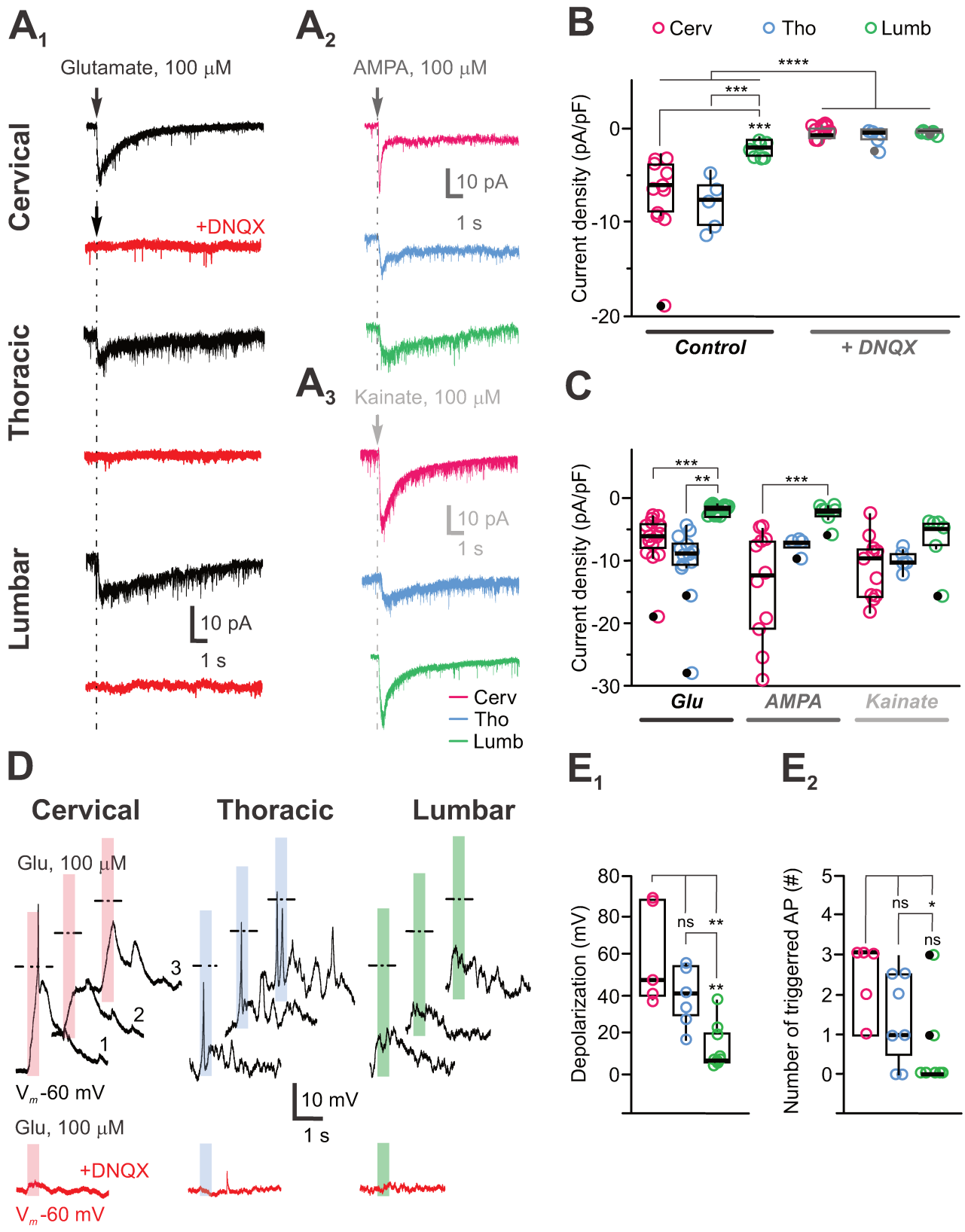
bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



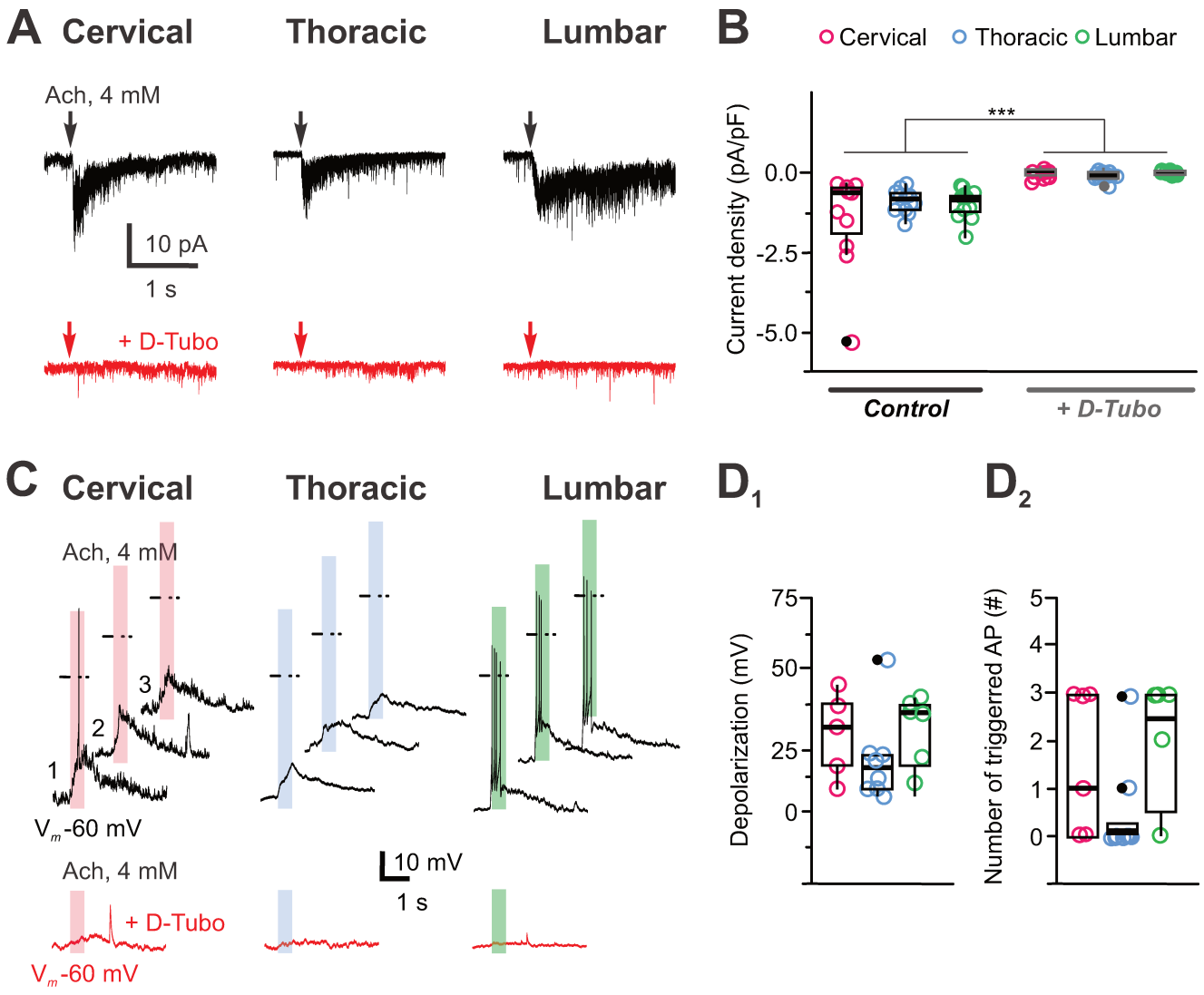
bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



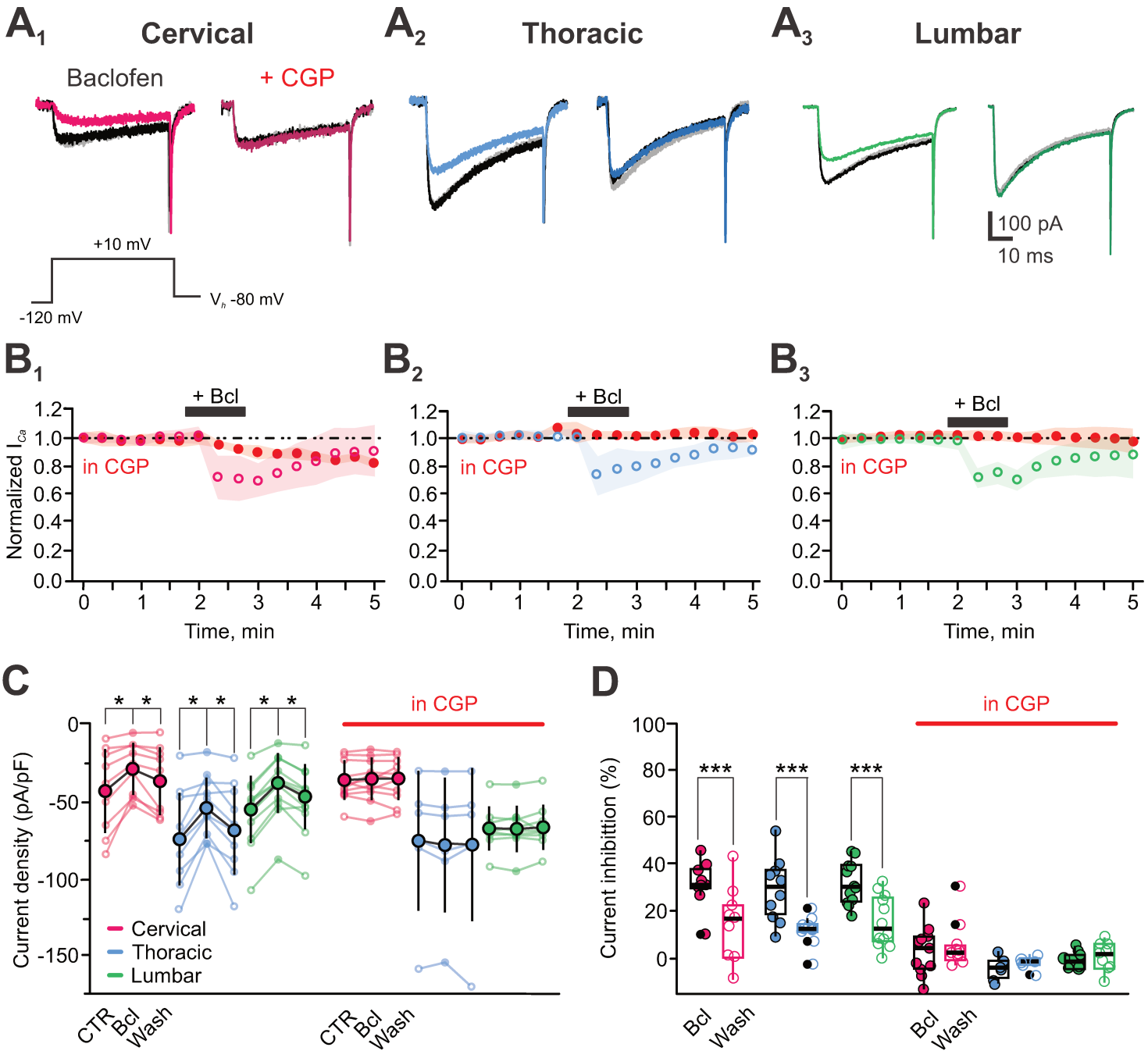
bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.10.10.617653; this version posted October 12, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

