



HAL
open science

Développement postnatal d'un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique : Acquisitions sensori-motrices, fonctionnement des réseaux lombaires et caractérisation des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones.

Julien Amendola

► To cite this version:

Julien Amendola. Développement postnatal d'un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique : Acquisitions sensori-motrices, fonctionnement des réseaux lombaires et caractérisation des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2008. Français. NNT : . tel-00537888

HAL Id: tel-00537888

<https://theses.hal.science/tel-00537888>

Submitted on 19 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Laboratoire de physio-pathologie et plasticité de la motricité (P₃M), UMR-6196, CNRS, Marseille.

**Développement postnatal d'un modèle murin de sclérose latérale
amyotrophique :**

Acquisitions sensori-motrices, fonctionnement des réseaux lombaires et
caractérisation des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones.

T H E S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

par **Julien AMENDOLA**

le 02 Décembre 2008

Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE de la MEDITERRANEE

SPECIALITE : NEUROSCIENCES

Membres du Jury de la Thèse :

Mme Ginette Bossavit, Directrice de Recherche, CNRS, Paris (rapporteur)

M. John Simmers, Directeur de Recherche, CNRS, Bordeaux (rapporteur)

M. Jacques Durand, Chargé de Recherche, CNRS, Marseille (directeur de thèse)

M. Jean-Philippe Loeffler, Directeur de Recherche, INSERM, Strasbourg (examineur)

M. Jean Pouget, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Marseille (président du jury)

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse Jacques Durand, pour avoir initié ce travail, pour la confiance témoignée et pour les directions vers lesquelles il m'a orienté. Je tiens surtout à le remercier pour les qualités humaines dont il a fait preuve et plus particulièrement lors des quinze derniers mois dans les circonstances singulières de travail qu'étaient les miennes....

Je remercie Ginette Bossavit et John Simmers d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail auprès de l'université. Je remercie également Jean-Philippe Loeffler d'avoir siégé dans le jury ainsi que le Professeur Jean Pouget pour en avoir assumé la fonction de président.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, qui ont participé de près ou de loin à la réussite de cette thèse. Je remercie le laboratoire P3M dans son ensemble et son directeur Laurent Vinay (mon « voisin de bureau »), avec qui nous avons beaucoup discuté de divers sujets, souvent assez scientifiques, dont un de la plus capitale importance...le foot (euh en d'autres termes l'Ohème). Parmi les membres du labo, je remercie particulièrement Sylvie Liabeuf et Cécile Brocard pour leur aide précieuse dans la révélation des marquages. Par contre je demande pardon à Arnaud Pambo-Pambo mon « colocataire » de bureau pour l'avoir enfermé à clé 1247 fois depuis le début de son Master. Courage Arnaud pour la fin.

Un grand merci à Pierre Roubertoux pour m'avoir familiarisé avec les tests comportementaux.

Comme j'en ai assez de dire merci, j'ai une pensée affectueuse pour Céline Jean-Xavier avec qui nous avons partagé les hauts et les bas de nos thèses respectives. Je n'oublierai pas que pour te démarquer, tu as tout fait pour soutenir une misérable petite semaine avant moi (c'est petit...tout petit).

Merci à l'association française contre les myopathies (AFM) de m'avoir apporté un soutien financier sans lequel je n'aurai jamais pu finir ce travail.

Je termine les remerciements par mes parents qui m'ont permis de faire des études universitaires et encouragé dans cette voie.

Enfin je cherche pour ma femme, Raphaëlle, un mot autre que « merci » car ce mot n'est pas assez fort pour dire tout ce que je te dois. Cette thèse est en partie la tienne !

à Lauris et Raphaëlle

RESUME

Les études sur les souris transgéniques SOD1 utilisées comme modèle de sclérose latérale amyotrophique (SLA) montrent que les signes cliniques apparaissent quand la majorité des motoneurons (MNs) est déjà déconnectée de la périphérie et la force contractile de certains muscles diminuée de 80%. L'identification des mécanismes pathologiques précoces est une étape importante pour améliorer notre compréhension de la maladie et expliquer l'atteinte préférentielle des MNs observée pendant la SLA. Notre objectif était de rechercher la présence d'anomalies précoces dès la naissance dans un modèle souris de SLA. L'analyse comportementale suggère que dès la période postnatale, la mutation SOD1-G85R perturbe la maturation du système sensori-moteur des souris transgéniques et ralentit l'expression de réflexes moteurs comme le montrent les retards observés lors des tests de placement et d'agrippement des membres postérieurs et lors du test de retournement. Ces retards pourraient principalement résulter d'un dysfonctionnement des réseaux lombaires de la moelle épinière pendant la 1^{ère} semaine postnatale. Pendant cette période, sur les préparations *in vitro* de moelle épinière / tronc cérébral, les réseaux lombaires SOD1 sont difficilement activables lors d'applications pharmacologiques. Les enregistrements électrophysiologiques réalisés pendant cette période appuient principalement la possibilité que la composante glutamatergique possède un rôle clé dans cette difficulté. Nos données suggèrent la possibilité d'un déséquilibre entre les récepteurs AMPA et NMDA dans les MNs SOD1 avec un défaut lors de l'activation des récepteurs NMDA. En 2^{ème} semaine postnatale, les MNs lombaires SOD1 sont hypoexcitables et présentent une résistance d'entrée ainsi qu'un gain plus faibles. Nous montrons que l'augmentation anormale de la surface dendritique de ces MNs suffit à expliquer cette diminution de la résistance d'entrée alors que la baisse du gain indique plutôt des modifications de conductances ioniques qui restent à caractériser. Enfin l'analyse morphologique montre que les dendrites des motoneurons SOD1 sont anormalement développées et complexes. Il est important de souligner dans le cadre de la maladie que les segments de la moelle sacrée et les interneurons lombaires qui sont épargnés à l'âge adulte ne sont pas concernés par ces différences. Cela renforce l'idée que les anomalies que nous décrivons sont spécifiques de la maladie et que dès le plus jeune âge les MNs sont la cible privilégiée de la SLA. Dans ce travail, nous montrons des dysfonctionnements des MNs bien avant la dénervation périphérique et la dégénérescence des axones moteurs. La modification de l'excitabilité des motoneurons pendant la période de maturation des unités motrices pourrait fragiliser les jonctions neuromusculaires qui sont une des cibles principales de la SLA.

LISTE DES PUBLICATIONS APPARENTEES A LA THESE

- Amendola J**, Durand J. Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J Comp Neurol* 511:329-341. (2008)
- Amendola J**, Gueritaud JP, d'Incamps BL, Bories C, Liabeuf S, Allene C, Pambo-Pambo A, Durand J. Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 145:311-323. (2007)
- Bories C, **Amendola J**, Lamotte d'Incamps B, Durand J. Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25:451-459. (2007)
- Durand J, **Amendola J**, Bories C, Lamotte d'Incamps B. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris* 99:211-220. (2006)
- Amendola J**, Verrier B, Roubertoux P, Durand J. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:2822-2826. (2004)

LISTE DES ABREVIATIONS

- $[Ca^{2+}]_{extra}$: concentration de calcium du milieu de perfusion.
- \sum_{Long} : longueur dendritique totale pour chaque motoneurone (μm).
- \sum_{Surf} : surface dendritique totale pour chaque motoneurone (μm^2).
- 5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine.
- AHP : after-hyper-polarization.
- AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid.
- A_{prim} : aire totale par motoneurone des sections formées sur le soma par les dendrites primaires (μm^2).
- A_{soma} : surface membranaire du soma (en μm^2).
- A_{trans} : aire du soma mesurée dans le plan transversal (μm^2).
- BDNF : Brain-Derived-Neurotrophic- Factor.
- BK : conductance potassique (big ou large-conductance channels).
- Brcmt : nombre de points de branchement pour chaque motoneurone.
- C_m : capacité membranaire (en pico-Farad).
- CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione.
- CPGs : Central Pattern Generators.
- D : dorsal.
- DA : dopamine.
- D-APV : acide D-amino-5-phosphonovalérique.
- Den : nombre de départs dendritiques pour chaque motoneurone.
- DL-TBOA (ou TBOA) : threo-B-benzyloxy-DL-aspartate.
- D_{prim} : diamètre moyen des dendrites primaires au départ du soma pour chaque motoneurone (μm).
- D_{soma} : diamètre du soma (en μm).
- EAAC1 : Excitatory-Amino-Acid-Carrier-1.
- EAAT (1-2-3) : Excitatory-Amino-Acid-Transporter (type 1, 2 ou 3).
- ER : enregistrement extracellulaire.
- FF : Fast Fatigable.
- F_{max} : fréquence maximale de décharge d'un motoneurone mesurée sur un créneau de courant.
- f_{max} : fréquence instantanée maximale de décharge d'un motoneurone mesurée entre les deux 1^{er} PA.
- FR : Fast Resistant.
- Frt_{max} : maximum feret du soma (en μm).
- Frt_{min} : minimum feret du soma (en μm).
- G37R, G85R : mutation du gène SOD1 entraînant le remplacement d'un résidu glycine G par un résidu arginine R en position 37 ou 85.
- G93A : mutation du gène SOD1 entraînant le remplacement d'un résidu glycine G par un résidu alanine A en position 93.
- GLAST : GLutamate-ASpartate-Transporter (aussi appelé EAAT1).
- GLT1 : GLutamate-Transporter (aussi appelé EAAT2).
- GluR(1-2) : Glutamate Receptor (type 1 et 2) (sous-unités des récepteurs AMPA).

