



Les neurones en marche

L'organisation des réseaux locomoteurs de la moelle épinière mise à jour par la génétique

Julien Bouvier

Mammalian locomotor laboratory, Neuroscience Department, Karolinska Institutet, Retziusväg 8, 17177 Stockholm, Suède.
julien.bouvier@ki.se

> Chez tous les vertébrés, les mouvements de la marche requièrent le recrutement rythmique et séquentiel d'une multitude de muscles répartis de chaque côté du corps. La genèse du rythme ainsi que sa mise en forme en une activité nerveuse qui définit la séquence des contractions musculaires sont assurées par des neurones de la moelle épinière organisés en un réseau formant un « générateur central de rythme et de mise en forme » (ou CPG pour *central pattern generator*). Décrypter l'organisation fonctionnelle du CPG locomoteur et les déterminants génétiques qui contrôlent son assemblage sont des enjeux majeurs en neurosciences. Ces études établissent un schéma d'organisation liant gènes et fonctions, qui sera utile aux cliniciens pour mieux définir certaines conditions pathologiques et élaborer les thérapies dédiées à la réhabilitation des fonctions motrices.

CPG locomoteur et coordination bilatérale

Les études récentes chez le rongeur ont amplement documenté les mécanismes à l'origine de la genèse du rythme locomoteur [1]. Des interneurons excitateurs de la moelle épinière ventrale élaborent, en réponse à une activation par les centres locomoteurs supra-spinaux, des décharges rythmiques synchrones et entretenues. À partir de ce rythme est établi un *pattern*, c'est-à-dire une mise en forme, une distribution séquentielle de l'activité nerveuse aux différents

groupes musculaires afin d'assurer la coordination des mouvements. La coordination bilatérale, c'est-à-dire entre les membres situés à droite et à gauche du corps, est un exemple frappant de mise en forme, qui illustre le côté à la fois prédéterminé et adaptable du comportement (et donc du CPG). En effet, la plupart des espèces présentent un mode de coordination bilatérale prépondérant : le lapin se déplace par bonds conditionnés par des contractions synchrones des mêmes muscles au sein des membres droits et gauches, alors que la souris, comme la plupart des mammifères terrestres, présente au contraire des mouvements bilatéraux essentiellement alternés. Pour autant, cette dernière adopte occasionnellement une coordination synchronisée lors du bond ou de la fuite. Une telle complexité des démarches est particulièrement exacerbée chez le cheval, qui met en jeu des modes de coordination bilatérale distincts au pas, au trot et au galop. Ces observations soulèvent des questions majeures sur l'organisation du CPG locomoteur dont beaucoup restent à documenter. Existe-t-il des circuits neuronaux dédiés à chaque type de démarche et comment sont-ils sélectionnés ? Un déterminisme génétique peut-il expliquer les variations entre espèces ?

Génétique du développement et neurophysiologie

Répondre à ces questions requiert la manipulation sélective de groupes neu-

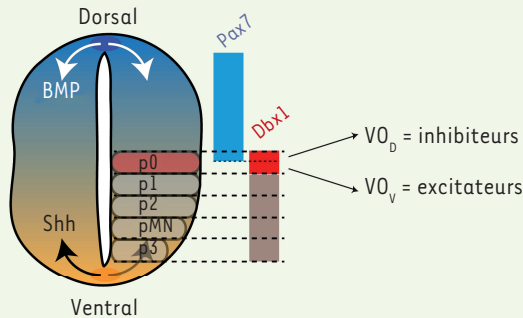
ronaux distincts au sein du CPG locomoteur, une tâche longtemps rendue difficile par la nature enchevêtrée des populations spinales. Les avancées de la génétique du développement ont ouvert de nouvelles voies méthodologiques prometteuses [2, 3]. En particulier, la production des différents types neuronaux apparaît largement codée génétiquement pendant le développement embryonnaire sur la base de l'expression combinatoire de facteurs de transcription au sein des progéniteurs neuronaux [4] (Figure 1A). En manipulant ces gènes de développement chez l'animal, il est ainsi possible de visualiser, tracer, ou même éliminer, avec une précision jamais atteinte auparavant, des populations neuronales choisies (dont les neurones individuels ont une origine développementale commune), et de révéler ainsi leur connectivité et leur rôle fonctionnel. Dans cette étude menée par le Professeur Ole Kiehn à Stockholm et en collaboration avec des équipes françaises, nous avons mis en œuvre ces outils pour l'étude des neurones impliqués dans la coordination bilatérale des membres postérieurs lors de la marche spontanée chez la souris [5].