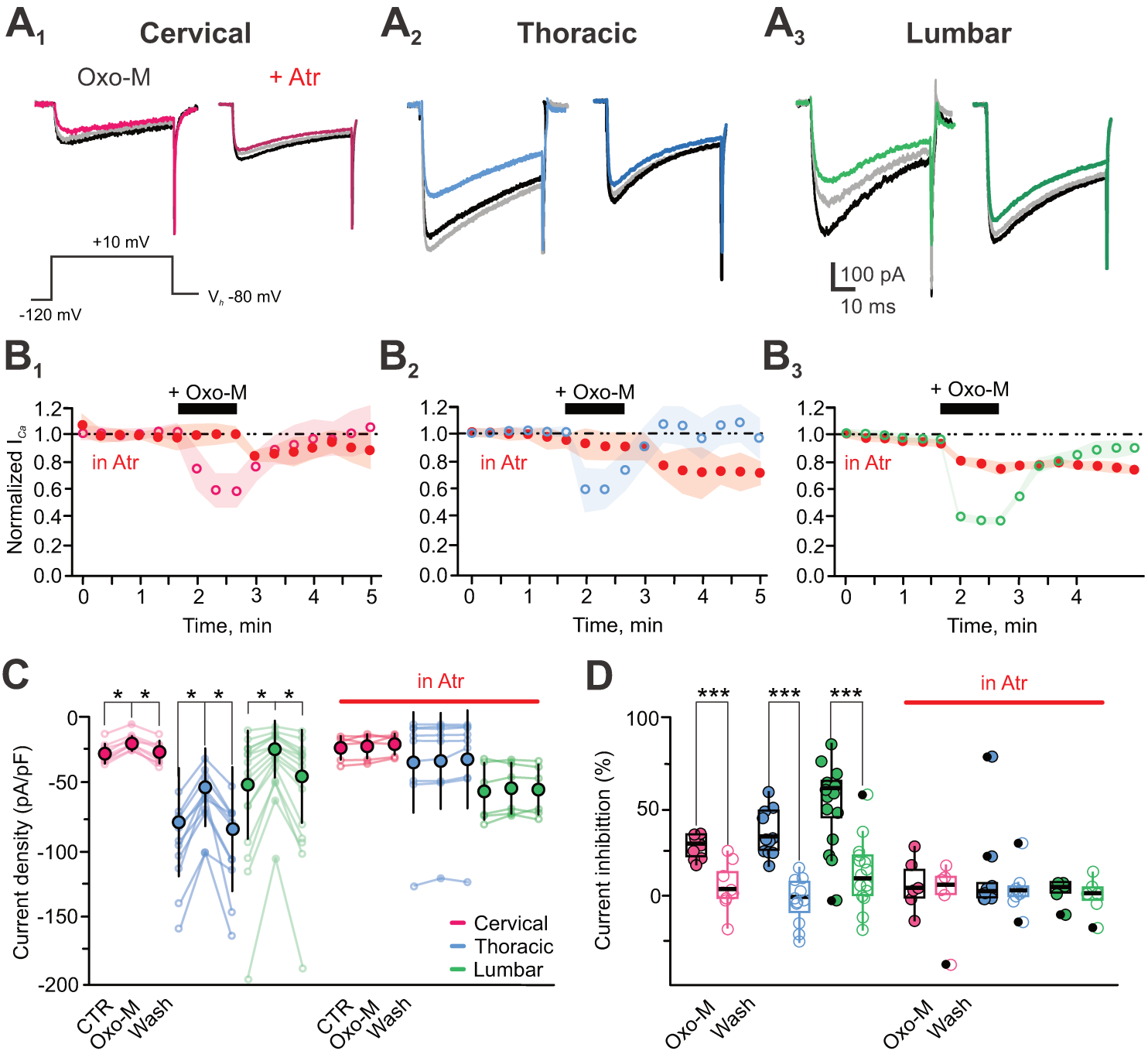


Table 2 - CSF-cNs exhibit either a single spike or tonic AP discharge pattern.

Spinal cord Segments		Cervical (C)	Thoracic (T)	Lumbar (T)
Firing pattern	**Single Spike (%)**	67%	39%	71%
	Number of cells	14/21	9/23	15/21
	Tonic (%)	33%	61%	29%
	Number of cells	7/21	14/23	6/21
N (animals), n (cells)		10, 21	12, 23	9, 21
Fisher's exact test: □2, 5.576; degree of freedom (df) 2; P=0.0616				

Table 1 - Intrinsic properties of CSF-cNs along the rostro-caudal central canal axis.

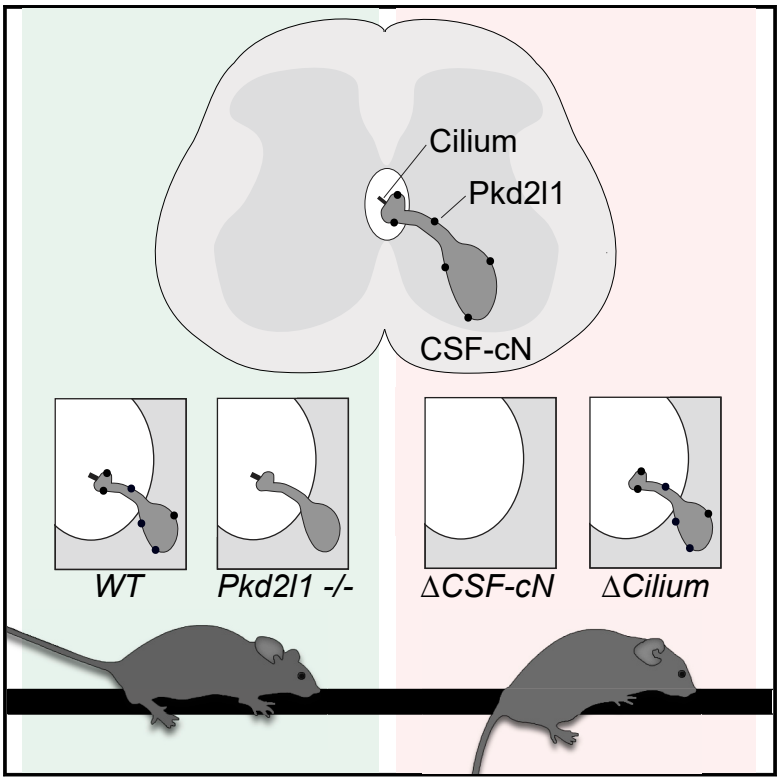
Spinal Segment		**Cervical (C)**	**Thoracic (T)**	**Lumbar (T)**
Input resistance	R_m	3.6 ± 2 GΩ	3.7 ± 2 GΩ	3.6 ± 3 GΩ
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=9.3472; degree of freedom (df)=2; p=0.009 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.3227, ns; C *vs.* L, p=0.0479, ns & T *vs.*L, p=0.0094, **				
Membrane capacitance	C_m	5.6 ± 2.9 pF	4.8 ± 2.3 pF	6.3 ± 2.9 pF
Kruskal-Wallis's test: χ^2=39.891; df=2; p=2.17.10^{-9} Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.400, ns; C *vs.* L, p=0.531, ns & T *vs.*L, p=0.094, ns				
Membrane time constant	τ_m	92 ± 58 µs	86 ± 49 µs	90 ± 3 µs
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=4.1196; df=2; p=0.1275 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.3227, ns; C *vs.* L, p=0.0479, ns & T *vs.*L, p=0.0094, **				
N (animals), n (cells)		50, 227	65, 239	70, 193
Resting Membrane Potential	RMP	-46 ± 4 mV	-45 ± 6 mV	-52 ± 9 mV
Kruskal-Wallis's test: : χ^2=17.613; df=2; p=0.00015 Post-hoc Pairwise Wilcoxon rank sum test: C *vs.* T, p=0.73535, ns; C *vs.* L, p=0.00714, ** & T *vs.*L, p=0.00016, ***				
N (animals), n (cells)		6, 20	10, 41	9, 34

Article

Current Biology

The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion

Graphical abstract



Authors

Katrin Gerstmann, Nina Jurčić, Edith Blasco, Severine Kunz, Felipe de Almeida Sassi, Nicolas Wanaverbecq, Niccolò Zampieri

Correspondence

niccolo.zampieri@mdc-berlin.de

In brief

Cerebrospinal fluid-contacting neurons (CSF-cN) represent an evolutionary conserved vertebrate interoceptive system relaying sensory information from the CSF to spinal motor circuits. This study reveals CSF-cN's role in mammalian motor control where they contribute to orchestrate the precise execution of movements required for skilled locomotion.

Highlights

- CSF-cN are evolutionary conserved components of mouse spinal sensorimotor circuits
- Elimination of CSF-cN compromises adaptive motor control
- The cilium is required for CSF-cN function
- Pkd2l1 is dispensable for CSF-cN function in mice

Gerstmann et al., 2022, Current Biology *32*, 2442–2453
June 6, 2022 © 2022 Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.019

CellPress

CellPress

Current Biology

Article

The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion

Katrin Gerstmann,[1] Nina Jurčić,[2] Edith Blasco,[2] Severine Kunz,[3] Felipe de Almeida Sassi,[1] Nicolas Wanaverbecq,[2,5] and Niccolò Zampieri[1,4,6,*]

[1]Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany
[2]Institut de Neurosciences de la Timone, Aix-Marseille Université (AMU) & CNRS, UMR7289, Timone Campus, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France
[3]Technology Platform for Electron Microscopy, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany
[4]Twitter: @ZampieriNiccolo
[5]Twitter: @N_Wanaverbecq
[6]Lead contact
*Correspondence: niccolo.zampieri@mdc-berlin.de
https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.019

SUMMARY

From swimming to walking and flying, animals have evolved specific locomotor strategies to thrive in different habitats. All types of locomotion depend on the integration of motor commands and sensory information to generate precisely coordinated movements. Cerebrospinal-fluid-contacting neurons (CSF-cN) constitute a vertebrate sensory system that monitors CSF composition and flow. In fish, CSF-cN modulate swimming activity in response to changes in pH and bending of the spinal cord; however, their role in mammals remains unknown. We used mouse genetics to study their function in quadrupedal locomotion. We found that CSF-cN are directly integrated into spinal motor circuits. The perturbation of CSF-cN function does not affect general motor activity nor the generation of locomotor rhythm and pattern but results in specific defects in skilled movements. These results identify a role for mouse CSF-cN in adaptive motor control and indicate that this sensory system evolved a novel function to accommodate the biomechanical requirements of limb-based locomotion.

INTRODUCTION

Animals have developed a wide variety of locomotor strategies to adapt to their environment. The ability to precisely control movements is essential for each mode of locomotion and depends on the dynamic integration of motor commands and sensory information. Planning and initiation of motor programs take place in the brain, whereas their execution is directed by the spinal cord. Spinal circuits combine descending input with sensory feedback in order to generate coordinated movements and reflexive actions.[1–3] Although the contributions of the somatosensory system have been extensively studied, the role of different sources of sensory information is less clear.

Cerebrospinal fluid-contacting neurons (CSF-cN) have been first described a century ago as sensory neurons lining the central canal in vertebrates.[4,5] They exhibit a peculiar morphology including a ciliated protrusion extending into the lumen of the central canal.[6] Thus, they have been thought to represent a sensory system monitoring CSF composition and flow. CSF-cN are inhibitory neurons and express ion channels known to be involved in sensory transduction, such as P2X and Pkd2l1.[7,8] The latter represents a specific marker of CSF-cN.[9] In larval zebrafish, CSF-cN are directly connected to primary motor neurons and V0v interneurons, glutamatergic premotor neurons that are part of the swimming central pattern generator.[10,11] Optogenetic stimulation of CSF-cN in resting larvae elicits low frequency movements, whereas activation during active swimming results in inhibition of locomotion, thus indicating that CSF-cN differentially modulate motor activity depending on the state of the animal.[10]

In fish, CSF-cN sense changes in pH and spinal curvature.[12–14] In particular, calcium-imaging experiments revealed responses to both active and passive bending of the body axis, highlighting CSF-cN function as a mechanosensory system detecting the curvature of the spinal cord, either self-generated or induced by external forces.[11,12] Pkd2l1 has been shown to be crucial for CSF-cN mechanosensory function; in its absence, CSF-cN are not activated by spinal bending and behavioral responses are impaired.[12,15] Altogether these studies indicate that in fish, CSF-cN are the key component of a chemo- and mechanoreceptive sensory system that relay information about CSF composition and curvature of the body axis in order to modulate locomotor activity and control posture.[16]

The biomechanical requirements and circuit mechanisms controlling wave-like propagation of swimming movements in fish versus on-ground locomotion in limbed vertebrates are substantially different, raising questions regarding the physiological function of CSF-cN.[17] In this study, we analyzed CSF-cN connectivity and function in mice. We found that CSF-cN are directly integrated in spinal motor circuits and form ascending recurrent connections. Ablation of CSF-cN did not affect motor activity nor the generation of stereotyped locomotor patterns, such as

walking and swimming, but resulted in selective defects in skilled locomotion. We observed an increase of foot slips and falls at the balance beam and the horizontal ladder, indicating that elimination of CSF-cN leads to defects in adaptive motor control. Surprisingly, we found that in mice, Pkd2l1 activity is dispensable for CSF-cN function. However, elimination of CSF-cN cilium is sufficient to completely recapitulate the phenotypes observed after neuronal ablation, thus demonstrating that this structure is necessary for sensory transduction. These findings indicate that during the evolutionary transition from swimming to walking, CSF-cN have acquired a novel role in order to adapt to the specific needs of limbed-based locomotion and are an essential part of the sensory feedback mechanisms that contribute to adaptive motor control required for skilled locomotion.

RESULTS

CSF-cN connect to key components of spinal motor circuits

We studied the physiological role of CSF-cN in the mammalian nervous system by obtaining genetic access using the *Pkd2l1::Cre* mouse line.[18] We verified targeting specificity by lineage tracing with a nuclear GFP reporter line[19] (*RosaΦHTB*) and found that at all spinal levels ~84% of labeled cells were Pkd2l1$^+$ and presented the characteristic position and morphology of CSF-cN (Figures S1A and S1B). In addition, we did not observe reporter expression in any other cell type in the central nervous system (Figure S1C).