HVA : High-Voltage-Activated ; conductance activée pour des potentiels très dépolarisés.

i.e. : id est = c'est à dire.

I_{50} : intensité à laquelle le motoneurone décharge à une fréquence égale à la moitié de la f_{max} .

$I_{début}$: intensité de courant pour laquelle le premier PA est enregistré lors de la rampe montante.

IE : intervalle Inter-Evénements.

IF : Intensité-Fréquence.

I_{fin} : intensité de courant pour laquelle le dernier PA est enregistré lors de la rampe descendante.

IGF-1 : Insulin like Growth Factor-1.

I_{max} : intensité de courant injectée pour que le motoneurone atteigne sa F_{max} .

I- Na_p : conductance sodique persistante.

Intensité $_{max}$ rampe : intensité de courant injectée au sommet de la rampe.

I_{rh} : courant de rhéobase.

IR : enregistrement intracellulaire.

IS : Initial Segment.

K/O : Knock-Out.

L : lombaire.

Loa : Legs at Odd Angles.

Long $_{max}$: plus grande longueur dendritique du soma à une terminaison pour chaque motoneurone (μm).

Long $_{moy}$: longueur dendritique moyenne du soma vers toutes les terminaisons pour chaque motoneurone (μm).

MK-801 : inhibiteur non compétitif des récepteurs NMDA.

MNs : motoneurones.

n.d. : non daté.

n.s. : non significatif.

NF : NeuroFilament.

NGF : Nerve-Growth-Factor.

NMA : N-méthyl-DL-aspartate.

NMDA: N-méthyl-D-aspartate.

NO : oxyde nitrique.

NT3 : NeuroTrophine (type 3)

Ord $_{max}$: ordre dendritique maximal pour chaque motoneurone.

Ord $_{moy}$: ordre dendritique moyen de tous les segments pour chaque motoneurone.

P : post-natal.

PA : Potentiel d'Action.

PA $_{max}$: amplitude maximal du potentiel d'action (en extracellulaire).

PA $_{seuil}$: seuil de déclenchement du potentiel d'action.

PBS : solution saline de tampon phosphate.

P $_{soma}$: périmètre du soma mesuré dans le plan transversal (μm).

RD: Racine Dorsale.

R $_{in}$: résistance d'entrée (en $M\Omega$).

ROS : espèce réactive oxygénée.

RV: Racine Ventrale.

SD : Somato-Dendritique.

Sgmt : nombre total de segments dendritiques par motoneurone.

SK : conductance potassique (small-conductance channels).

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique.

SLAf : Sclérose Latérale Amyotrophique familiale.

SLAs : Sclérose Latérale Amyotrophique sporadique.

SOD1 : Super Oxyde Dismutase 1.

SOD1^{hum} : Super Oxyde Dismutase 1 non mutée d'origine humaine.

TrmOrd_{moy} : ordre dendritique moyen des segments terminaux pour chaque motoneurone.

Trms : nombre de segments terminaux par motoneurone.

TTX : tétradotoxine.

V : Ventral.

WT : Wild-Type (sauvage).

τ_m : constante de temps membranaire (ms).

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
LISTE DES PUBLICATIONS APPARENTEES A LA THESE	2
LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION GENERALE	11
VUE D'ENSEMBLE SYNTHETIQUE SUR LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE.....	17
DIAGNOSTIC ET TABLEAU CLINIQUE.	19
ETIOLOGIE DE LA MALADIE.	21
LES FACTEURS DE RISQUE.....	23
LES SOURIS TRANSGENIQUES SOD1, MODELES DE SLA.....	24
Table A : modèle souris SOD1-G93A-G1H	28
Table B: modèle souris SOD1-G85R (homozygotes).....	29
LES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES CONNUS.....	30
▪ <i>Agrégats protéiques</i>	30
▪ <i>Stress oxydatif</i>	31
▪ <i>Accumulation de neurofilaments et perturbations du transport axonal</i>	32
▪ <i>Excitotoxicité du glutamate</i>	34
▪ <i>Perturbation de l'homéostasie calcique</i>	36
▪ <i>Rôle des cellules non neuronales dans la physiopathologie</i>	37
Les cellules musculaires.....	37
Les astrocytes.....	38
MATERIEL ET METHODES.....	41
1 - LA SOURIS C57BL /6J ET LE MODELE TRANSGENIQUE SOD1-G85R	43
2 - ANALYSE COMPORTEMENTALE	44
3 - PREPARATION MOELLE EPINIÈRE / TRONC CEREBRAL ISOLEE.	45
4 - ELECTROPHYSIOLOGIE	47
a) <i>Enregistrements extracellulaires des sorties motrices</i>	47
b) <i>Enregistrements intracellulaires des motoneurons et des interneurons</i>	48
c) <i>Pharmacologie</i>	49
d) <i>Méthode d'analyse des enregistrements électrophysiologiques</i>	50
o Analyse de l'activité spontanée.....	50
o Effet des substances pharmacologiques	51
o Propriétés électriques des motoneurons enregistrés en intracellulaire.....	51
5 - MARQUAGE INTRACELLULAIRE ET MORPHOLOGIE DES MOTONEURONES.....	56
a) <i>Protocole d'injection intracellulaire du marqueur neuronal</i>	57
b) <i>Reconstruction des motoneurons</i>	57

c) Les mesures morphométriques.....	59
d) Définition des paramètres mesurés.....	60
6 - MARQUAGE RETROGRADE.....	62
7 - ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	63

CHAPITRE I

DEVELOPPEMENT SENSORIMOTEUR DES SOURICEAUX WT ET SOD1..... 65

1 - INTRODUCTION.....	67
2 - RESULTATS	68
3 - DISCUSSION.....	71

CHAPITRE II

ACTIVATION DES RESEAUX LOMBO-SACRES DES SOURICEAUX EN PREMIERE SEMAINE POSTNATALE..... 75

1 - INTRODUCTION.....	77
2 - RESULTATS	80
a) <i>Activité spontanée des réseaux lombaires.....</i>	80
b) <i>Effets des applications de N-méthyl-DL-aspartate et de sérotonine.....</i>	80
o Au niveau des segments lombaires	80
o Au niveau des segments sacrés	82
c) <i>Rôle de la composante NMDA dans la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1</i>	82
3 - DISCUSSION.....	84

CHAPITRE III

ACTIVITE DES RESEAUX ET DES MOTONEURONES LOMBAIRES DES SOURICEAUX WT ET SOD1 LORS DE L'INHIBITION DES TRANSPORTEURS DU GLUTAMATE..... 87

1 - INTRODUCTION.....	89
2 - RESULTATS	91
a) <i>Activité rythmique enregistrée sur les racines ventrales lors de l'accumulation de glutamate pendant les applications de TBOA.....</i>	91
b) <i>Enregistrements intracellulaires de l'activité des motoneurones pendant l'application de TBOA</i>	91
c) <i>La genèse des dépolarisations de large amplitude induites par le TBOA est différente entre les motoneurones WT et SOD1</i>	92
3 - DISCUSSION.....	94

CHAPITRE IV

PROPRIETES ELECTRIQUES DES MOTONEURONES WT ET SOD1 EN PERIODE POST-NATALE 97

1 - INTRODUCTION.....	99
-----------------------	----

2 -	RESULTATS	102
a)	<i>Propriétés passives des motoneurones</i>	102
b)	<i>Paramètres biophysiques membranaires des motoneurones à P7-P10</i>	103
c)	<i>Propriétés des potentiels d'action antidromique et orthodromique</i>	103
o	PA antidromique.	103
o	PA orthodromique	105
d)	<i>Caractéristiques de la post hyperpolarisation des potentiels d'action</i>	105
e)	<i>Propriétés actives des motoneurones mesurées lors d'injections de créneaux de courant dépolarisant</i>	106
f)	<i>Propriétés actives des MNs mesurées lors d'injections de courants triangulaires (rampes) d'intensité variable</i>	107
o	Types de décharge	108
o	Réponses des MNs en seconde semaine postnatale (P7-P10).....	108
g)	<i>Comparaison des propriétés électriques des motoneurones et des interneurones enregistrés en haut calcium (4mM)</i>	111
3 -	DISCUSSION.....	113