Les neurones commissuraux dits V0 assurent l'alternance bilatérale

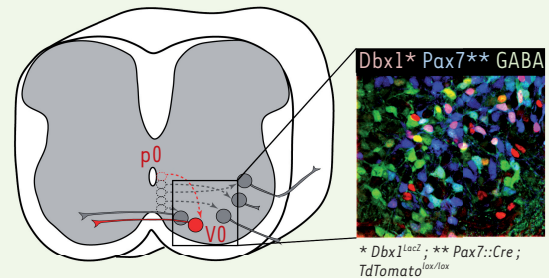
Chez la souris, l'alternance bilatérale est la démarche prépondérante. Le modèle classique proposait que cette alternance soit le reflet d'une inhibition mutuelle des CPG droit et gauche *via* des neurones

A Facteurs de transcription et diversité neuronale

Domaines organisés de progéniteurs distincts au sein du tube neural embryonnaire

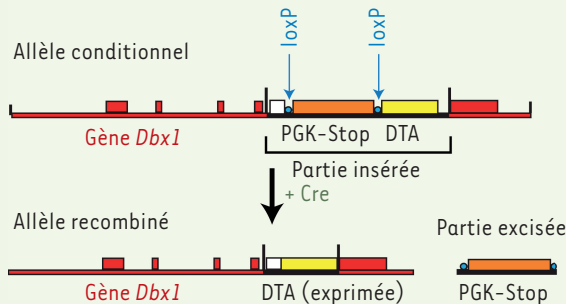


Types neuronaux distincts, enchevêtrés au sein de la moelle épinière



B Approche de génétique intersectionnelle

Lignée floxée : *Dbx1^{lox-stop-lox-DTA}*



Lignée Cre

E1Ngn2::Cre
HoxB8::Cre
Pax7::Cre
Vglut2::Cre

Ablation conditionnelle ciblée

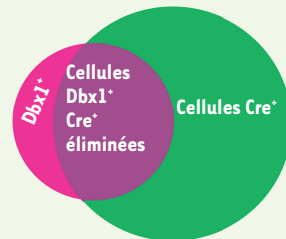


Figure 1. Génétique du développement et génétique intersectionnelle chez la souris. **A.** En réponse à des gradients moléculaires (BMP, Shh), les progéniteurs neuronaux s'organisent en domaines caractérisés par l'expression combinatoire de facteurs de transcription. Les progéniteurs exprimant *Dbx1* définissent le domaine p0, lui-même divisé en sous-domaines ventraux et dorsaux sur la base de l'expression de *Pax7*. De ces domaines organisés dérivent les différents types cellulaires de la moelle épinière. **B.** Une première lignée de souris porte, au sein du gène *Dbx1*, une insertion permettant l'expression conditionnelle d'un allèle d'intérêt, ici la toxine diphtérique A (DTA). Après excision des séquences « stop » par une enzyme (la Cre), la DTA sera exprimée (allèle recombiné) et engendrera l'élimination de la cellule. La Cre, absente du génome murin, est apportée par croisement avec une seconde lignée génétiquement modifiée, autorisant ainsi l'ablation des cellules exprimant à la fois *Dbx1* et le gène contrôlant l'expression de la Cre.

commissuraux inhibiteurs, c'est-à-dire dont l'axone croise la ligne médiane et fait une synapse inhibitrice du côté controlatéral [1, 2]. Pour autant, ce schéma est longtemps resté hypothétique, et la nature des différentes populations commissurales impliquées dans l'élaboration des différents types de démarches restait peu documentée. En raison de leur positionnement dans la moelle ventrale et de leur nature largement commissurale, nous nous sommes intéressés aux neurones dits V0, dérivés des progéniteurs exprimant le facteur de transcription *Dbx1* [6] (progéniteurs dits p0, Figure 1A). Pour définir leur rôle fonctionnel, nous les avons manipulés par une approche de génétique dite intersectionnelle [7] (Figure 1B).