In order to explore CSF-cN connectivity, we first investigated synaptic targets by labeling presynaptic boutons with tdTomato-tagged synaptophysin[20] (*Ai34*). We observed dense signal localized around the central canal and in the ventromedial part of the spinal cord at all axial levels (Figure 1A). Interestingly, key components of spinal motor circuits are characterized by stereotyped positioning in these areas along the entire rostrocaudal extent of the spinal cord. Median motor column (MMC) neurons controlling the activity of epaxial muscles are found in ventromedial location, whereas V0c neurons, cholinergic premotor interneurons, are positioned in the intermediate spinal cord in proximity to the central canal.[21,22] Thus, we asked whether MMC and V0c neurons receive synaptic input from CSF-cN. To test this hypothesis, we relied on the cholinergic nature and stereotyped position of these cell types to identify them (Figure 1B). We found putative synaptic contacts on ~57% of V0c and ~35% of MMC neurons at all spinal levels, as well as few instances of tdTomato$^+$ boutons juxtaposed to lateral motor column (LMC) neurons at lumbar and cervical levels (~13%; Figures 1C and S1D). In addition, we investigated whether other cardinal ventral interneuron subtypes represent possible synaptic targets of CSF-cN. We found synaptic boutons in close proximity of Lhx1$^+$ (V0/dI4)[23] and Chx10$^+$ (V2a)[24] interneurons, but not onto calbindin$^+$ (Renshaw cells)[25] and FoxP2$^+$ (V1) ventral horn interneurons[26] (Figure 1D). Altogether, these data show that CSF-cN presynaptic terminals are found juxtaposed to key components of spinal motor circuits.

To confirm the anatomical findings and assess functional connectivity, we expressed channelrhodopsin-2[27] (ChR2, *Ai32*) in CSF-cN and used whole-cell patch-clamp recording combined to ChR2-assisted circuit mapping [28] (CRACM) to identify putative CSF-cN postsynaptic partners. First, to validate the optogenetic model in CSF-cN, we carried out a set of tests, and our data show that in voltage clamp mode (V_h −90 mV), reliable photocurrents with the characteristic properties—current with an initial transient and subsequent persistent phase—can be elicited in CSF-cN with a light pulse power set at 2 mW.mm^{-2} (−150 and −65 pA for peak and steady state currents, respectively) with little changes in amplitude for further increase in power (Figures S2A and S2B; n = 12–16). Thus, to ensure reliable ChR2 activation, we used a power set at 5 mW.mm^{-2}. The analysis of the photocurrent current-voltage relationship (V_h −70 mV and V_{Step} from −90 to −10 mV, 20 mV increments) indicates that the current amplitude follows a linear regression with a current reversion at −10 mV (Figure S2C; n = 67). Further, we show that the photocurrents elicited with either repetitive light pulses (Figure S2D; n = 8) or with pulses of increased duration (Figure S2E; n = 11) remained stable. Finally, we compared the action potential (AP) discharge pattern induced in the same CSF-cN (current clamp mode at resting membrane potential, abbreviated asRMP) either following positive direct current (DC) injection (+20 pA) or exposure to light pulses of increasing duration and show that both stimuli triggered comparable spiking and AP discharge frequency (Figure S2F; n = 7) and that repetitive short light pulses reliably induced spiking over time (Figure S2G). Taken together, these data indicate that optical stimulation reliably generated ChR2 photocurrents and evoked AP discharge in ChR2$^+$ CSF-cN.

Next, we assessed the functional connectivity between CSF-cN and spinal interneurons. We recorded interneurons located close to the central canal (50 ± 5 μm; n = 20. Figure 2C) in the proximity of ChR2$^+$ varicosities and determined their intrinsic electrophysiological, firing, and morphological properties (Figure 2A). The majority of the recorded interneurons (15/20) presented electrophysiological (r_m: 541 ± 7 MΩ; c_m: 26 ± 2 pF), AP (AP half width: 2.0 ± 0.2 ms; discharge frequency: 26 ± 2 Hz, +50 pA DC current injection) and morphological properties compatible with V0c neurons identity[22] (Figures 2B and 2C). The remaining cells (5/20) were characterized by a different physiological profile, suggesting that at least another interneuron subtype residing next to the central canal receive direct input from CSF-cN (data not shown). In line with the neurotrasmitter phenotype of CSF-cN, we found that short light pulses evoked inward inhibitory responses in these neurons (V_h −70 mV and E_{Cl} −60 mV; 20/500 neurons patched) that were completely abolished in the presence of gabazine (Figures 2D and 2E; n = 20). Thus, physiological analysis confirms functional connectivity between CSF-cN and spinal interneurons positioned around the central canal.

CSF-cN are reciprocally connected and receive sparse input from spinal interneurons

Next, we explored sources of presynaptic input to CSF-cN by using rabies virus (RV) retrograde monosynaptic tracing.[29] We selectively targeted CSF-cN for rabies infection and transsynaptic spread by injecting a mixture of Cre-dependent helper adenoassociated viruses (AAVs) at lumbar (L) level 1 of *Pkd2l1::Cre* mice (AAV-syn-FLEX-splitTVA-EGFP-tTA and AAV-TREtight-mTagBFP2-B19G[30]). Three weeks later, EnvA pseudotyped G-deficient RV (RVΔG-mCherry/EnvA) was delivered at the

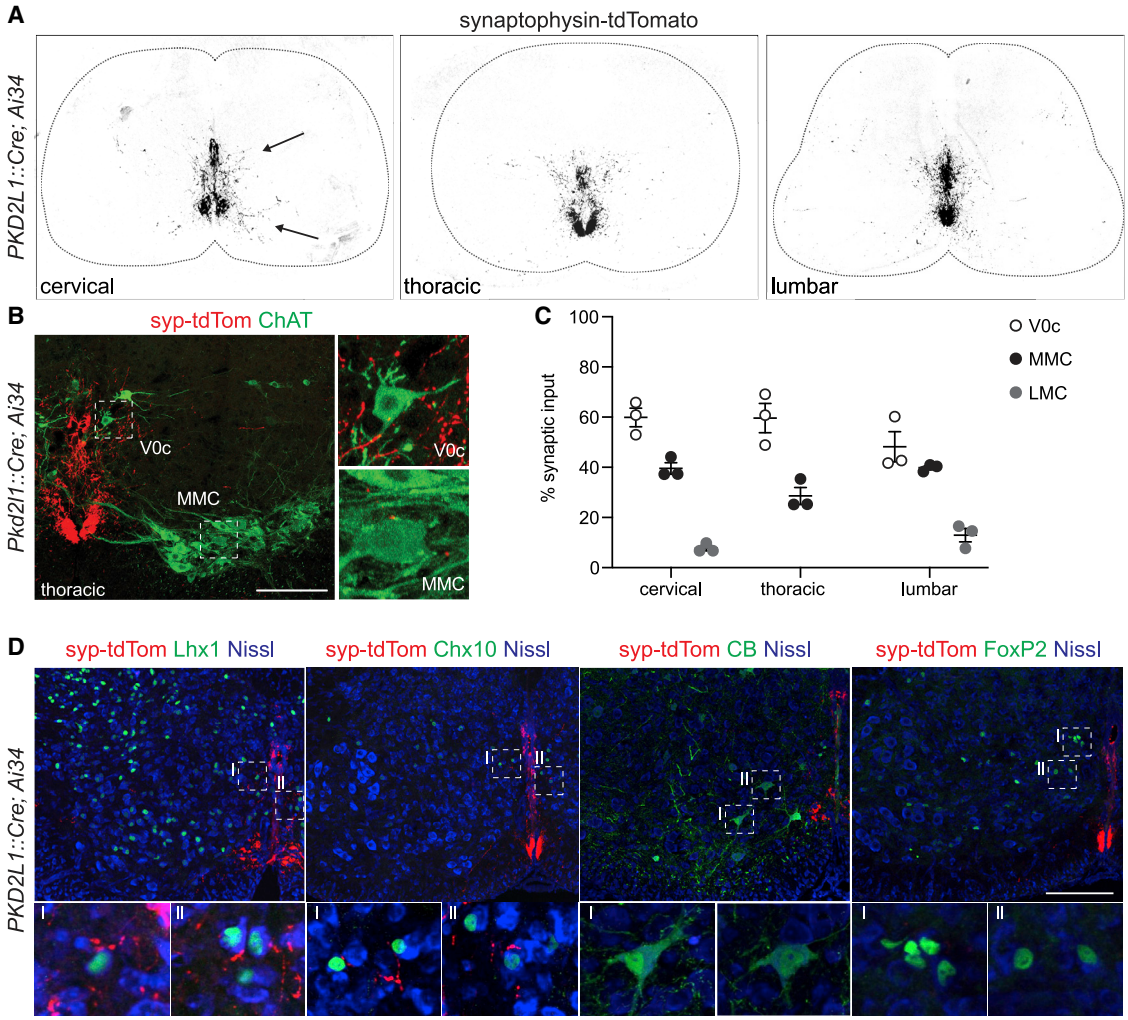


Figure 1. CSF-cN project to key components of spinal motor circuits

(A) Representative images of synaptophysin-tdTomato labeling of CSF-cN at cervical, thoracic, and lumbar levels of P7 *Pkd2l1::Cre; Ai34* mice. Arrows point to dense labeling nearby the central canal and the ventromedial area of the spinal cord.

(B) Representative images of synaptophysin-tdTomato puncta in close contact with ChAT$^+$ V0c and MMC neurons at the thoracic level of P7 *Pkd2l1::Cre; Ai34* mice. Scale bar, 200 μm. Magnifications show single z-planes.

(C) Proportion of V0c, MMC, and LMC neurons that receive synaptic input from CSF-cN at cervical, thoracic, and lumbar levels (n = 3).

(D) Representative images of synaptophysin-tdTomato puncta in close contact with ventral interneurons subtypes. We found Tomato$^+$ puncta on Lhx1$^+$ (V0/dI4) and Chx10$^+$ (V2a) interneurons, but not onto calbindin$^+$ (CB) ventral horn interneurons (Renshaw cells) and FoxP2$^+$ (V1) interneurons. Scale bar, 200 μm. Magnifications show single z-planes.

See also Figure S1 and Video S5.

same level (Figure 3A). We first examined starter cells, defined as neurons infected by both AAV and RV and found BFP$^+$; RV$^+$ neurons around the central canal at the point of injection, with morphologies and positions characteristic of CSF-cN (Figures 3B–3D). We next focused on transynaptically labeled neurons and found that the majority of BFP$^-$; RV$^+$ cells were also CSF-cN (~85%) but mainly located at more caudal levels of the spinal cord, thus indicating that CSF-cN are reciprocally connected, with caudal neurons sending input to rostral segments (Figures 3D and S3A–S3C). To further investigate whether CSF-cN make ascending axonal projections, as suggested by rabies tracing experiments and previously shown in zebrafish,[31] we drove expression of the avian tumor virus receptor A (TVA) in CSF-cN at L1 by focal injection of AAV-FLEX-TVAmCherry in *Pkd2l1::Cre* mice and then probed the directionality of CSF-cN axons by delivering RVΔG-GFP/EnvA, either at rostral (T10) or caudal (L3) levels (Figures 3F and 3G). We observed retrograde infection of TVA expressing CSF-cN only after rabies injection at T10, thus indicating that CSF-cN send axons only to more rostral segmental levels (Figures 3F and 3G). Finally, we assessed whether CSF-cN form functional reciprocal synaptic contact. By using CRACM, CSF-cN were recorded in voltage clamp mode (V_h 0 mV) at the ChR2 current reversal potential to avoid recording contamination with the photocurrent (Figures 3H and S2C). We show that exposure to short light pulses evoked synaptic responses in all recorded CSF-cN