CHAPITRE V

ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES MOTONEURONES WT ET SOD1 EN PERIODE POST-NATALE		123
1 -	INTRODUCTION.....	125
2 -	RESULTATS	127
a)	<i>Description générale</i>	127
b)	<i>Position au sein du segment L5 des motoneurones reconstruits en 3D</i>	128
c)	<i>Comparaison des propriétés morphologiques des motoneurones WT et SOD1 à P8-P9</i>	129
o	Caractéristiques des corps cellulaires et des dendrites primaires.....	129
o	Caractéristiques des arborisations dendritiques.	130
3 -	DISCUSSION.....	135
DISCUSSION GENERALE		141
	ATTEINTE DES RESEAUX LOMBAIRES.....	141
	MODIFICATIONS DES PROPRIETES ELECTRIQUES DES MOTONEURONES LOMBAIRES	142
	MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DES MOTONEURONES LOMBAIRES.	143
	LES ANOMALIES OBSERVEES SEMBLENT ETRE SPECIFIQUES DE LA MALADIE	144
	CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES DES ANOMALIES POST-NATALES.....	145
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES		147
FIGURES		173
TABLES.....		221

ANNEXES	235
ANNEXE I.....	235
<i>Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis</i>	
ANNEXE II.....	243
<i>Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis</i>	
ANNEXE III.....	255
<i>Morphological Differences Between Wild-Type and Transgenic SOD1 Lumbar Motoneurons in Postnatal Mice</i>	
ANNEXE IV	271
<i>Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis</i>	
ANNEXE V.....	283
<i>Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis</i>	

INTRODUCTION GENERALE

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), initialement décrite par le neurologue français Jean-Martin Charcot à la fin du 19^{ème} siècle (Charcot, 1865) est une maladie neurologique dégénérative fatale, responsable de handicaps moteurs sévères et évolutifs. La faiblesse musculaire de départ évolue rapidement vers une paralysie complète et la SLA conduit au décès du patient en raison d'une insuffisance respiratoire. Son évolution est généralement rapide (entre 1 et 5 ans). La SLA est aussi appelée maladie de Charcot en France, maladie du motoneurone au Royaume-Uni (motor neuron disease, MND) et elle est plus connue aux Etats-Unis sous le nom de *Lou Gehrig's disease* (du nom d'un célèbre joueur de baseball des années 30 mort d'une SLA).

La découverte en 1993 chez des patients atteints de SLA de mutations du gène codant pour la superoxyde dismutase 1 (SOD1) (Rosen *et al.*, 1993) a rapidement été suivie de l'élaboration de souris transgéniques SOD1 utilisées comme modèle de la maladie (Bruijn *et al.*, 1997; Gurney *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995), après l'incorporation dans le génome de ces souris de gènes humains SOD1 avec des mutations retrouvées dans des cas de SLA. Plusieurs modèles de souris exprimant des mutations SOD1 différentes mais toutes responsables de la maladie récapitulent la paralysie mortelle observée chez les patients humains. De la même manière, les rats possédant des gènes SOD1 humains mutés développent les signes pathologiques de la SLA (Howland *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2001). Les études des modèles SOD1 ont établi que chez ces animaux la maladie est provoquée par l'acquisition d'une nouvelle propriété toxique de la protéine SOD1 mutée plutôt que par une perte ou une réduction de l'activité catalytique de cette enzyme (Bruijn *et al.*, 1998). L'expression sélective du gène muté dans divers types de cellules a prouvé que la mutation

de cette enzyme ubiquitaire affecte les neurones moteurs et les cellules voisines non neuronales telles que les astrocytes entraînant aussi une activation des cellules microgliales associée à une réponse inflammatoire (Boillee *et al.*, 2006b; Nagai *et al.*, 2007). Bien que l'atteinte motoneuronale soit essentielle dans l'expression du phénotype clinique (Gong *et al.*, 2000), l'atteinte des astrocytes et l'activation de la microglie participent aux processus pathologiques (Boillee *et al.*, 2006b; Yamanaka *et al.*, 2008). La diminution de l'expression de la protéine SOD1 mutée au niveau des astrocytes retarde l'activation microgliale et ralentit la progression de la maladie sans retarder l'apparition des signes de paralysie (Yamanaka *et al.*, 2008). Aucune thérapie à ce jour ne permet d'éviter l'issue fatale de la maladie.

Les études histologiques réalisées en post-mortem à partir de tissus humains, décrivent des caractéristiques pathologiques retrouvées au niveau des motoneurones de patients SLA (pour revue Leigh et Swash, 1995). Il a principalement été observé des inclusions cytoplasmiques contenant des microtubules et des ribosomes associés au réticulum endoplasmique rugueux, des agrégats protéiques ubiquitinisés plus larges que les inclusions et ressemblant au corps de Lewy et une accumulation de neurofilaments retrouvée au niveau axonal. Des études réalisées chez des patients SLA ont montré par vidéo-microscopie un ralentissement du transport axonal rétrograde. Des anomalies concernant les microtubules et le moteur moléculaire ont aussi été rapportées dans les nerfs périphériques des patients (pour revue Leigh et Swash, 1995). A ces caractéristiques concernant les motoneurones, il faut aussi associer la perte, au niveau de la moelle épinière et du cortex moteur, d'un transporteur glial du glutamate participant à la clairance de cet acide aminé excitateur (Rothstein *et al.*, 1995).

Chez les modèles de souris, les membres postérieurs sont les premiers paralysés à l'âge adulte. Cette paralysie est la conséquence du décrochage des jonctions neuro-musculaires et

de la diminution du nombre d'unités motrices fonctionnelles qui débutent beaucoup plus tôt (Frey *et al.*, 2000; Hegedus *et al.*, 2007; Pun *et al.*, 2006). Les déconnexions entre les motoneurones et les fibres musculaires pour les unités motrices du type rapide fatigable (FF pour *fast fatigable* ; IIb) s'observent bien avant la manifestation du phénotype clinique et ces motoneurones perdent ensuite leurs branches intramusculaires (Pun *et al.*, 2006). Pendant cette période, les fibres musculaires déconnectées sont alors partiellement réinnervées par les motoneurones du type rapide résistant (FR pour *fast resistant* ; IIa) qui à leur tour se déconnectent et perdent leurs branches intramusculaires (Pun *et al.*, 2006). Le phénotype clinique (1^{er} signe de paralysie) est apparent chez ces animaux quand 90% des motoneurones du type rapide (FF + FR) ne sont plus connectés à la périphérie (Pun *et al.*, 2006). La perte de motoneurones, significative lors de la manifestation du phénotype clinique, représente un évènement tardif de la maladie (Bruijn *et al.*, 2004; Dal Canto et Gurney, 1995; Gurney *et al.*, 1994; Pun *et al.*, 2006). Lors de l'apparition du phénotype clinique diverses marques pathologiques sont retrouvées, comme des vacuoles résultant de la dégenérescence d'organelles (Dal Canto et Gurney, 1994; 1995), des agrégats protéiques ubiquitinisés au niveau des motoneurones et des astrocytes (Bruijn *et al.*, 1997; Stieber *et al.*, 2000), des modifications de la perméabilité des récepteurs au glutamate (Zhao *et al.*, 2008) ou encore une diminution de la clairance du glutamate (Bendotti *et al.*, 2001 ; pour revue Bruijn *et al.*, 2004).

Les analyses réalisées sur les patients humains et les modèles animaux montrent que la maladie commence bien avant l'expression du phénotype clinique, suggérant une longue phase préclinique pendant laquelle la maladie bien qu'active n'est pas symptomatique. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la perte des motoneurones sont divers et complexes et certains d'entre eux sont étroitement liés. Cela explique pourquoi quinze ans après la découverte de la mutation SOD1 dans des cas de SLA, aucun consensus ne s'est

encore dégagé sur la nature des cibles initiales de la maladie. De par la multiplication des mécanismes mis en jeu au cours de l'évolution de la maladie, il semblait donc intéressant d'essayer d'appréhender la physiopathologie de la SLA plus en amont afin de caractériser la ou les modifications initiales qui entraînent cet enchaînement de processus pathologiques puis la mort des motoneurones.