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'élimination complète des neurones V0 sélectivement dans la moelle épinière, en épargnant ceux du tronc cérébral qui jouent un rôle vital dans la genèse du rythme respiratoire [8, 9]. Les mutants obtenus respirent donc et présentent un phénotype locomoteur surprenant : s'ils sont bien capables de se déplacer, leurs membres inférieurs droits et gauches, à la différence de ceux des souris sauvages, ne peuvent pas se mouvoir en alternance. Au contraire, ils sont parfaitement synchronisés et l'animal se déplace, quelque soit sa vitesse, à la manière d'un lapin (Figure 2A, B). Ces observations démontrent que l'élaboration de l'alternance bilatérale est impu-

table aux seuls neurones commissuraux V0. En leur absence, le CPG locomoteur est uniquement capable d'élaborer des mouvements synchrones, indiquant en outre la présence d'un circuit synchronisateur indépendant des neurones V0.

L'inhibition directe n'explique pas tout

Bien que par définition tous dérivés du même groupe de progéniteurs p0 exprimant *Dbx1*, les neurones V0 comprennent un contingent inhibiteur et un contingent exciteur [10]. L'hypothèse la plus simple propose que le phénotype locomoteur décrit ci-dessus soit imputable aux V0 inhibiteurs, source d'inhibition réciproque directe ; nous avons donc réalisé leur élimination sélective.