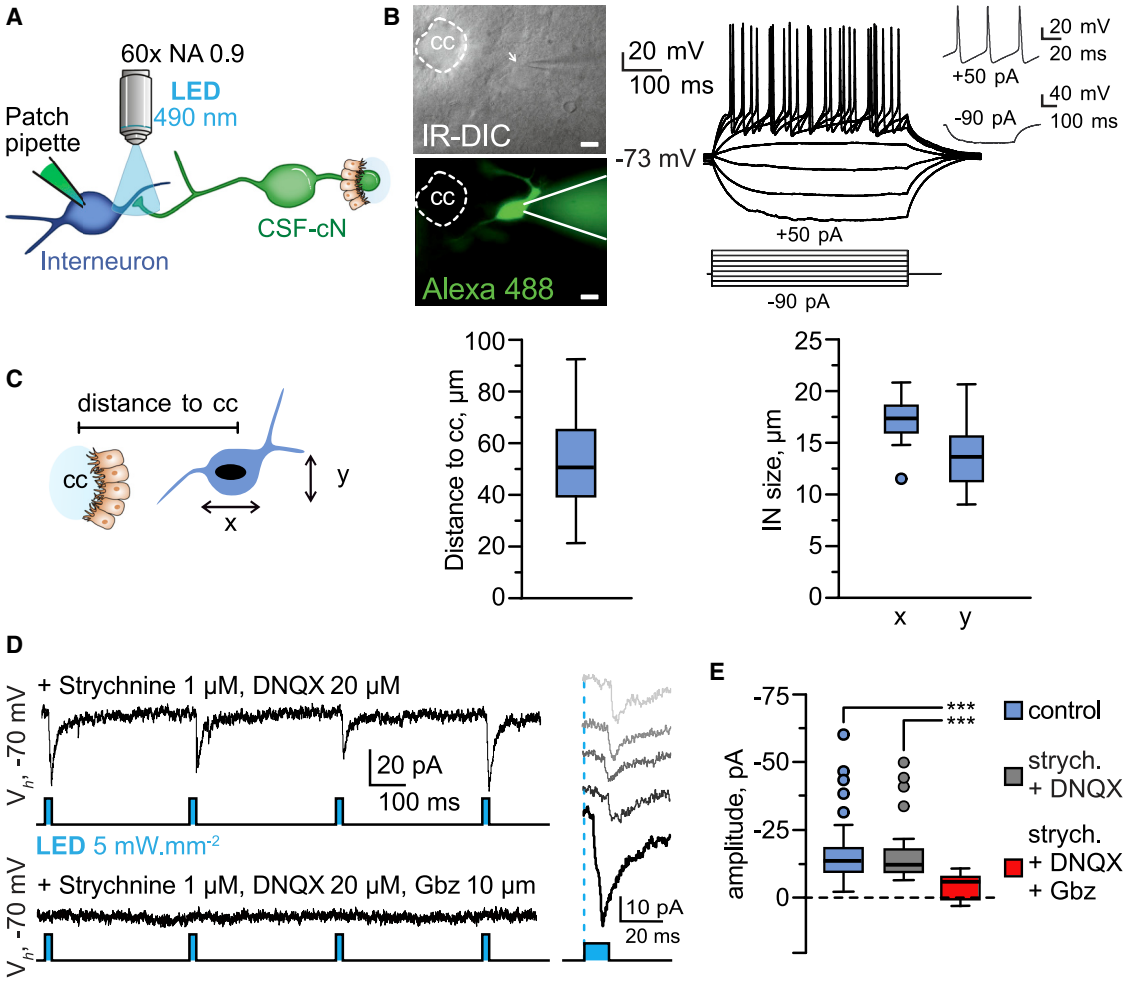


Figure 2. CSF-cN form functional synaptic contact with spinal interneurons

(A) Schematic of patch-clamp recordings and ChR2-assisted circuit mapping to identify putative CSF-cN postsynaptic partners.

(B) Micrographs showing a responsive interneuron position (arrow, IR-DIC) and its morphology (green, Alexa488 dialysis during recording, scale bars, 20 µm). Right, traces showing the electrophysiological properties of the interneurons shown on the left. Recording in current clamp at RMP −73 mV and injection of DC current steps from −90 to +50 pA (increments: +20 pA) showing a large hyperpolarization and sustained high frequency AP discharge upon negative and positive direct current injection, respectively.

(C) Schematic (left) illustrating parameters used for quantifying the position (center) and size (right) of responsive neurons (n = 20; mean ± SD).

(D) Representative traces of the photoevoked inward currents recorded in one interneuron (voltage clamp mode, V_h −70 mV and E_{Cl} −60 mV) upon repetitive optical activation (10 ms, 5 mW.mm^{-2} every 500 ms, see LED pulse under the traces) of ChR2$^+$ CSF-cN terminals present on the neuron. Top: recording in the presence of 1 µM strychnine and 20 µM 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX), bottom: addition to the bath of 10 µM gabazine (Gbz) completely blocks the evoked responses. Traces are the average of 5 consecutive recordings and the inset on the right show individual responses for the first light pulse.

(E) Summary box-whisker plot for IPSC current amplitude in control (blue box, CTR), in the presence of strychnine and DNQX alone (gray box, SD), and with gabazine added to the bath (red box, SDG). (Kruskal Wallis test: $\chi^2 = 62{,}589$, df = 2, $p = 2.564 \times 10^{-14}$; post-hoc Wilcoxon pairwise test: CTR versus SD, p = 0.32; CTR and SD versus SDG, $p = 1.3 \times 10^{-13}$ and $p = 2 \times 10^{-6}$, respectively; n = 20).

See also Figure S2.

(19/19). Moreover, these synaptic currents were outward and completely abolished in the presence of gabazine and picrotoxin (Figures 3I and 3J; n = 19), as expected for the chloride equilibrium potential (E_{Cl}) set at −60 mV and the activation of $GABA_A$ receptors.

The remaining presynaptic input consisted of sparse labeling of spinal interneurons without any distinct positional organization (Figures 3C–3E). We analyzed the neurotransmitter phenotype of CSF-cN presynaptic partners by assessing expressions of *VGAT* and *VGLUT2* and found that the majority of presynaptic neurons were *VGAT*$^+$, including CSF-cN that are known to have GABAergic phenotype[32] (Figures S3D and S3E). Altogether, these data indicates that CSF-cN are reciprocally connected and receive sparse input mainly by local inhibitory interneurons.

CSF-cN are required for skilled locomotion

Next, to study the function of CSF-cN in motor control, we crossed the *Pkd2l1::Cre* line with the *RosaΦDTR* allele to drive expression of the diphtheria toxin receptor[33] (DTR). Diphtheria

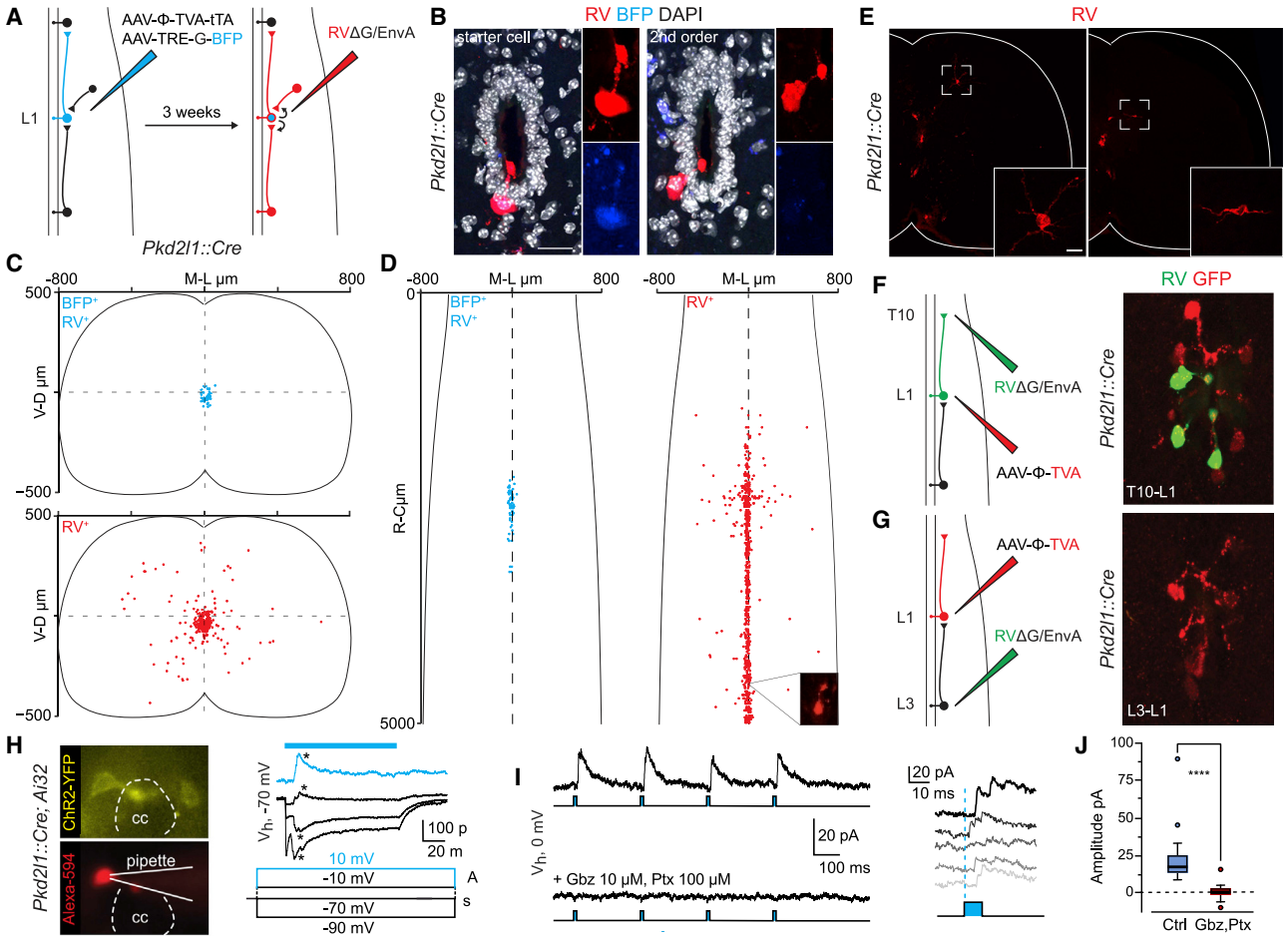


Figure 3. CSF-cN are reciprocally connected and receive sparse input from local spinal interneurons

(A) Schematic illustrating rabies monosynaptic tracing approach to identify cells providing input to CSF-cN. A mix of Cre-dependent helper AAVs driving the expression of TVA and G was injected at L1 of P7 *Pkd2l1::Cre* mice. However, 3 weeks later, RVΔG-mCherry/EnvA was injected at the same position, and after 7 days spinal cords were examined.

(B) Representative images of BFP^+; RV^+ starter cells and BFP^-; RV^+ second order CSF-cN. Scale bars, 20 µm.

(C and D) Digital reconstruction of medio-lateral/dorso-ventral position (C) and medio-lateral/rostro-caudal position (D, thoracic segment on top) of starter cells (blue) and second order cells (red); n = 3.

(E) Representative images of second order neurons labeled in rabies tracing experiments from CSF-cN.

(F) Schematic illustration of retrograde tracing approach to test directionality of CSF-cN axonal projections. Injection of AAV-FLEX-TVAmCherry in *Pkd2l1::Cre* mice at P7 was followed 3 weeks after by RVΔG-GFP/EnvA injection at T10. Representative image shows AAV^+/RV^- and AAV^+/RV^+ cells at L1.

(G) Schematic illustration of retrograde tracing approach to test directionality of CSF-cN axonal projections. Injection of AAV-FLEX-TVAmCherry in *Pkd2l1::Cre* mice at P7 was followed 3 weeks by RVΔG-GFP/EnvA injection at L3. Representative image shows AAV^+/RV^- cells at L1, no RV^+ cells were detected.

(H) Representative epifluorescence image of one $ChR2^+$ CSF-cN recorded in an acute lumbar spinal cord slice (250 µm, cc, central canal) obtained from a *Pkd2l1::Cre; RosaΦChrR2* mice showing ChR2 expression through YFP (top) and Alexa 594 fluorescence (bottom) upon cell dialysis through the patch pipette. Right, voltage-dependance of the ChR2 photoevoked currents in CSF-cN recorded in voltage clamp mode (V_h −70 mV) at the voltage potential steps indicated under the traces. Note the decrease in the photocurrent amplitude with depolarizing voltage steps (null for −10 mV, see also Figure S2C) and the presence of currents (*) that develop shortly after the onset of the photocurrent and are either inward or outward for potentials more hyperpolarized or depolarized than −60 mV (E_{Cl}), respectively.

(I) Representative traces of the photoevoked outward currents recorded in one CSF-cN (voltage clamp mode, V_h 0 mV and E_{Cl} −60 mV) upon repetitive optical activation (10 ms, 5 $mW.mm^{-2}$ every 500 ms, see LED pulse under the traces) of $ChR2^+$ CSF-cN terminals present on the neuron. Top: control condition. Bottom: 100 µM picrotoxin (Ptx) and 10 µM gabazine (Gbz) blocked the evoked responses. The traces illustrated are the average of 5 consecutive recordings and the inset on the right shows for the first light pulse individual responses.