L'identification des mécanismes initiaux qui entraînent la perte progressive des motoneurones est une étape cruciale dans l'optique d'une thérapie chez l'homme. Récemment des équipes de recherche ont commencé à étudier des changements d'excitabilité corticale chez des sujets asymptomatiques porteurs d'une mutation SOD1 (Vucic *et al.*, 2008). Dans l'optique de rechercher des mécanismes précoces, les modèles animaux de la maladie sont un outil majeur pour étudier la phase pré-symptomatique. Les études sur les modèles SOD1 montrent clairement que les premiers signes cliniques apparaissent quand la majorité des motoneurones sont déconnectés de la périphérie (Pun *et al.*, 2006) et la force contractile de certains muscles déjà diminuée de plus de 80% (Hegedus *et al.*, 2008). Bien avant cette déconnection, la modification physiopathologique la plus précoce montrée à ce jour concerne le ralentissement du transport axonal des motoneurones SOD1 dès la période embryonnaire (Kieran *et al.*, 2005). En période postnatale, dès la naissance, des fractions solubles de protéines SOD1 mutées avec une mauvaise conformation stérique sont détectées dans les zones motrices plus tard affectées par la maladie (Zetterstrom *et al.*, 2007). Très tôt, l'appareil de Golgi est fragmenté dans les motoneurones de souris SOD1 (Mourelatos *et al.*, 1996). Il faut aussi considérer les études faites à partir de cultures de moelles embryonnaires et post-natales qui montrent que les motoneurones SOD1 possèdent dans leur génome dès le plus jeune âge, les capacités pour développer des propriétés pathologiques comme une hyperexcitabilité (Kuo *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2005; Pieri *et al.*, 2003a) ou une plus grande susceptibilité à une voie d'apoptose

(Raoul *et al.*, 2002). Ces mécanismes pourraient participer à la pathologie, la difficulté étant de savoir à quel moment ils se manifestent *in vivo*.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette logique de recherche de signes précoces de la maladie. Par une approche pluridisciplinaire alliant l'électrophysiologie, la pharmacologie, la morphométrie ainsi qu'une approche comportementale, nous avons étudié les souris d'un modèle SOD1 pendant la période postnatale. Lorsque ce travail a été entrepris, aucune donnée n'était disponible concernant les caractéristiques électriques et morphologiques des motoneurones de souris SOD1 *in situ*. La SLA affecte de façon préférentielle le système moteur ; ce travail est donc axé sur le développement des composantes motrices du système nerveux des souris. Nous avons abordé successivement l'acquisition de réflexes moteurs, le fonctionnement des réseaux spinaux et la caractérisation des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones.

**VUE D'ENSEMBLE SYNTHETIQUE SUR
LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE**

Les déficits moteurs observés pendant la SLA sont la conséquence de la perte progressive des neurones moteurs de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cortex (pour revue Bruijn *et al.*, 2004; Cleveland et Rothstein, 2001; Julien, 2001). Cependant, l'atteinte n'est pas purement motoneuronale et de nombreuses études montrent que l'environnement glial joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie (Clement *et al.*, 2003; Di Giorgio *et al.*, 2007; Lino *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2007; Pramatarova *et al.*, 2001). Certains noyaux moteurs du tronc cérébral comme ceux innervant la musculature extra-oculaire sont pour des raisons encore mal connues épargnés par la maladie (Haenggeli et Kato, 2002; Reiner *et al.*, 1995). La SLA est aussi fréquente en incidence (nouveaux cas par an) que la sclérose en plaque (maladie avec laquelle elle n'a aucun lien), mais du fait de son évolution extrêmement rapide, sa prévalence (nombre de patients touchés en même temps) est faible. Elle est de 5 à 7 pour 100 000 habitants (McDermott et Shaw, 2008). Il est difficile d'avoir un chiffre exact de l'incidence de la SLA car elle varie selon les études de 0,98 à 2,25 cas pour 100 000 habitants, la moyenne mondiale se trouvant autour de 2 cas pour 100 000 habitants (McDermott et Shaw, 2008; Turner et Talbot, 2008). Il faut noter que l'incidence de la SLA augmenterait de 200% environ tous les vingt ans dans les pays occidentaux (Swash et Desai, 2000). Cependant cette augmentation pourrait simplement refléter l'amélioration de la détection des malades par les cliniciens ou s'expliquer par un effet direct de l'augmentation de la durée de vie. En effet l'âge médian des patients au début de la maladie est de 55 ans environ et le pic d'incidence de la maladie se situe entre 60 et 75 ans.

Diagnostic et tableau clinique.

Le signe de début de la maladie le plus fréquent est un trouble moteur d'un membre dans 58 à 81% des cas selon les études (Pradat et Bruneteau, 2006b). Ces formes à « début

périphérique » sont les plus fréquentes et touchent plus volontiers des hommes. Des troubles de la phonation ou de la déglutition sont les signes cliniques initiaux dans 19 à 35 % des patients selon les données (Pradat et Bruneteau, 2006a). Ces formes bulbaires touchent le plus souvent des femmes après 65 ans. En l'absence de marqueur biologique, le diagnostic de SLA repose essentiellement sur l'examen neurologique. Il est appuyé par des examens électrophysiologiques qui confirment l'atteinte des neurones moteurs (Brown *et al.*, 2001) et par la normalité des autres examens, notamment des examens biologiques. Globalement, il existe une prépondérance masculine caractérisée par un rapport de 3/2. Dans le tableau clinique précoce, les malades présentent des fasciculations qui tendent à disparaître avec l'évolution de la maladie. Ces fasciculations, aisément détectables sur les enregistrements électromyographiques, génèrent fréquemment des crampes musculaires. La progression des symptômes au cours du temps est retenue comme un critère de diagnostic indispensable (Brown *et al.*, 2001). L'atteinte puis la diminution du nombre de motoneurones entraîne un déficit moteur progressif évoluant vers une atrophie musculaire. Les techniques électro-neuro-myographiques permettent d'aborder le nombre et la taille des unités motrices et donc d'évaluer la perte des neurones moteurs ainsi que la réinnervation compensatrice (Pouget, 2006; Schmied *et al.*, 1999). L'étude de l'atteinte des neurones moteurs du cortex, plus difficiles d'accès, peut être réalisée par l'analyse des potentiels moteurs évoqués par stimulation magnétique transcrânienne (Attarian *et al.*, 2008). Chez les patients à un stade précoce de la maladie, le seuil d'activation de la voie cortico-spinale est diminué (Pouget *et al.*, 2000). Cette diminution semble résulter d'une hyperexcitabilité des motoneurones spinaux due à des réorganisations synaptiques des projections corticales sur les motoneurones survivants (Attarian *et al.*, 2006). Le rythme d'aggravation est variable, allant de quelques mois à plus de cinq ans. Dans les formes complètes, les patients sont grabataires, présentent une atrophie musculaire importante et ne peuvent ni parler ni

déglutir. L'atteinte de la phonation et de la déglutition (atteinte bulbaire) n'est pas systématique et touche environ 80 % des patients à début périphérique (Pradat et Bruneteau, 2006a).

Etiologie de la maladie.

La majorité des cas de la SLA est d'origine inconnue et l'affection est dite sporadique (SLAs) (Turner et Talbot, 2008). Dans les SLAs, plusieurs gènes ont été identifiés comme gènes de susceptibilité pouvant jouer un rôle dans l'étiologie de la maladie (Simpson et Al-Chalabi, 2006; Turner et Talbot, 2008). Parmi ces gènes on peut citer ceux codant pour l'angiogénine, l'apolipoprotéine E, le CNTF (pour *Ciliary NeuroTrophic Factor*), la protéine *tau* associée aux microtubules, la chaîne lourde des neurofilaments, la péripherine, la protéine SMN (pour *Survival Motor Neuron*), et le VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Simpson et Al-Chalabi, 2006). Ces études essayant d'associer des phénotypes SLA et des gènes candidats sont menées localement et devront être réalisées à grande échelle pour avoir plus de significativité. Cependant, ces études suggèrent un rôle important de la génétique dans les SLAs en apparence non héréditaires (Simpson et Al-Chalabi, 2006; Turner et Talbot, 2008).