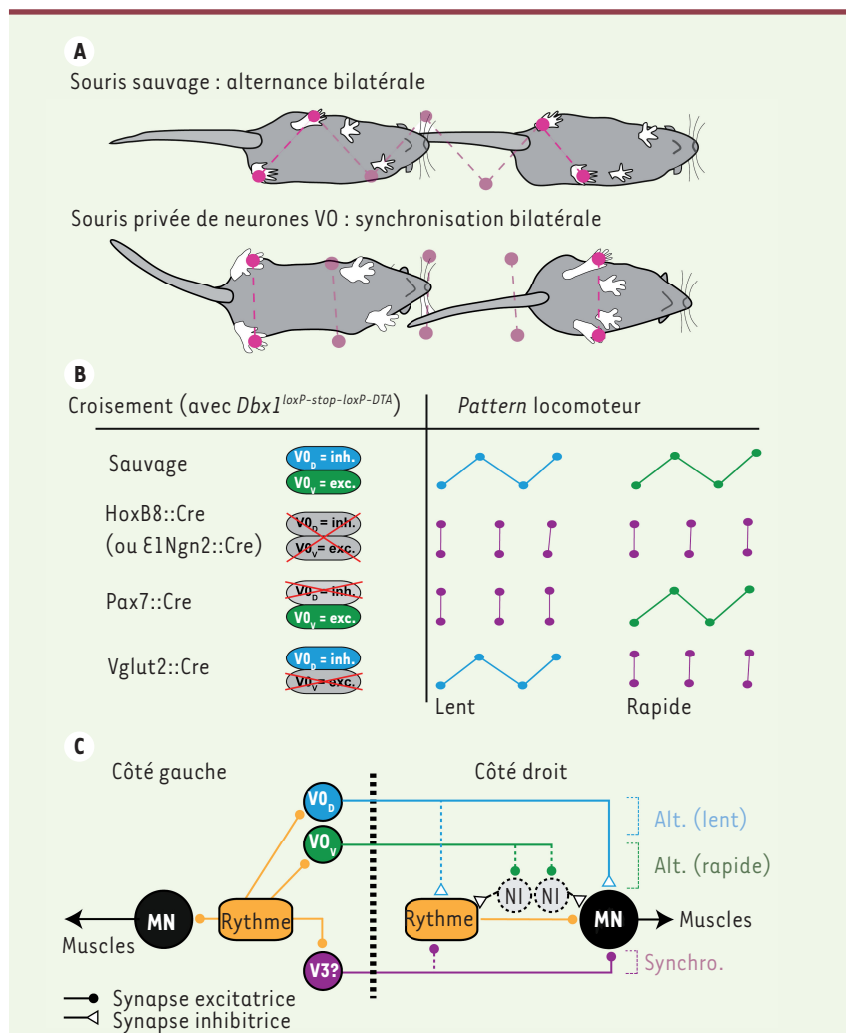


Figure 2. Rôle des neurones VO dans l'alternance bilatérale. **A.** L'animal se déplaçant dans un couloir transparent est filmé, et les mouvements des membres inférieurs recueillis et analysés. La perte complète des neurones VO entraîne des mouvements anormalement synchronisés. **B.** Les croisements de la lignée $Dbx1^{loxP-stop-loxP-DTA}$ (voir Figure 1) avec diverses lignées Cre conduisent à l'élimination complète des neurones VO dans la moelle épinière ($HoxB8::Cre$), ou ciblée des contingents inhibiteurs ($Pax7::Cre$) et excitateurs ($Vglut2::Cre$). Les phénotypes locomoteurs résultants illustrent le rôle de chaque population dans l'alternance bilatérale à différentes vitesses. **C.** Représentation schématisée simplifiée des circuits commissuraux au sein du CPG locomoteur. L'activité rythmique est transmise aux motoneurons (MN) ipsilatéraux ainsi qu'au réseau en charge de la mise en forme ou *pattern*. L'étude révèle une organisation duelle des circuits qui assurent l'alternance bilatérale : les VO_D inhibiteurs sont requis aux vitesses lentes uniquement, et procurent vraisemblablement l'inhibition controlatérale directe. Les VO_V excitateurs sont recrutés aux fréquences les plus rapides, et procureraient une inhibition indirecte *via* des interneurons inhibiteurs (NI).

Nous avons tout d'abord montré que les neurones VO inhibiteurs, dits VO_D , sont spécifiquement dérivés du sous-groupe de progéniteurs $Dbx1^+$ qui coexpriment également le facteur de transcription $Pax7$ (Figure 1A). Ainsi, nous avons pu obtenir des animaux sélectivement privés des VO_D inhibiteurs (Figures 1B, 2B). Ces mutants, à l'image de ceux décrits ci-dessus, sont incapables de produire des décharges bilatérales alternées des nerfs locomoteurs en conditions normales. En revanche, en augmentant pharmacologiquement la fréquence du rythme locomoteur, nous avons observé que l'activité des racines nerveuses devenait largement alternée. Tout se passe donc comme si ces animaux présentaient une démarche anormalement synchronisée aux vitesses les plus lentes,

mais retrouvaient une démarche normalement alternée aux vitesses les plus élevées (Figure 2B). Autrement dit, les neurones commissuraux VO_D inhibiteurs sont bien requis aux vitesses lentes et modérées. En revanche, aux vitesses rapides, le réseau est capable de produire, en leur absence, un *pattern* d'alternance. Quelles sont donc les populations neuronales commissurales susceptibles de prendre le relais à ces vitesses ?

Le rôle inattendu des commissures excitatrices

Les neurones VO épargnés, les neurones dits VO_V , apparaissent donc comme candidats à l'élaboration de l'alternance aux vitesses rapides, malgré leur nature largement excitatrice (comme l'illustre

l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate $Vglut2$). Pour le vérifier, nous avons obtenu des animaux privés sélectivement des neurones VO_V et analysé les conséquences sur l'élaboration de la démarche locomotrice. Fait remarquable, ces animaux présentent, à la fois *in vivo* et *in vitro*, un phénotype locomoteur inverse de celui décrit ci-dessus après l'élimination des VO_D inhibiteurs : les membres inférieurs droits et gauches alternent maintenant aux vitesses lentes et modérées, puis adoptent une coordination bilatérale synchronisée lorsque l'animal se déplace plus rapidement (Figure 2B). Ces observations indiquent donc que les commissures VO_V excitatrices, qui ne sont pas requises pour élaborer un *pattern* d'alternance aux vitesses de locomotion lentes, deviennent indispensables aux vitesses les plus élevées.