(J) Summary box-whisker plot for IPSC current amplitude in control (CTR) and in the presence Gbz and Ptx (Wilcoxon signed rank test: p = 0.00013; n = 19). See also Figure S3.

toxin (DT) administration in adult mice resulted in the elimination of >80% CSF-cN within 2 weeks (Figures 4A, 4B, S4A, and S4B). We first evaluated the effect of acute ablation of CSF-cN on general locomotor function associated with exploratory behavior by using the open field test. We did not find any significant difference between DT- and PBS-treated mice in activity, speed,

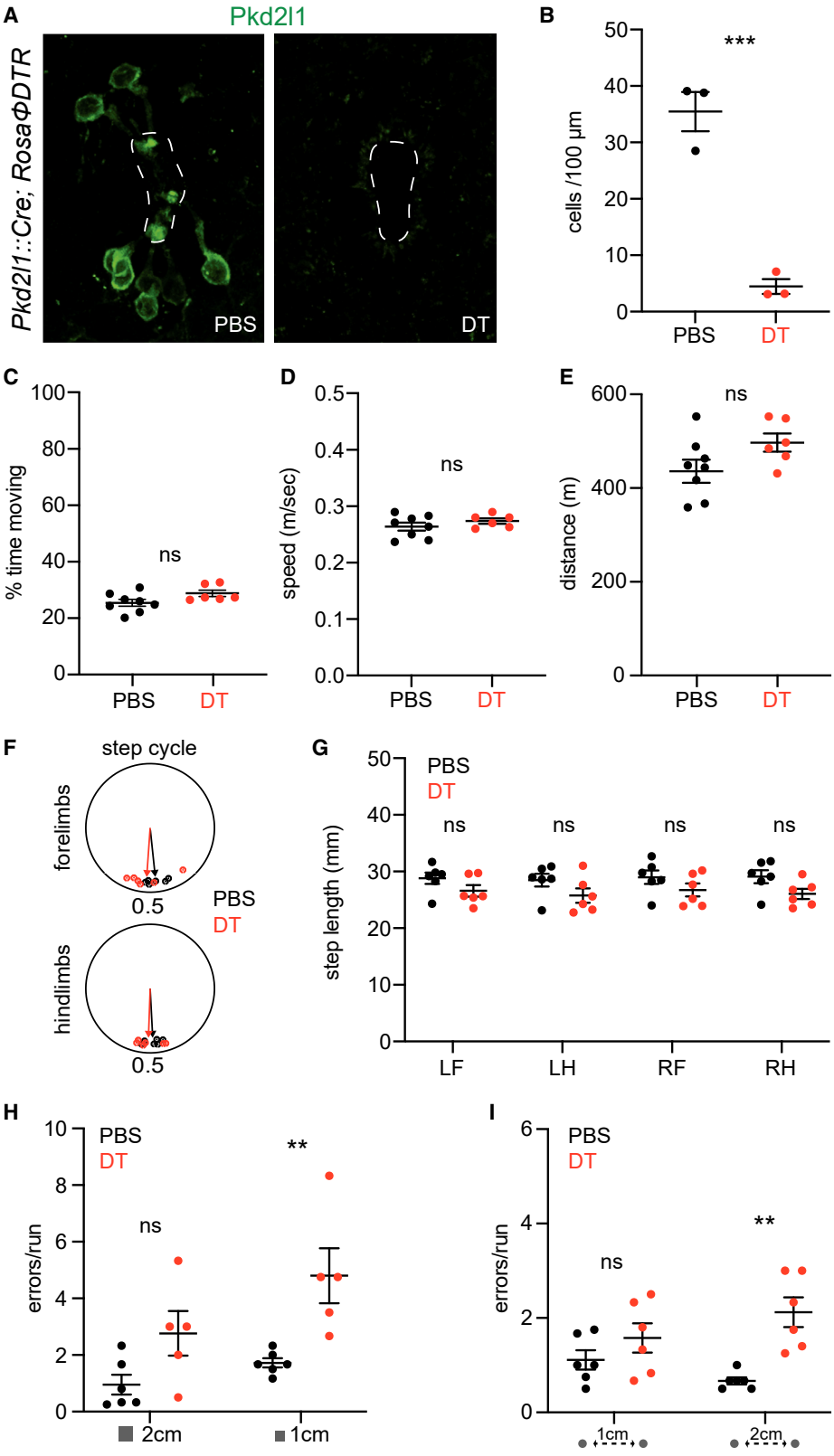


Figure 4. Pharmacological ablation of CSF-cN perturbs skilled locomotion

(A) Representative images of Pkd2l1$^+$ neurons around the central canal 60 days after PBS (left) or DT (right) injection in *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice.

(B) Quantification of Pkdl21$^+$ neurons around the central canal 60 days after PBS (n = 3) or DT (n = 3) injection in *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice.

(legend continued on next page)

distance traveled, and turning behavior (Figures 4C–4E and S4G). Next, we performed kinematic analysis on freely walking mice to evaluate gait and did not observe any effect on step cycle, step length, base of support, body stability, and the precision of foot placement, key parameters describing limb movement and coordination during unperturbed locomotion[34] (Figures 4F, 4G, S4C, S4H, and S5; Video S1). These data show that elimination of CSF-cN does not affect activity or generation of the patterns and rhythms of muscle contraction necessary for walking gait in mice. In larval zebrafish, CSF-cN have been shown to have an important role for postural control.[11] Thus, we evaluated tasks requiring control of trunk position and stability. First, we scored spontaneous rearing events and found no effect of CSF-cN ablation on rearing duration and frequency (Figure S4D; data not shown). Second, we tested swimming, a locomotor behavior that requires coordination of limbs and trunk in order to obtain directional movements.[35] We did not observe any difference in speed or in the angle between the trunk and the water line, an indicator of postural control[36] (Figures S4E and S4F; Video S2). These experiments show that elimination of CSF-cN does not perturb postural control.

Finally, we tested skilled locomotion by assessing performance at the balance beam and horizontal ladder, tasks that are known to require precise sensory feedback in order to achieve accuracy in foot placement.[37] We used beams and ladders of different widths and rung spacing in order to assess the effect of progressively more difficult conditions.[1] In both tasks, DT-treated mice presented clear deficits in motor performance (Videos S3 and S4) that resulted in an increase in the numbers of foot slips and falls, which was significantly higher than control animals in the more challenging configurations (Figures 4H and 4I). Thus, these data indicate that CSF-cN are required for skilled locomotion.

The cilium is necessary for CSF-cN function

Next, we wondered whether the Pkd2l1 channel is necessary for CSF-cN function in mice, as in zebrafish, its elimination impairs mechanosensation and behavioral responses to changes in spinal bending.[12,15] To address this question, we analyzed locomotor behavior in Pkd2l1 knockout mice[38] (*Pkd2l1*$^{-/-}$; Figure 5A). In line with the results obtained after neuronal ablation experiments, these mice did not show any phenotype at the open field, gait analysis, and swimming tests (Figures 5B–5D and S5; data not shown; Videos S1 and S2). Surprisingly, *Pkd2l1*$^{-/-}$ mice performance at the balance beam and horizontal ladder was also indistinguishable from control mice (Figures 5E and 5F; Videos S3 and S4). Altogether, these data suggests that CSF-cN function in mice does not require Pkd2l1 activity.

Cilia have been known to function as a mechanosensory organelle responding to fluid flow in many different cell types and most notably in sensory neurons. The intraflagellar transporter 88 (Ift88) is part of the Ift-B complex that is crucial for transport of ciliary proteins and its elimination suppress ciliogenesis.[39] Thus, to study the consequences of preventing cilium formation in CSF-cN, we crossed the *Pkd2l1::Cre* allele with the conditional *Ift88*^{fl} mouse line[40] (*Pkd2l1::Cre*$^{+/-}$*; Ift88*$^{fl/fl}$, hereafter referred to as Δ*Cilia*). We first confirmed success of this strategy by visualizing CSF-cN protrusions in the central canal and the associated cilium. In control animals, we found that >70% of Pkd2l1^{+} apical processes presented a cilium, whereas in *ΔCilia* mice, we found a significant reduction in the occurrence of ciliated CSF-cN (∼35%; Figures 6A and 6B). Moreover, electron microscopy analysis confirmed that conditional elimination of Ift88 prevents ciliogenesis in CSF-cN (Figure 6C). Next, we evaluated locomotor behavior in Δ*Cilia* mice. We did not observe any significant defect in the open field, gait analysis, and swimming tests (Figures 6D–6G, S5, and S6; Videos S1 and S2). In contrast, the performance of Δ*Cilia* mice at the balance beam and horizontal ladder was perturbed (Videos S3 and S4). Strikingly, quantification of foot slips and foot falls revealed that *ΔCilia* made significantly more mistakes when walking on the more challenging versions of the tests, thus precisely recapitulating the phenotype observed after CSF-cN ablation (Figures 6H and 6I). Altogether, these data show that the behavioral defects observed after elimination of the cilium phenocopy the ones occurring after neuronal ablation, thus indicating that this structure is necessary for CSF-cN function in motor control in mice.

DISCUSSION

In this study, we investigated the physiological role of CSF-cN, an evolutionary conserved vertebrate sensory system, in limbed mammals. We found that these neurons are integrated into spinal motor circuits and contribute to adaptive motor control necessary for skilled locomotion. CSF-cN function in mice does not require the activity of the Pkd2l1 channel but entirely depends on its cilium, thus pointing to a key role for this mechanosensory structure in monitoring CSF flow. Altogether, our data suggest a model where CSF-cN provide an additional source of proprioceptive information by monitoring spinal curvature and represent an integral component of the sensory feedback mechanisms necessary for adaptive motor control.

Kolmer and Agduhr first described a peculiar population of sensory neurons lining the central canal and proposed that they constitute a sensory organ relaying information from the

(C–E) Locomotor activity during a 90 min open field test. Percentage of time spent moving (C), speed (D) and distance traveled (E) in adult *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice 14 days after PBS (n = 8) or DT (n = 6) treatment.
(F) Step cycle in adult *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice 14 days after PBS (n = 6) or DT (n = 6) treatment.
(G) Step length in adult *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice 14 days after PBS (n = 6) or DT (n = 6) treatment (LF, left forelimb; LH, left hindlimb; RF, right forelimb; RH, right hindlimb).
(H) Quantification of foot placement errors (slips and falls) in the balance beam test with 2 cm (left) or 1 cm (right) beam width in adult *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice 14 days after PBS (n = 6) or DT-injection (n = 5).
(I) Quantifications of foot placement errors (slips and falls) in the horizontal ladder test with 1 cm (left) or 2 cm (right) rung distance in adult *Pkd2l1::Cre; RosaΦDTR* mice 14 days after PBS (n = 6) or DT-injection (n = 6).
Mean ± SEM, paired t test, ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
See also Figures S4 and S5 and Videos S1, S2, S3, and S4.

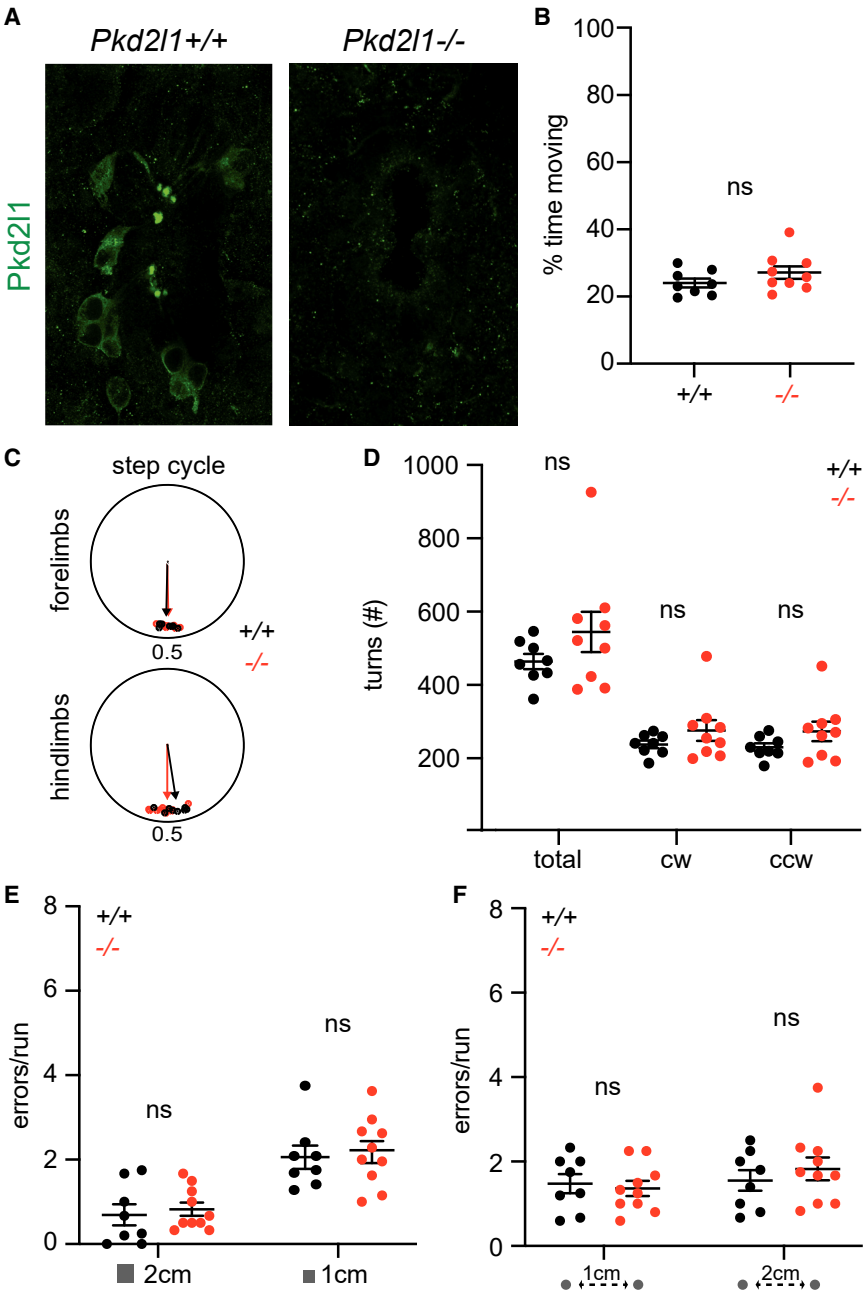


Figure 5. Pkd2l1 elimination does not affect locomotion

(A) Representative images of Pkd2l1 staining in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ and *Pkd2l1*$^{-/-}$ animals.