En dehors des cas sporadiques qui sont les plus fréquents, les autres cas de SLA sont héréditaires. Les patients présentant ces formes génétiques de SLA sont atteints de SLA familiales (SLAf). Les SLAf ont un mode de transmission autosomique dominant pour la majorité des cas (Rowland et Shneider, 2001). Pour environ 20 % des patients SLAf génotypés, il est clairement établi que la maladie trouve son origine dans une mutation ponctuelle sur le gène codant pour l'enzyme cytosolique à Cu,Zn de la superoxyde dismutase (SOD1) (Gros-Louis *et al.*, 2006; Rosen *et al.*, 1993). Il est important de noter que, selon les études, 2 à 7% des patients sporadiques sont aussi porteurs d'une mutation du

gène codant pour la SOD1 (Andersen, 2006; Corrado *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 1997). Ces données montrent qu'au moins une partie des SLAs possède une origine génétique et que la stricte division SLAs / SLAf est problématique (Simpson et Al-Chalabi, 2006; Turner et Talbot, 2008). Le nombre de SLAf est à ce jour probablement sous-estimé pour plusieurs raisons (pour revue Andersen, 2006). D'une part, le génotypage n'est pas systématique. D'autre part, pour qu'une SLAf soit diagnostiquée il faut qu'un des ascendants du malade soit décédé d'une SLA ce qui est souvent difficile à prouver. En l'absence de génotypes parentaux, un cas isolé de SLA pourrait être sporadique, familial à transmission dominante, familial à transmission récessive, porteur d'une mutation répertoriée mais avec une faible pénétrance, ou porteur d'une nouvelle mutation encore inconnue (Andersen, 2006). Les mutations à l'origine de SLAf ne sont pas encore toutes répertoriées. Par exemple, pour le gène SOD1, le nombre de mutations connues augmente avec l'avancement des recherches sur le sujet (pour revue Bruijn *et al.*, 2004; Cleveland et Rothstein, 2001; Julien, 2001). Le fait que les formes familiales et sporadiques soient cliniquement impossibles à distinguer suggère l'existence de mécanismes physiopathologiques communs (Guzman *et al.*, 2007). Cette dernière étude, réalisée à partir de tissus de patients humains de SLAf liées à une mutation SOD1 et de SLAs, confirme les données obtenues *in vitro* et *in vivo* sur des souris SOD1 montrant que la protéine SOD1 non mutée sous sa forme oxydée peut, comme la protéine mutée, être toxique pour les motoneurones (Ezzi *et al.*, 2007; Rakhit *et al.*, 2004; Rakhit *et al.*, 2002). Ces études montrent que la protéine SOD1 oxydée pourrait être à l'origine de la SLA chez des personnes ne présentant pas de mutations du gène SOD1 (pour revue Kabashi *et al.*, 2007). Il faut cependant noter que l'âge d'apparition des formes familiales est plus précoce (environ 45 ans) et que leur évolution est plus rapide que dans les formes sporadiques. Cette différence peut refléter le fait que les formes familiales diagnostiquées restent celles

qui ont les plus fortes pénétrances (Andersen, 2006; Turner et Talbot, 2008). Les multiples mutations du gène codant pour la SOD1 sont une des seules causes directes de SLA connues à ce jour (Rosen *et al.*, 1993; Turner et Talbot, 2008). Avec le gène SOD1, cinq autres gènes répartis sur onze loci ont été identifiés comme origine de SLA quand ils présentent une mutation (Gros-Louis *et al.*, 2006; Turner et Talbot, 2008). Mises à part les SLA avec une mutation du gène SOD1, les autres mutations ont été retrouvées dans des formes atypiques de la maladie comme par exemple les formes juvéniles liées à des mutations du gène Als-2 (Gros-Louis *et al.*, 2006; Turner et Talbot, 2008).

Les facteurs de risque.

Les facteurs de risque les plus couramment avancés sont les traumatismes (Cruz *et al.*, 1999), les chocs électriques (Abhinav *et al.*, 2007; Zoccolella *et al.*, 2008), une activité physique intensive (Longstreth *et al.*, 1998; Scarmeas *et al.*, 2002) et l'exposition à des produits neurotoxiques comme des solvants ou des métaux lourds (Adams *et al.*, 1983; Roelofs-Iverson *et al.*, 1984; Wakayama *et al.*, 1996). Enfin, des exemples, comme l'observation de formes conjugales de SLA, soulignent l'importance de facteurs environnementaux (Corcia *et al.*, 2003; Rachele *et al.*, 1998). Dans ce cadre, il faut noter l'augmentation de l'incidence de formes précoces de SLA parmi les vétérans de la guerre du Golfe et de l'armée américaine (Haley, 2003; Horner *et al.*, 2003; Rose, 2003) ou l'augmentation du nombre de SLA parmi les joueurs professionnels de football en Italie (Chio *et al.*, 2005) et de football américain en Amérique du Nord (Abel, 2007). Ces données soulèvent principalement le problème de l'utilisation de produits toxiques. L'existence de foyers de haute incidence dans le Pacifique ouest, comme sur l'île de Guam où il a été observé une forte augmentation de l'incidence de SLA dans les années 50 (Cox et Sacks, 2002; Kurland, 1988; Spencer *et al.*, 1987), souligne aussi le rôle de

l'environnement. En effet, une des hypothèses avancées était la consommation quotidienne par les autochtones de cycas circinalis, une plante contenant de l'acide bêta-N-méthylamino-L-alanine, neurotoxique à forte dose. Une possible prédisposition génétique des populations locales a aussi été proposée (Bailey-Wilson *et al.*, 1993; McGeer *et al.*, 1997). Cependant, il semblerait que même un court séjour dans cette île augmente le risque de développer une SLA (Majoor-Krakauer *et al.*, 2005).

Les souris transgéniques SOD1, modèles de SLA.

L'introduction dans le génome de souris de plusieurs copies du gène SOD1 humain muté a permis la construction de souris transgéniques utilisées comme modèle de la maladie (Bruijn *et al.*, 1997; Gurney *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995). Plus récemment, cette manipulation génétique a aussi été réalisée chez le rat (Dunlop *et al.*, 2003; Howland *et al.*, 2002). Actuellement on dénombre quinze modèles de souris transgéniques SOD1 dont neuf possèdent dans leur génome un gène SOD1 humain avec une mutation ponctuelle sur un codon (Turner et Talbot, 2008). Trois principaux modèles correspondant à trois mutations différentes sont bien caractérisés et restent les plus couramment utilisés dans les recherches sur la SLA avec par ordre décroissant d'utilisation : les modèles SOD1-G93A, SOD1-G37R et SOD1-G85R (Bruijn *et al.*, 1997; Gurney *et al.*, 1994; Turner et Talbot, 2008; Wong *et al.*, 1995). Ces souris transgéniques présentent un phénotype et des signes pathologiques qui récapitulent la pathologie humaine avec une dégénérescence progressive des motoneurones entraînant un déficit moteur puis la mort des animaux (Brown *et al.*, 2000; Bruijn *et al.*, 1997; Cleveland et Rothstein, 2001; Gurney *et al.*, 1994; Turner et Talbot, 2008; Wong *et al.*, 1995). Il faut souligner que la pathologie ne concerne pas seulement les motoneurones spinaux et il a été montré dans le modèle SOD1-G93A une

atteinte évolutive des voies cortico-spinale et bulbo-spinale progressant avec l'âge des animaux (Zang et Cheema, 2002).

Le modèle G93A possède l'avantage de développer la maladie rapidement. Les souris présentent entre 3 et 4 mois des tremblements des membres inférieurs, des signes de faiblesse musculaire, des déficits moteurs évoluant vers une paralysie complète et les souris meurent entre quatre et six mois (Gurney *et al.*, 1994). Les souris du modèle G93A initial (Gurney *et al.*, 1994) possèdent 18 copies du transgène muté et l'activité catalytique SOD1 de ces souris est onze fois supérieure à celle des souris sauvages (Dal Canto et Gurney, 1994; Gurney *et al.*, 1994; Turner et Talbot, 2008). Depuis, deux lignées G93A issues du modèle initial sont commercialisées et couramment utilisées dans les recherches sur la SLA. La première avec un grand nombre de copies du transgène ("*high expressor line*" ou G93A-G1H avec 25 copies) (Chiu *et al.*, 1995), et la seconde avec un nombre réduit de copies ("*low expressor line*" ou G93A-G1L avec huit copies) (Gurney, 1997). L'activité catalytique SOD1 totale des souris G93A-G1H est 13 fois supérieure à celle des souris sauvages (Chiu *et al.*, 1995; Gurney, 1997). Les souris G93A-G1H présentent des vacuolisations cytoplasmiques qui représentent pour partie la dégradation des mitochondries (Dal Canto et Gurney, 1994; Gurney *et al.*, 1994). On retrouve aussi ces vacuolisations dans le modèle G37R dans lequel l'activité catalytique SOD1 est 14,5 fois supérieure à celles des souris sauvages (Wong *et al.*, 1995). Ce type de vacuolisations est rarement décrit dans les analyses post-mortem chez l'homme (Bergemalm *et al.*, 2006; Dal Canto et Gurney, 1994; 1997; Sasaki *et al.*, 1998; Turner et Talbot, 2008). Dans les modèles G93A-G1H (Chiu *et al.*, 1995) et G37R (Wong *et al.*, 1995), la forte quantité de protéines SOD1 humaines pourrait favoriser l'apparition de ces vacuolisations (Bergemalm *et al.*, 2006). En effet, dans le modèle G93A-G1L (avec moins de copies du transgène) ces vacuolisations ne sont pas retrouvées (Dal Canto et Gurney, 1997; Jaarsma *et al.*, 2000). De