(B) Percentage of moving time in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ (n = 8) and *Pkd2l1*$^{-/-}$ (n = 9) during 90 min open field test.

(C) Step cycle of forelimbs (top) and hindlimbs (bottom) in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ (n = 8) and *Pkd2l1*$^{-/-}$ (n = 9).

(D) Analysis of turning behavior (total, clockwise, and counterclockwise turns) during a 90 min open field test in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ (n = 8) and *Pkd2l1*$^{-/-}$ (n = 9) mice.

(E) Quantification of foot placement errors (slips and falls) in the balance beam test with 2 cm (left) or 1 cm (right) beam width in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ (n = 8) and *Pkd2l1*$^{-/-}$ (n = 10).

(F) Quantification of foot placement errors (slips and falls) in the horizontal ladder test with 1 cm (left) or 2 cm (right) rung distance in adult *Pkd2l1*$^{+/+}$ (n=8) and *Pkd2l1*$^{-/-}$ (n = 10).

Mean ± SEM; paired t test, ns $p > 0.05$.

See also Figure S5 and Videos S1, S2, S3, and S4.

CSF.[4,5] CSF-cN function has remained elusive until recent studies in lamprey and zebrafish revealed important roles in modulation of swimming and postural control.[10,12,13] CSF-cN have been shown to provide information to the motor system about active and passive curvatures of the body axis by sensing fluid flow along the central canal.[12,15,41] In fish, the importance of monitoring curvature along the rostro-caudal axis of the spinal cord is clear, as swimming relies on the rhythmic propagation of an undulatory pattern of muscle contraction. The introduction of limbs has led to the reorganization of motor circuits in order to accommodate the biomechanical requirements of terrestrial locomotion.[17] The coordination of limb movements and precision of foot placement represent a critical feature of motor control in over ground locomotion.[42] In particular, it is especially important for navigating the diverse terrains and obstacles animals are confronted with in the wild and require dynamic integration of different sources of sensory information.[37] In our experiments, we observed that locomotor patterns and rhythms, as well as the accuracy of foot placement, are not affected during unperturbed locomotion on a plexiglass runway. However, under more challenging conditions at the balance beam and horizontal ladder, where movements need to be more precisely controlled, we found a significant increase in the number of foot slips and falls. CSF-cN, by sensing spinal bending, can provide an extra layer of proprioceptive information that is dispensable during normal locomotion but required for skilled locomotion. Thus, a sensory system modulating wave-like movements at the basis of swimming in fish may have evolved a novel role in the control of adaptive motor responses necessary to precisely regulate limb and body movements in limbed vertebrates.

At circuit level, we observed input-output connectivity patterns that are consistent with CSF-cN physiological role in sensorimotor integration. We found CSF-cN presynaptic puncta on motor neurons, thus possibly providing a direct way to regulate motor output, and on cardinal ventral interneuron subtypes such as ChAT^{+} V0c, Lhx1^{+} V0/dI4, and Chx10^{+} V2a interneurons, indicating connectivity to key components of spinal premotor circuits. At the physiological level, we confirmed that CSF-cN make functional inhibitory connections with spinal interneurons located around the central canal. However, we could not record

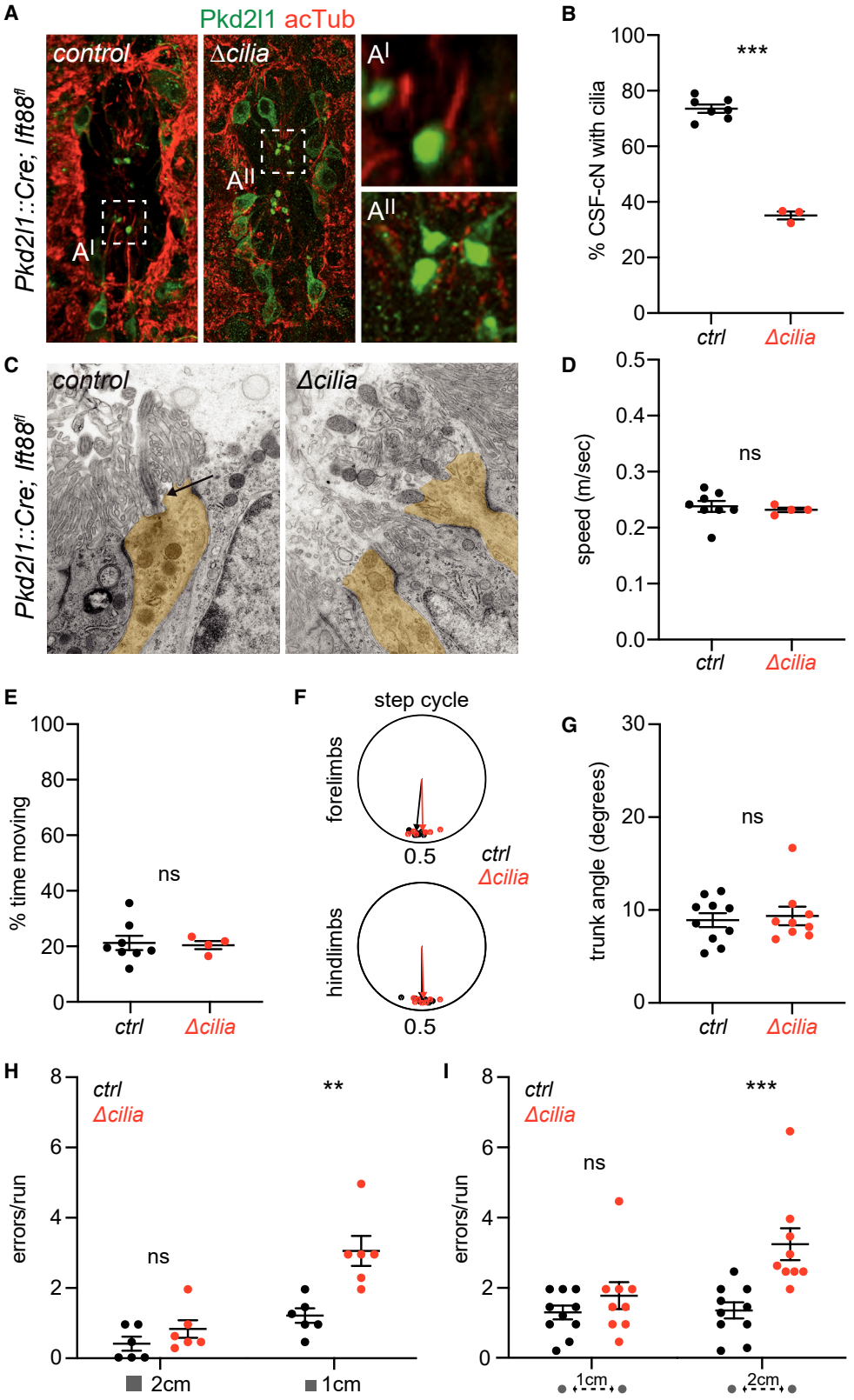


Figure 6. Elimination of CSF-cN cilium phenocopies neuronal ablation

(A) Representative images of Pkd2l1$^+$ CSF-cN apical protrusions and acetylated-tubulin$^+$ cilia in adult *control* and Δ*cilia* mice. High magnifications of Pkd2l1$^+$ protrusion in the central canal of *control* (A^I) and Δ*cilia* (A^{II}) mice.

(legend continued on next page)

functional connections to motor neurons. This discrepancy with the anatomical findings could be due to sparse connectivity and the technical limitation of finding intact connections in spinal cord coronal slices. In terms of input connectivity to CSF-cN, rabies monosynaptic tracing experiments revealed inputs from local spinal interneurons mostly of inhibitory character. Presynaptic inhibition could control the gain of CSF-cN activity, a well-known mechanism for tuning somatosensory feedback in spinal circuits.[43] In addition, we observed abundant recurrent connectivity between CSF-cN, with neurons located at caudal spinal segments sending ascending input to ones at more rostral levels. Zebrafish CSF-cN have been shown to form ascending axonal projections,[44] and prominent bilateral CSF-cN axonal bundles can be found in the medial aspects of the ventral white matter in mice (Video S5). An inhibitory feedback loop from posterior to anterior CSF-cN is well suited for coordination of undulatory movements in fish, but its significance for limb-based locomotion remains to be explored.

At the behavioral level, our data show that in mice, elimination of CSF-cN does not perturb general motor activity and the generation of rhythmic patterns of limb movement necessary for the production of stereotyped locomotor actions, such as walking and swimming. In contrast, we observe an increase of foot slips and falls at the balance beam and horizontal ladder, indicating that the precision in motor control required for performing skilled movements is perturbed. Interestingly, the effect is significant only in the most challenging versions of the tasks. These data support the idea that multiple sources of sensory information, including cutaneous and muscle afferents, the visual, and the vestibular systems, are integrated to precisely adjust limb and body movements in order to prevent foot slippage during the execution of skilled actions and suggest that CSF-cN may provide proprioceptive information about body position.[1] Previous work in lamprey and zebrafish, along with our observation that elimination of the cilium completely recapitulates the defects observed after neuronal ablation, point to a role for CSF-cN in mice as mechanoreceptive sensory neurons detecting curvature of the spinal cord by sensing CSF flow in the central canal.[41] Thus, we propose that CSF-cN by monitoring spinal bending provide additional proprioceptive feedback informing the motor system on axial position that is used to adjust trunk and limb movement during locomotion. Walking on narrow paths or challenging terrains introduces forward and lateral displacements in the body axis that can be finely monitored by CSF-cN. For example, walking on a balance beam reduces lateral stability by decreasing the available base of support or walking on the horizontal ladder requires to overextend hindlimbs in order to land on the same rung where the forelimbs touched down, thus resulting in exaggerated hip torsion.[37]

Surprisingly, we did not observe any defect in locomotor behavior upon elimination of Pkd2l1. This is in contrast with its requirement for CSF-cN function in zebrafish, thus raising interesting questions regarding additional molecular effectors in mammals. Our study does not exclude the possibility that in mice, Pkd2l1 might be selectively required for chemosensation, as this channel has been shown to respond directly to pH changes.[8] The ability to monitor CSF composition has been proposed to be part of a homeostatic mechanisms common to all vertebrates for counteracting the effects of pH changes by reducing muscle activity.[14] It will be interesting to address whether chemosensation in mammalian CSF-cN could serve as system for modulating motor behavior in response to changes in the internal state of the animal, for example, in case of fatigue or sickness.

Altogether, our anatomical and functional data indicate that CSF-cN are an important component of sensorimotor circuits in the mammalian spinal cord, contributing to adaptive motor control. This study opens the way for future work to address exciting questions on how information on CSF composition and flow is encoded by CSF-cN and integrated at a circuit level with other sensory inputs, such as muscle and cutaneous feedback, in order to orchestrate flawless execution of motor programs.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Material availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Animal Experimentation Ethical Approval
  - Animal models
- METHODS DETAILS
  - Ablation of CSF-cNs
  - Behavioral experiments
  - Perfusion and tissue preparation
  - Slice preparation, electrophysiology and optogenetic stimulation

(B) Quantification of Pkd2l1$^+$ CSF-cN apical protrusions bearing an acetylated-tubulin$^+$ cilium in *control* and Δ*cilia* mice (n = 3).
(C) Representative electron microscopy images of CSF-cN (highlighted in yellow) in *control* (left) and Δ*cilia* (right) mice. Arrow point to the cilium.
(D) Average speed during a 90 min open field test in adult *control* (n = 8) and Δ*cilia* (n = 4) mice.
(E) Percentage of moving time in adult *control* (n = 7) and Δ*cilia* mice (n = 4) during 90 min open field test.
(F) Step cycle of forelimbs (top) and hindlimbs (bottom) in adult *control* (n = 10) and Δ*cilia* mice (n = 9).
(G) Quantification of trunk angle between body axis and water line during swimming task in adult *control* (n = 10) and Δ*cilia* mice (n = 9).
(H) Quantification of foot placement errors (slips and falls) in the balance beam test with 2 cm (left) or 1 cm (right) beam width in adult *control* (n = 6) and Δ*cilia* mice (n = 6).
(I) Quantification of foot placement errors (slips and falls) in the horizontal ladder test with 1 cm (left) or 2 cm (right) rung distance in adult *control* (n = 10) and Δ*cilia* mice (n = 9).
Mean ± SEM; paired t test, ns $p > 0.05$, ** $p<0.01$, *** $p < 0.001$.
See also Figures S5 and S6 and Videos S1, S2, S3, and S4.

- Immunohistochemistry
- Viral tracings
- Fluorescent in situ hybridization
- Positional analysis
- Electron microscopy
- Tissue clearing and light-sheet microscopy

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.019.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Liana Kosizki for technical support and the MDC Advanced Light Microscope facility for assistance with image acquisition and analysis, Sofia Pimpinella for helping with spinal injections, and Pierre-Louis Ruffault for advice with experimental design. We thank Robert Manteufel, Ilka Duckert, and Florian Keim for animal care; Baptiste Lasbats and Lilly von Kalckreuth for assistance with behavioral experiments; Nikos Balaskas, Marco Beato, Joriene De Nooij, and members of the Zampieri and Wanaverbecq laboratories for insightful comments on the manuscript. N.Z. and N.W. were supported by a DFG-ANR international collaborative grant (MotAct-CSF. DFG ZA 885/1-2 and ANR-16-CE92-0043); N.W. by AMU and CNRS INSB.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, K.G., N.W., and N.Z.; investigation, K.G., N.J., E.B., S.K., and F.d.A.S.; formal analysis, K.G., N.J., E.B., and S.K.; writing – original draft, K.G. and N.Z.; writing – review and editing, K.G., N.W., and N.Z.; funding acquisition, N.W. and N.Z.; resources, N.W. and N.Z.; supervision, N.W. and N.Z.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: October 12, 2021
Revised: March 4, 2022
Accepted: April 8, 2022
Published: May 4, 2022

REFERENCES

1. Rossignol, S., Dubuc, R., and Gossard, J.-P. (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. Physiol. Rev. *86*, 89–154.
2. Koch, S.C. (2019). Motor task-selective spinal sensorimotor interneurons in mammalian circuits. Curr. Opin. Physiol. *8*, 129–135.
3. Tuthill, J.C., and Azim, E. (2018). Proprioception. Curr. Biol. *28*, R194–R203.
4. Kolmer, W. (1921). Das "Sagittalorgan" der Wirbeltiere. Z. Anat. Entwicklungsgesch. *60*, 652–717.
5. Agduhr, E. (1922). Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. Z. Anat. Entwicklungsgesch. *66*, 223–360.
6. Vígh, B., Manzano e Silva, M.J., Frank, C.L., Vincze, C., Czirok, S.J., Szabó, A., Lukáts, A., and Szél, A. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. Histol. Histopathol. *19*, 607–628.
7. Stoeckel, M.-E., Uhl-Bronner, S., Hugel, S., Veinante, P., Klein, M.-J., Mutterer, J., Freund-Mercier, M.-J., and Schlichter, R. (2003). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. J. Comp. Neurol. *457*, 159–174.
8. Orts-Del'Immagine, A., Seddik, R., Tell, F., Airault, C., Er-Raoui, G., Najimi, M., Trouslard, J., and Wanaverbecq, N. (2016). A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. Neuropharmacology *101*, 549–565.
9. Djenoune, L., Khabou, H., Joubert, F., Quan, F.B., Nunes Figueiredo, S., Bodineau, L., Del Bene, F., Burcklé, C., Tostivint, H., and Wyart, C. (2014). Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates. Front. Neuroanat. *8*, 26.
10. Fidelin, K., Djenoune, L., Stokes, C., Prendergast, A., Gomez, J., Baradel, A., Del Bene, F., and Wyart, C. (2015). State-dependent modulation of locomotion by GABAergic spinal sensory neurons. Curr. Biol. *25*, 3035–3047.
11. 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.
12. Böhm, U.L., Prendergast, A., Djenoune, L., Figueiredo, S.N., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., Charpentier, M., et al. (2016). CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. Nat. Commun. *7*, 10866.
13. Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., and Grillner, S. (2016). Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. Nat. Commun. *7*, 10002.
14. Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Wallén, P., and Grillner, S. (2016). The spinal cord has an intrinsic system for the control of pH. Curr. Biol. *26*, 1346–1351.
15. Sternberg, J.R., Prendergast, A.E., Brosse, L., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Orts-Del'Immagine, A., Castillo, L., Djenoune, L., Kurisu, S., McDearmid, J.R., et al. (2018). Pkd2l1 is required for mechanoception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. Nat. Commun. *9*, 3804.
16. Orts-Del'Immagine, A., and Wyart, C. (2017). Cerebrospinal-fluid-contacting neurons. Curr. Biol. *27*, R1198–R1200.
17. Grillner, S., and Jessell, T.M. (2009). Measured motion: searching for simplicity in spinal locomotor networks. Curr. Opin. Neurobiol. *19*, 572–586.
18. Ye, W., Chang, R.B., Bushman, J.D., Tu, Y.-H., Mulhall, E.M., Wilson, C.E., Cooper, A.J., Chick, W.S., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T., et al. (2015). The K + channel K IR 2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *113*, E229–E238.
19. Li, Y., Stam, F.J., Aimone, J.B., Goulding, M., Callaway, E.M., and Gage, F.H. (2013). Molecular layer perforant path-associated cells contribute to feed-forward inhibition in the adult dentate gyrus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110*, 9106–9111.
20. Daigle, T.L., Madisen, L., Hage, T.A., Valley, M.T., Knoblich, U., Larsen, R.S., Takeno, M.M., Huang, L., Gu, H., Larsen, R., et al. (2018). A suite of transgenic driver and reporter mouse lines with enhanced brain-cell-type targeting and functionality. Cell *174*, 465.e22. 480.e22.
21. Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2009). Chapter six hox networks and the origins of motor neuron diversity. In Current Topics in Developmental Biology (Elsevier Inc.), pp. 169–200.
22. Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J.F., Brownstone, R.M., Jessell, T.M., and Miles, G.B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. Neuron *64*, 645–662.
23. Pillai, A., Mansouri, A., Behringer, R., Westphal, H., and Goulding, M. (2007). Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord. Development *134*, 357–366.
24. Al-Mosawie, A., Wilson, J.M., and Brownstone, R.M. (2007). Heterogeneity of V2-derived interneurons in the adult mouse spinal cord. Eur. J. Neurosci. *26*, 3003–3015.
25. Bikoff, J.B., Gabitto, M.I., Rivard, A.F., Drobac, E., Machado, T.A., Miri, A., Brenner-Morton, S., Famojure, E., Diaz, C., Alvarez, F.J., et al. (2016).

Spinal inhibitory interneuron diversity delineates variant motor microcircuits. Cell *165*, 207–219.

26. Morikawa, Y., Hisaoka, T., and Senba, E. (2009). Characterization of Foxp2-expressing cells in the developing spinal cord. Neuroscience *162*, 1150–1162.
27. Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J.M., Berenyi, A., Fujisawa, S., Hsu, Y.W.A., Garcia, A.J., Gu, X., Zanella, S., et al. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. Nat. Neurosci. *15*, 793–802.
28. Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., and Svoboda, K. (2007). Channelrhodopsin-2–assisted circuit mapping of long-range callosal projections. Nat. Neurosci. *10*, 663–668.
29. Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J.O.O., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.-K.K., Young, J.A.T.T., and Callaway, E.M. (2007). Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. Neuron *53*, 639–647.
30. Lavin, T.K., Jin, L., Lea, N.E., and Wickersham, I.R. (2020). Monosynaptic tracing success depends critically on helper virus concentrations. Front. Synaptic Neurosci. *12*, 6.
31. Djenoune, L., Desban, L., Gomez, J., Sternberg, J.R., Prendergast, A., Langui, D., Quan, F.B., Marnas, H., Auer, T.O., Rio, J.-P.P., et al. (2017). The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes. Sci. Rep. *7*, 719.
32. Jurčić, N., Michelle, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., and Kastner, A. (2021). Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. Eur. J. Neurosci. *54*, 4781–4803.
33. Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., and Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. Nat. Methods *2*, 419–426.
34. Mendes, C.S., Bartos, I., Márka, Z., Akay, T., Márka, S., and Mann, R.S. (2015). Quantification of gait parameters in freely walking rodents. BMC Biol. *13*, 50.
35. Gruner, J.A., and Altman, J. (1980). Swimming in the rat: analysis of locomotor performance in comparison to stepping. Exp. Brain Res. *40*, 374–382.
36. Pocratsky, A.M., Shepard, C.T., Morehouse, J.R., Burke, D.A., Riegler, A.S., Hardin, J.T., Beare, J.E., Hainline, C., States, G.J., Brown, B.L., et al. (2020). Long ascending propriospinal neurons provide flexible, context-specific control of interlimb coordination. eLife *9*, 1–24.
37. Akay, T., and Murray, A.J. (2021). Relative contribution of proprioceptive and vestibular sensory systems to locomotion: opportunities for discovery in the age of molecular science. Int. J. Mol. Sci. *22*, 1–18.
38. Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., and Ninomiya, Y. (2011). Sour taste responses in mice lacking PKD channels. PLoS One *6*, e20007.
39. Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G. (2000). Chlamydomonas IFT 88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg 737, are required for assembly of cilia and flagella. J. Cell Biol. *151*, 709–718.
40. Haycraft, C.J., Zhang, Q., Song, B., Jackson, W.S., Detloff, P.J., Serra, R., and Yoder, B.K. (2007). Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. Development *134*, 307–316.
41. Orts-Del'Immagine, A., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Roussel, J., Baskaran, A., Langui, D., Koëth, F., Bivas, P., Lejeune, F.-X.X., Bardet, P.-L.L., et al. (2020). Sensory neurons contacting the cerebrospinal fluid require the reissner fiber to detect spinal curvature *in vivo*. Curr. Biol. *30*, 827.e4. 839.e4.
42. Grillner, S., and El Manira, A. (2020). Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. Physiol. Rev. *100*, 271–320.
43. Rudomin, P., and Schmidt, R.F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. Exp. Brain Res. *129*, 1–37.
44. Wu, M.-Y., Carbo-Tano, M., Mirat, O., Lejeune, F.-X., Roussel, J., Quan, F.B., Fidelin, K., and Wyart, C. (2021). Spinal sensory neurons project onto the hindbrain to stabilize posture and enhance locomotor speed. Curr. Biol. *31*, 3315.e5. 3329.e5.
45. Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. Nat. Neurosci. *13*, 133–140.
46. 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.
47. Skarlatou, S., Hérent, C., Toscano, E., Mendes, C.S., Bouvier, J., and Zampieri, N. (2020). Afadin signaling at the spinal neuroepithelium regulates central canal formation and gait selection. Cell Rep. *31*, 107741.
48. Zampieri, N., Jessell, T.M., and Murray, A.J. (2014). Mapping sensory circuits by anterograde transsynaptic transfer of recombinant rabies virus. Neuron *81*, 766–778.
49. Dewitz, C., Pimpinella, S., Hackel, P., Akalin, A., Jessell, T.M., and Zampieri, N. (2018). Nuclear organization in the spinal cord depends on motor neuron lamination orchestrated by Catenin and Afadin function. Cell Rep. *22*, 1681–1694.
50. R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing). http://www.R-project.org/.
51. Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A., and Ueda, H.R. (2015). Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. Nat. Protoc. *10*, 1709–1727.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
chicken anti-GFP	Abcam	RRID:AB_300798
goat anti-ChAT	Millipore	RRID:AB_90650
goat-anti FoxP2	Abcam	RRID:AB_941649
mouse-anti acetylated Tubulin	Sigma	RRID:AB_609894
rabbit anti-Calbindin	Swant	D28-K
rabbit anti-dsRed	TaKaRa	RRID:AB_10013483
rabbit anti-Lhx1	Generated in the Jessell laboratory	RRID: AB_2827967
rabbit anti-Pkd2l1	Millipore	RRID:AB_571091
sheep anti-Chx10	Abcam	RRID:AB_302278
RNAscope probes		
Mm-Slc32a1-C2	ACD	319191-C2
Mm-Slc17a6-C3	ACD	319171-C3
Bacterial and Virus Strains		
AAV-TREtight-mTag BFP2-B19G	Viral Core Facility, Charite University Berlin	N/A
AAV-FLEX-splitTVA-EGFP-tTA	Viral Core Facility, Charite University Berlin	N/A
AAV-FLEX-TVAmCherry	Viral Core Facility, Charite University Berlin	N/A
RVΔG-mCherry/EnvA	Viral Core Facility, Charite University Berlin	N/A
RVΔG-GFP/EnvA	Viral Core Facility, Charite University Berlin	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Pkd2l1-IRES-Cre	Ye et al.[18]	MGI:6451758
RosaΦtdTomato (Ai14)	Madisen et al.[45]	MGI:3809524
RosaΦsynaptophysin-tdTomato (Ai34)	Daigle et al.[20]	MGI:4947243
RosaΦHTB	Li et al.[19]	MGI:5518925
RosaΦChR2 (Ai32)	Madisen et al.[27]	MGI:5013789
RosaΦDTR	Buch et al.[33]	MGI:3772576
Ift88^{fl}	Haycraft et al.[40]	MGI:3710185
Pkd2l1 -/-	Horio et al.[38]	MGI:5008611
Software and Algorithms		
MouseWalker	Mendes et al.[34]	N/A
R	R Development Core Team	RRID: SCR_000432
Deeplabcut	Mathis et al.[46]	https://github.com/AlexEMG/DeepLab
Arivis Vision 4D	Arivis AG	N/A
Imaris	Oxford Instruments	N/A

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to the lead contact, Niccolò Zampieri (niccolo.zampieri@mdc-berlin.de).

Material availability

All unique reagents generated in this study are available from the lead contact without restriction.

Data and code availability

- This study did not generate any unique dataset or code.