plus on retrouve ces vacuolisations chez les souris qui surexpriment une SOD1 humaine non mutée catalytiquement active (SOD1^{hum}) bien que ces souris ne développent pas de pathologie type SLA (Dal Canto et Gurney, 1994; Jaarsma *et al.*, 2000; Tu *et al.*, 1996). De plus dans les souris SOD1^{hum}, une dégénérescence motoneuronale associée à une axonopathie est décrite chez les animaux âgés (Dal Canto et Gurney, 1994; 1995; Jaarsma *et al.*, 2000). Une récente étude rapporte une perte de 40% du nombre de cellules de la corne antérieure de la moelle épinière des souris SOD1^{hum} âgées de 600 jours environ (Jonsson *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que pour les modèles G93A-G1H et G37R la forte surexpression de la protéine SOD1 humaine associée à une importante augmentation de l'activité catalytique SOD1 totale des animaux est une condition qui entraîne l'apparition de marques pathologiques (exemple de la dégradation des mitochondries) et de signes de dégénérescence des motoneurones qui ne sont pas spécifiques de la SLA (Bergemalm *et al.*, 2006; Jaarsma, 2006; Turner et Talbot, 2008).

Par rapport aux modèles G93A-G1H et G37R, le nombre de copies de gène humain muté dans la souche G85R de la lignée 148 (la plus utilisée parmi les modèles G85R) est plus faible (15 copies contre 25 pour les G93A-G1H) et surtout le rapport entre la protéine SOD1 endogène et la protéine SOD1-G85R est de 1 pour 1 (Bruijn *et al.*, 1997). De plus, l'activité catalytique de l'enzyme humaine SOD1-G85R est nulle (Bruijn *et al.*, 1997). Par conséquent, l'activité enzymatique totale SOD1 du modèle G85R n'est pas modifiée et elle est donc similaire à celles des souris sauvages (Bruijn *et al.*, 1997; Bruijn *et al.*, 1998). Il est d'ailleurs important de souligner que les vacuolisations décrites pour les modèles G93A-G1H et G37R ainsi que pour les souris SOD1^{hum} n'ont pas été retrouvées dans le modèle G85R (Bruijn *et al.*, 1998) ni dans le modèle SOD1-G86R, pour lequel le transgène muté est d'origine murine et la mutation G86R l'équivalent chez la souris de la mutation G85R chez l'homme (Ripps *et al.*, 1995). Cette différence peut être la conséquence de la

plus faible expression de la SOD1-G85R dont l'activité catalytique est nulle (par rapport aux surexpressions de SOD1-G93A et SOD1-G37R actives) (Bruijn *et al.*, 2004). Ces différences majeures rendent le modèle SOD1-G85R plus proche de la pathologie humaine (Williamson *et al.*, 1998) par rapport aux modèles G37R et G93A. Pour les souris SOD1-G85R (lignée 148), le phénotype clinique est apparent entre 8 et 10 mois et l'évolution est très rapide (2 à 3 semaines) (Bruijn *et al.*, 1997; Bruijn *et al.*, 1998). Un ralentissement du transport axonal et la formation d'agrégats de protéines SOD1 dans les neurones et les astrocytes sont visibles avant l'observation des premiers troubles moteurs (Bruijn *et al.*, 1997; Williamson et Cleveland, 1999).

Les souris K/O pour le gène SOD1 (Reaume *et al.*, 1996) comme les souris SOD1^{hum} (Deng *et al.*, 1993; Kunst *et al.*, 1997; Wong et Borchelt, 1995) ne développent pas la SLA. Cependant, l'absence de la protéine SOD1 chez les souris K/O diminue les capacités de réinnervation des fibres musculaires et ces souris développent une axonopathie distale (Shefner *et al.*, 1999). La co-expression de l'enzyme humaine SOD1 non mutée dans le modèle G85R ne modifie pas l'évolution de la maladie (Bruijn *et al.*, 1998; Fukada *et al.*, 2001) et serait même toxique dans le modèle avec la mutation G93A-G1L pour lequel on note alors une accélération des processus pathologiques (Jaarsma *et al.*, 2000). La suppression de l'enzyme endogène SOD1 des souris SOD1-G85R est aussi sans effet sur l'évolution et l'issue de la maladie (Bruijn *et al.*, 1998). Ces données amènent à la conclusion que la physiopathologie dans les modèles SOD1 résulte d'un gain de fonction toxique de la protéine SOD1 mutée et non d'une perte ou d'une diminution de son activité catalytique (Bruijn *et al.*, 2004; Cleveland et Rothstein, 2001; Jaarsma, 2006; Julien, 2001; Turner et Talbot, 2008). Les principales anomalies des modèles SOD1-G93A-G1H et SOD1-G85R sont présentées de façon chronologique dans les tables A et B.

TABLE A : modèle souris SOD1-G93A-G1H (forte expression de la protéine mutée).

Stade embryonnaire (E13,5)	Ralentissement du transport axonal rétrograde	(Kieran <i>et al.</i> , 2005)
Naissance (P0)	Fractions solubles de protéines SOD1 mutées (avec mauvaise conformation stériques) enrichies dans la moelle épinière	(Zetterstrom <i>et al.</i> , 2007)
P31	Fragmentation de l'appareil de Golgi	(Mourelatos <i>et al.</i> , 1996)
P38-P46	Diminution du nombre de vésicules synaptiques dans les terminaisons motrices de type FF	(Pun <i>et al.</i> , 2006)
P40	Diminution du nombre d'unités motrices associée à une baisse de force téτανique dans le gastrocnémien (muscle contenant majoritairement des fibres de type FF)	(Gordon <i>et al.</i> , 2007; Hegedus <i>et al.</i> , 2007)
P45	Modifications des récepteurs AMPA (↑ de GluR1 et ↓ de GluR2)	(Zhao <i>et al.</i> , 2008)
P48-P52	Dénervation des fibres rapides fatigables des membres postérieurs (type FF)	(Frey <i>et al.</i> , 2000; Pun <i>et al.</i> , 2006)
P50	Baisse du nombre de MNs lombaires marqués lors d'injection de fluorogold ; diminution de la force d'agrippement des membres postérieurs	(Ligon <i>et al.</i> , 2005)
P50-P55	Dégénérescence des branches axonales intramusculaires des MNs du type FF	(Pun <i>et al.</i> , 2006)
P60	Formation à haut poids moléculaire de SOD1 mutée précédant les agrégats Co-agrégation des protéines SOD1 avec la dynéine Perte de 80% de la force contractile isométrique des muscles (type FF)	(Johnston <i>et al.</i> , 2000) (Zhang <i>et al.</i> , 2007) (Hegedus <i>et al.</i> , 2008)
P80	Atrophie musculaire du muscle gastrocnémien	(Frey <i>et al.</i> , 2000)
P80-P90	Dénervation des fibres rapides résistantes des membres postérieurs (type FR) Perte complète des branches axonales intramusculaires des MNs FF	(Pun <i>et al.</i> , 2006)
P90	Transcription de GLT1 plus faible	(Rothstein <i>et al.</i> , 2005)
P90	Symptômes cliniques (1 ^{er} signe de paralysie) Agrégats protéiques retrouvées dans les motoneurones	(Dal Canto et Gurney, 1995; Gurney <i>et al.</i> , 1994)
P98-120	Diminution de GLT1 avec l'âge des animaux au niveau de la corne ventrale de la moelle.	(Bendotti <i>et al.</i> , 2001)
P120	Mort des animaux	(Chiu <i>et al.</i> , 1995; Dal Canto et Gurney, 1995; Gurney <i>et al.</i> , 1994)

TABLE B: modèle souris SOD1-G85R (homozygotes)		
P3-P6	Défaut d'activation des réseaux lombaires de la moelle <i>in vitro</i> AHP des motoneurones plus longue	(Amendola <i>et al.</i> , 2004, annexe I) non publié (thèse Amendola, Chap. IV)
P3-P10	Retard d'expression de réflexes neurologiques - Déficits moteurs transitoires	(Amendola <i>et al.</i> , 2004)
P6-P10	Diminution du gain des MNs lombaires enregistrés en tranche	(Pambo-Pambo <i>et al.</i> , 2008)
P6-P10	Diminution du gain et de la résistance d'entrée des MNs lombaires enregistrés en moelle entière	(Bories <i>et al.</i> , 2007)
P8-P10	Augmentation anormale du nombre de branchements et de la surface des dendrites des MNs lombaires	(Amendola et Durand, 2008, annexe III)
<i>n.d.</i>	Fragmentation de l'appareil de Golgi	(Ligon <i>et al.</i> , 2005; Stieber <i>et al.</i> , 2004)
P150	Baisse du nombre de vésicules synaptiques dans les terminaisons motrices de type FF	(Pun <i>et al.</i> , 2006)
P167	Co-agrégation des protéines SOD1 avec la dynéine (non recherché antérieurement)	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
P180	Agrégats avec SOD1 mutée dans les MNs et les astrocytes	(Bruijn <i>et al.</i> , 1997)
P190	Dénervation des fibres rapides résistantes des membres postérieurs (type FR) Perte complète des branches axonales intramusculaires des MNs FF	(Pun <i>et al.</i> , 2006)
P195-P240	Diminution progressive du nombre d'axones de gros calibre dans les racines ventrales lombaires	(Bruijn <i>et al.</i> , 1997)
P225	Phénotype clinique apparent – 1 ^{ers} signes de paralysie	(Bruijn <i>et al.</i> , 1997)
P240	Dégénérescence des MNs – Diminution de 50% de GLUT1 au niveau spinal - Mort des animaux	(Bruijn <i>et al.</i> , 1997)

Les mécanismes physiopathologiques connus.

Sur la base d'études histologiques biochimiques et génétiques réalisées en post-mortem à partir de tissus humains de patients SLA, plusieurs processus pathologiques semblent participer à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA et certains sont retrouvés dans les modèles transgéniques de souris SOD1. Au niveau des motoneurones des souris SOD1 on observe principalement des signes d'agrégation protéique, d'accumulation de neurofilaments, de perturbation du transport axonal, de toxicité du glutamate et de dérèglement de l'homéostasie calcique (Bruijn *et al.*, 2004).

- Agrégats protéiques

Dans les modèles transgéniques, les protéines SOD1 mutées forment des agrégats protéiques visibles dans les motoneurones adultes (Bruijn *et al.*, 1998). Comprendre le rôle de ces agrégats protéiques est aujourd'hui une des principales voies de recherche sur la SLA (Rakhit *et al.*, 2007; Shaw et Valentine, 2007). L'hypothèse principale de ces recherches repose sur l'observation d'une mauvaise conformation stérique des protéines SOD1 mutées dont découle leur capacité à s'agréger entre elles et à séquestrer des composés essentiels au fonctionnement des neurones (Cleveland et Liu, 2000; Johnston *et al.*, 2000; Rakhit *et al.*, 2007; Shaw et Valentine, 2007; Valentine et Hart, 2003). Dans les modèles SOD1, ces agrégats peuvent ralentir le transport axonal en séquestrant la dynéine, un moteur moléculaire du transport axonal rétrograde (Zhang *et al.*, 2007). D'autres auteurs voient la formation des agrégats protéiques comme un phénomène protecteur qui séquestrerait les protéines mutantes SOD1 et empêcherait leur(s) action(s) toxique(s) (Bruijn *et al.*, 2004). Un tel mécanisme « neuro-protecteur » a été proposé pour la maladie de Huntington (Arrasate *et al.*, 2004; Bruijn *et al.*, 2004). Dans cette dernière étude (Arrasate *et al.*, 2004), les auteurs ont développé un système de vidéo-microscopie qui

permet d'observer les mêmes cellules à différents intervalles de temps. Beaucoup de neurones meurent sans avoir formé d'agrégats de la protéine mutante huntingtine et les cellules dans lesquelles on retrouve les agrégats survivent plus longtemps en raison d'une baisse du niveau de la protéine mutante « libre » dans le cytoplasme des cellules. Il a été conclu que dans les modèles de la maladie de Huntington la formation des agrégats est un mécanisme cellulaire qui permet de répondre à la toxicité de la protéine mutante (Arrasate *et al.*, 2004).

- Stress oxydatif

Le stress oxydant (ou stress oxydatif) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées (ROS, *Reactive Oxygen Species* en anglais). Le stress oxydatif est défini par un ensemble de processus biochimiques qui résultent de l'action délétère des ROS (produits de la respiration cellulaire) sur les protéines intracellulaires, les lipides membranaires et les acides nucléiques. Une dégradation excessive de ces composants entraîne la mort cellulaire. De nombreuses enzymes, dont la SOD1, catalysent la dégradation des ROS en molécules dépourvues de toxicité et ainsi protègent les cellules contre le stress oxydatif. La SOD1 est une métalloprotéine cytosolique avec une activité enzymatique qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (Cleveland et Rothstein, 2001; Julien, 2001). Le peroxyde d'hydrogène est aussi une ROS qui est ensuite dégradée par la glutathione peroxydase en molécules d'eau et d'alcool assimilables par l'organisme (Cleveland et Rothstein, 2001; Julien, 2001). Les enzymes SOD1 mutées catalyseraient très rapidement la réaction inverse des enzymes SOD1 sauvages entraînant une élévation anormale des ROS à partir du peroxyde d'hydrogène (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996). Cependant le fait que la surexpression ou la suppression de l'enzyme endogène SOD1 des souris SOD1-G85R soient sans effet sur

l'évolution et l'issue de la maladie exclut la possibilité que ce mécanisme joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie (Bruijn *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1998). Une autre hypothèse est que la mauvaise conformation des protéines SOD1 mutées permet l'accès au site catalytique de nouveaux substrats et leurs confère de nouvelles capacités enzymatiques qui entraînent la nitration de résidus tyrosine de multiples protéines à partir des ions peroxytrinitrites (Beckman *et al.*, 1993; Cleveland et Rothstein, 2001; Estevez *et al.*, 1999). Récemment il a été montré que les protéines SOD1 mutées interagissent avec une forte affinité (supérieure la SOD1 normale) avec un activateur de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique producteur d'anions superoxydes (Harraz *et al.*, 2008). Cette forte affinité bloque la NADPH oxydase dans son état actif et entraîne alors une multiplication par dix de la production d'anions superoxydes qui sont en partie relargués dans l'espace intercellulaire (Harraz *et al.*, 2008). En traitant à partir de la 2^{ème} semaine postnatale, les souris G93A avec de l'apocynine (un inhibiteur de la NADPH oxydase) la durée de vie des animaux passe de 125 à 238 jours (Harraz *et al.*, 2008).

- Accumulation de neurofilaments et perturbations du transport axonal

Le transport axonal est essentiel au bon fonctionnement des neurones et dépend en partie des neurofilaments (NF). Ce transport inclut à la fois le transport antérograde des organelles du corps cellulaire vers la synapse et le transport rétrograde de la synapse vers le corps cellulaire de formations vésiculaires et de facteurs trophiques. Il a été montré qu'une accumulation dans les axones moteurs de la chaîne lourde des NF perturbe le transport axonal des motoneurones spinaux entraînant une axonopathie et une atrophie musculaire (Cote *et al.*, 1993). Un ralentissement du transport axonal, dû à l'accumulation de neurofilaments, est visible dans les modèles SOD1 avant l'apparition de signes pathologiques (Williamson *et al.*, 1998; Williamson et Cleveland, 1999; Zhang *et al.*,

1997). En diminuant, par la manipulation génétique, la quantité de neurofilaments présents dans les axones des souris SOD1-G85R, il a été montré que la sélectivité de l'atteinte motoneuronale est réduite et l'apparition de la maladie retardée (Williamson *et al.*, 1998). Les souris du modèle G93A présentent une dynamique de renouvellement des microtubules qui pourrait aussi ralentir le transport axonal (Fanara *et al.*, 2007).

Le ralentissement du transport axonal est un mécanisme pathologique compatible avec la sélectivité de la dégénérescence motoneuronale dans la SLA. En effet, les motoneurons spinaux se caractérisent par la longueur de leur axone et sont particulièrement sensibles aux perturbations de ce transport (Collard *et al.*, 1995). De plus l'accumulation de NF est caractéristique des motoneurons de grande taille possédant des axones de diamètre important qui dégénèrent en premier et massivement dans les modèles SOD1 (Bruijn *et al.*, 1997; Kong et Xu, 1999; Mohajeri *et al.*, 1998; Pun *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 1995). Les souris avec, dès la période postnatale, des cassures des complexes dynéine-dynactine développent à l'âge adulte une dégénérescence évolutive des motoneurons spinaux caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaires, des tremblements spontanés, une posture et une démarche anormales (LaMonte *et al.*, 2002). L'analyse histologique de ces souris montre un ralentissement significatif du transport rétrograde et une accumulation des NF au niveau des axones moteurs. Il est important de souligner que l'accumulation de neurofilaments est une signature commune des SLA familiales et sporadiques (Boillee *et al.*, 2006a; Bruijn *et al.*, 2004; Cleveland et Rothstein, 2001; Julien, 2001).