- Original data supporting the current study are available from the lead contact upon request.
- All additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the corresponding lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animal Experimentation Ethical Approval

All animal procedures were performed in accordance to European community Research Council Directives and were approved by the Regional Office for Health and Social Affaires Berlin (LAGeSo) under license number G148/17 and the French "Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône" (Project License Nr: APAFIS 17596; 2018111919329153. N.W. and License for the Use of Transgenic Animal Models Nr: DUO-5214).

Animal models

Mice were bred and maintained under standard conditions on a 12h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The day of birth was considered as postnatal day 1 (P1).

METHODS DETAILS

Ablation of CSF-cNs

To specifically ablate CSF-cNs *in vivo*, diphtheria toxin (DT; Sigma D0564) was administered intraperitoneally (50 mg.Kg^{-1}) at P40. Ablation efficiency was verified by staining for Pkd2l1.

Behavioral experiments

Mice were placed in the behavior room 30 min before starting the experiments, allowing them to acclimatize. Both sexes were included and for each test at least two representative videos with continuous movements were analyzed. For the *open field* test we used the ActiMot Infrared light beam activity monitor (TSE Systems). Two light-beam frames allowed to monitor X, Y and Z coordinates of the mouse. Animals were placed in the associated squared acrylic glass boxes (40 cm X 20 cm) and after 10 min of habituation time, spontaneous movements were monitored for 90 min. Data were evaluated with TSE supplied software. *Gait analysis* was performed as previously described.[47] Briefly, mice were placed on a customized acrylic glass walkway with surrounded LED lights to generate the internal reflection effect. A mirror under the walkway allows tracking of footprints and body outline with a high-speed camera (shutter speed 5,56 ms, frame rate 150 f/sec). Representative videos with straight and continuous runs were analyzed using the open-source MouseWalker software. To evaluate balance, we used a customized *balance beam* with replaceable beams of different sizes. Animals were placed on one end and had to pass the beam spontaneously to reach a shelter on the other side. A mirror was placed underneath and a high-speed camera captured the passage. The *horizontal ladder* was customized with side walls made of acrylic glass to create a walking path and inserted metal rungs with 3 mm diameter. Rungs had a minimum distance of 1 cm and spacing of the rungs were modified by removing individual rungs. A mirror under the horizontal ladder and the clear walls allowed tracking from the side and underneath with a high-speed camera. Animals were required to pass the walking floor spontaneously and videos with continuous runs were analyzed. For the *swim task*, a custom-build acrylic glass tank (10 cm X 70 cm) filled with ambient temperature water was used. Mice had to swim through the tank to reach a platform on the other end. A mirror underneath allowed monitoring swim movements with a high-speed camera. The angle between body axis and water line was obtained by using the open-source program DeepLabCut.[46] The algorithm was trained to extract coordinates of nose and tail base in all frames. A value of likelihood allowed to estimate the reliability of detected coordinates and only frames with a likelihood superior to 0.9 were used for further analysis. The x/z coordinates of indicated points allowed the calculation of the swim angle between waterline and body axis.

Perfusion and tissue preparation

Anesthesia was induced by the intraperitoneal injection of ketamine (120 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). After testing the toe-pinch reflex, animals were intracardially perfused with 10 ml ice-cold PBS, followed by the perfusion of ice-cold 4 % PFA (pH 7.4). The spinal cords were exposed via laminectomy and post-fixed overnight in 4 % PFA (pH 7.4) at 4 °C. After washing for 5 min in PBS, tissue was incubated in 30% sucrose over night at 4 °C for cryoprotection. Samples were embedded in Optimal Cutting Temperature (O.C.T., Tissue-Tek) compound, frozen on dry ice and stored at -80 °C.

Slice preparation, electrophysiology and optogenetic stimulation

Pkd2l1::Cre; *Rosa-Φ-ChR2*(Ai32) or *Pkd2l1::Cre; Rosa-Φ-ChR2*(Ai32); *Rosa-Φ- Rosa-Φ-tdTomato*(Ai14) mice (2-4 week-old) were anesthetized with an intraperitoneal injection of a Ketamine/xylazine mixture (120/10 mg.Kg-^{1}) and perfused intracardiacally (>3-week-old) with an ice cold and oxygenated (95% O_2/5% CO_2) modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF, in mM: NaCl 75, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 33, KCl 3, $MgSO_4$ 7, sucrose 58, glucose 15, ascorbic acid 2, myo-inositol 3, sodium pyruvate 2, $CaCl_2$ 0.5, pH 7.4, 310 mosmol.Kg^{-1}). Following laminectomy and spinal cord extraction, lumbar spinal cord coronal slices (250 to 300 μm) were prepared, transferred in a submerged incubation chamber filled with oxygenated aCSF (in mM: NaCl 115, NaH_2PO_4

1.25, $NaHCO_3$ 26, KCl 3, $MgSO_4$ 2, glucose 15, ascorbic acid 2, myo-inositol 3, sodium pyruvate 2, $CaCl_2$ 2; pH 7.4, 300 mosmol.Kg-1) at 35° C for 15 min and subsequently at room temperature (20-25°C) until use. For recording, slices were transferred in the perfusion chamber (aCSF 2-4 mL.min^{-1}, 20-25°C) under an epifluorescence upright microscope equipped with a CCD camera (HQ2 CoolSnap, Photometrics). Electrodes (3-6 MΩ, borosilicate glass, Harvard Apparatus) were filled with a solution containing (in mM): K-gluconate 120, NaCl 5, HEPES 10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 0.25, EGTA 2, Mg-ATP 4, Na_2-phosphocreatine 10, Na_3-GTP 0.2 (pH 7.3, 295 mosmol.kg-1 and a chloride equilibrium potential (E_{Cl}) set at -60 mV) and 20 μM AlexaFluor488 (Invitrogen). Neurons were identified in slices under infra-red DIC illumination (IR-DIC) and recorded in whole-cell patch-clamp configuration performed in voltage- (VC) and current-clamp (CC) modes using a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Device Inc.). Data were filtered at 2–2.4 kHz and digitized at 10 kHz using a Digidata 1322A interface driven by pClamp 9.2 (Molecular Device Inc.). Neuron intrinsic and firing properties were determined using -10 mV voltage steps (V_{Step}) from a holding potential (V_h) of -70 mV (VC) or current injection pulses (CC) from the resting membrane potential (RMP). Validation of the optogenetic approach was performed by recording Channelrhodopsin-2 (ChR2) expressing CSF-cN in VC or CC mode and ChR2 activation elicited using light pulses delivered through the objective (60x, NA 0.9; pUltra 300 CoolLED: 490 nm, with controlled power and duration). CSF-cN were recorded either in VC mode (V_h -70 mV) to characterize ChR2 photocurrent properties and voltage-dependance (V_{Step} from -90 to +10 mV, 200 ms at V_h -70 mV) or in CC mode at RMP to assess light-triggered action potentials (APs) firing. Synaptic currents were photo-evoked in CSF-cN and interneurons with 10 ms light pulses in control and in the presence of 1 μM strychnine (Sigma-Aldrich), 20 μM DNQX either alone or with 10 μM gabazine and 100 μM picrotoxin (Gbz and Ptx, BioTechne, UK). In all recordings, the liquid junction potential was left uncorrected.

Immunohistochemistry

For histology, spinal cords were with a cryostat (Leica) collected on Superfrost Plus® microscope slides (Thermo Fisher Scientific). Primary and secondary antibodies were diluted in 4 % BSA in 0.3 % TritonX in PBS. Slides were mounted with Vectashield (Vector). The following primary antibodies dilutions have been used: chicken anti-GFP (1/1000, Abcam), goat anti-ChAT (1/200; Millipore), goat-anti FoxP2 (1/200, Abcam), mouse anti-acetylated Tubulin (1/500, Sigma), rabbit anti-Calbindin (1/500, Swant), rabbit anti-dsRed (1/1000; TaKaRa), rabbit anti-Lhx1(1/10000), generated in the Jessell laboratory), rabbit anti-Pkd21l1 (1/200; Millipore), sheep anti-Chx10 (1/100, Abcam). Images were taken with a Zeiss LSM800 confocal laser scanning microscope.

Viral tracings

Intraspinal injections were performed as previously described.[48] For analgesia, mice were subcutaneously injected with 5 mg.Kg^{-1} Carprofen 30 min before surgery. Anesthesia was induced with continuous inhalation of isoflurane (2-3 %) in oxygen (1.5 %), using an isoflurane vaporizer (Parkland Scientific). Dorsal laminectomy was performed to expose the lumbar spinal cord prior to virus injection using a pulled borosilicate glass pipette (World Precision Instruments, Inc.) and a micro syringe pump injector (Smart Touch). For AAV, either a cocktail of AAV-TREtight-mTag BFP2-B19G (4.48*10^{12} VG/mL) and AAV-FLEX-SPLIT TVA-EGFP-tTA (5.79*10^{10} VG/mL) was injected. A total amount of 300 nl of virus was inoculated into two adjacent spots bilaterally 40 μm left and right to the midline. After three weeks we performed intraspinal injection of 300 nl RVΔG(EnvA)-mCherry (1.94*10^{8} IU/mL) at the same position and animals were sacrificed seven days after. To analyze directionality of CSF-cN projections, we injected AAV-FLEX-TVAmCherry (5.33*10^{13} VG/mL) at L1, followed three weeks later by injection of RVΔG-GFP/EnvA (2.13*10^{8} IU/mL) either more caudally or rostrally. Mice which postmortem revealed low viral labeling or a spread into the central canal were excluded from analysis.

Fluorescent in situ hybridization

For mRNA detection via multiplex RNAscope, a modified protocol from Advanced Cell Diagnostics (ACD, 322360-USM) was used. Briefly, fixed spinal cord tissue was prepared and sectioned as described before. Spinal sections were post-fixed in 4 % PFA (pH 7.4) at 4 °C for 15 min. After washing and dehydration (at 4 °C in 50%, 70% and 100% Ethanol), a hydrophobic barrier was created around sections. After incubation with 3 % hydrogen peroxide solution (H_2O_2) at RT for 15 min, Protease IV treatment followed for 30 min at RT. C2 and C3 probes were dilutes 1/50 in sample diluent and hybridized for 2 hours at 40°C in a humid chamber in a HybEZ oven. For signal amplification and detection, the RNAscope 2.5 HD Reagents Detection Kit-RED (ACD, 32360) was used according to the manufacturer's instructions. After Detection of each channel, immunostaining was performed as described before and slices were mounted with ProLong Gold.

Positional analysis

Three-dimensional positional analysis was performed as previously described.[49] Spinal cords were sectioned in 40 μm slices and cartesian coordinates of spinal neurons per section were obtained using the imaging software IMARIS. Data were normalized to account for differences in spinal cord size and shape. The position of each neuron was digitally reconstructed by plotting the data in 'R',[50] using a customized script. Correlation analysis have been done using the ''corrplot'' package to calculates the comparability of experiments using the Pearson correlation coefficient. Datasets were clustered hierarchically.

Electron microscopy

Mice were perfused with 4 % (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Spinal cord was dissected and 2-3 mm^3 cubes were fixed by immersion in 4 % (w/v) paraformaldehyde and 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 2 hours at room

temperature (RT). Samples were postfixed with 1% (v/v) osmium tetroxide for 3 hours at RT, dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in PolyBed® 812 resin (Polysciences, Germany). Ultrathin sections (60-80 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 80 kV with a Zeiss EM 910 electron microscope. Acquisition was done with a Quemesa CCD camera using iTEM software (Emsis GmbH, Germany).

Tissue clearing and light-sheet microscopy

Mice were anesthetized and transcardially perfused as described above. Spinal cord was extracted after ventral laminectomy and fixed in 4% PFA for 2 days at 4°C. Tissue clearing was performed as previously described with modifications.[51] In short, tissue was transferred to CUBIC1 (25 wt% Urea, 25 wt% N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl) ethylenediamine, 15 wt% Triton X-100) and incubated at 37°C shaking. Every other day CUBIC1 solution was exchanged until tissue appeared transparent (∼ 4 days). Afterwards, samples were washed for 1 day with PBS at RT, refractive index matched with EasyIndex (LifeCanvas Technologies) at 37°C and imaged with the ZEISS Light-sheet Z.1. For image analysis and video rendering Arivis Vision 4D (Arivis AG) and Imaris (Oxford Instruments) was used.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

For behavior experiments, mice were randomly allocated into different experimental groups and data have been randomized before analysis whenever possible. Quantifications represent the average of at least three biological replicates per condition. Each dot represents one animal and error bars in all figures represent mean ± SEM. For electrophysiological experiments, data are presented as mean ± standard deviation (SD) and graphs represent box-whisker plot using Tukey's method where single dots represent outliers. Because the data are not normally distributed (Shapiro-Wilk test), statistical significance was tested using non-parametric statistical tests: Wilcoxon signed-rank (comparison of two conditions within a group) or Kruskal-Wallis (χ^2, degree of freedom (df) and p-value, multiple comparisons, with a post-hoc pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test) tests. Number of samples (n) and the applied statistical test used for individual experiments are indicated in the figure legends. Significance was defined as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel, GraphPad Prism and RStudio statistics (Version 8, GraphPad Software, RStudio v1.1.456).