La dynéine est le moteur moléculaire du transport rétrograde de neurofilaments, de facteurs de croissance et du mouvement antérograde des microtubules (Hafezparast *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005). Récemment il a été proposé un lien direct entre le transport axonal et les protéines mutantes SOD1 (Zhang *et al.*, 2007). Ces auteurs ont montré que la dynéine et les protéines mutantes SOD1 étaient co-localisées sous forme d'agrégats. De plus les protéines

mutantes SOD1 avec une mauvaise conformation sont détectées dès la naissance dans les souris transgéniques et sont particulièrement retrouvées au niveau de la moelle épinière (Zetterström *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que le transport axonal via la dynéine peut être perturbé très tôt dans la vie des animaux. D'ailleurs une étude sur le modèle G93A montre un ralentissement précoce du transport axonal dès la période embryonnaire (Kieran *et al.*, 2005). Dans cette dernière étude, il est montré que le rétablissement du transport axonal par le croisement des souris SOD1-G93A avec les souris Loa (pour *Legs at Odd Angles*) retarde l'apparition du phénotype clinique et augmente la survie des animaux. Ce résultat est surprenant du fait que les souris Loa présentent une mutation de la dynéine associée à un défaut de transport axonal. D'ailleurs, les bénéfices observés lors du croisement des souris Loa avec les souris du modèle G93A (Kieran *et al.*, 2005) n'ont pas été reproduits avec les souris des modèles SOD1-G85R et SOD1-G37R (Ilieva *et al.*, 2008). Ces données montrent la grande susceptibilité des motoneurones aux anomalies du transport axonal et le fait que le transport axonal soit perturbé dès la période embryonnaire bien avant la déconnexion entre les axones moteurs et leurs cibles musculaires suggère que ce mécanisme joue un rôle clé dans la physiopathologie de ces animaux (Williamson et Cleveland, 1999).

- Excitotoxicité du glutamate.

Le concept d'excitotoxicité a été défini dans les années 70 après l'observation qu'une forte concentration de glutamate dans le milieu extracellulaire est toxique pour les neurones (Olney et Ho, 1970). En effet, une action prolongée ou excessive du glutamate sur ses récepteurs cellulaires entraîne une importante dépolarisation membranaire associée à une entrée massive de calcium qui déclenche une cascade de processus intracellulaires

entraînant progressivement des altérations cellulaires irréversibles et l'activation des voies apoptotiques (Danbolt, 2001).

L'excitotoxicité du glutamate reste actuellement une des pistes de recherche privilégiée (pour revue Van Den Bosch *et al.*, 2006). Au sein du système nerveux, la plupart des motoneurones sont particulièrement sensibles à l'élévation du taux de glutamate (Rothstein *et al.*, 1993) et des taux importants d'acides aminés excitateurs, dont le glutamate, ont été retrouvés dans le liquide cébrospinal de patients SLA (Plaitakis, 1991; Plaitakis et Caroscio, 1987; Rothstein *et al.*, 1990). Il faut noter qu'actuellement le seul traitement donné aux malades est le riluzole® qui possède une action anti-glutamatergique en diminuant la libération du glutamate par les terminaisons nerveuses (Jehle *et al.*, 2000) et via ses propriétés d'antagoniste des récepteurs AMPA (pour α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionic acid, un type de récepteur membranaire du glutamate) (Albo *et al.*, 2004). Les antagonistes des récepteurs de type AMPA préviennent la mort des neurones en culture exposés au liquide cébrospinal de patients SLA (Couratier *et al.*, 1993; Couratier *et al.*, 1994) et protègent les neurones contre la toxicité des protéines SOD1 mutées (G41R, G93A, et N139K) (Roy *et al.*, 1998). Plusieurs études suggèrent que la toxicité du glutamate sur les motoneurones pourrait venir des canaux associés aux récepteurs AMPA qui seraient anormalement perméables au calcium (Kawahara *et al.*, 2004; Kawahara *et al.*, 2003; Kuner *et al.*, 2005).

De plus, un défaut dans la recapture du glutamate favorise l'accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire et augmente la durée d'exposition des neurones à cet acide aminé excitateur (Danbolt, 2001). La baisse d'efficacité des systèmes de transporteurs éliminant le glutamate de la fente synaptique pourrait expliquer l'origine de l'excitotoxicité du glutamate (Van Den Bosch *et al.*, 2006).

- Perturbation de l'homéostasie calcique.

La perméabilité calcique des canaux associés aux récepteurs AMPA présents sur les neurones dépend de la sous unité GluR2 (Sommer *et al.*, 1991). La présence de GluR2 rend les récepteurs AMPA imperméables au Ca^{2+} et l'absence de GluR2 confère une perméabilité calcique à ces canaux (Sommer *et al.*, 1991). Une étude post-mortem sur des patients atteints d'une forme sporadique a montré une diminution de l'édition de l'ARN codant la sous-unité GluR2, responsable de l'absence de cette sous-unité spécifiquement au niveau des motoneurones spinaux (Kawahara *et al.*, 2004). Une diminution de l'expression de GluR2 est aussi retrouvée chez les souris pré-symptomatiques du modèle G93A (Zhao *et al.*, 2008). Un lien entre une entrée excessive de calcium via des récepteurs AMPA modifiés (spécifique aux motoneurones) et l'agrégation protéique a été proposé *in vivo* (Tateno *et al.*, 2004) confirmant des travaux réalisés en culture où des antagonistes AMPA diminuent l'agrégation des protéines SOD1 mutées (Roy *et al.*, 1998). Il semble que l'augmentation des influx calciques au travers de canaux associés aux récepteurs AMPA perméables au calcium soit spécifique des motoneurones et favorise la mauvaise conformation de la protéine SOD1 mutée (Tateno *et al.*, 2004). En croisant des souris transgéniques SOD1 avec des souris génétiquement modifiées dont les canaux associés aux récepteurs AMPA sont imperméables au Ca^{2+} (sur-exprimant GluR2), l'apparition de la maladie et la mort sont alors retardées chez ces souris doubles transgéniques (Tateno *et al.*, 2004). Inversement le croisement des souris SOD1 avec des souris sous-exprimant la sous-unité GluR2 (forte perméabilité calcique des canaux AMPA) accélère la progression de la maladie, aggrave la sévérité des déficits moteurs et diminue la survie de ces animaux (Kuner *et al.*, 2005). Ces données supportent la possibilité que la modification de la perméabilité des canaux associés aux récepteurs AMPA est un élément majeur de la vulnérabilité des motoneurones pendant la SLA. Le fait que les motoneurones des muscles

oculomoteurs soient épargnés par la maladie pourrait s'expliquer par leur plus grande capacité à chélater le calcium intracellulaire. En effet il a été montré que les motoneurones de ces noyaux moteurs présentent une grande quantité de parvalbumine et de calbindine, des chélateurs de calcium (Sasaki *et al.*, 2006). Cela pourrait limiter l'effet toxique d'une entrée massive de calcium et expliquer la survie de ces motoneurones qui posséderaient un mécanisme neuroprotecteur naturel (Roy *et al.*, 1998).

Une autre possibilité pour le calcium de pénétrer l'espace intracellulaire se trouve dans les canaux calciques dépendants du voltage et activés par une dépolarisation membranaire. Des antagonistes de ces canaux protègent en culture les motoneurones de la toxicité de la protéine SOD1 mutée (Roy *et al.*, 1998).

- Rôle des cellules non neuronales dans la physiopathologie

- 1 - Les cellules musculaires.

Le muscle pourrait être partiellement responsable de la dégénérescence des motoneurones dans la mesure où certaines études montrent que les modèles SOD1 développent une affection systémique avec des déséquilibres de l'homéostasie énergétique (Dupuis *et al.*, 2004; Gonzalez de Aguilar *et al.*, 2007). La déconnection entre les motoneurones et leurs fibres musculaires est un des événements les plus précoces observé dans les modèles SOD1 (Pun *et al.*, 2006). La protéine Nogo-A a été retrouvée dans les muscles de patients SLA et de souris SOD1 (Dupuis *et al.*, 2002). La détection de Nogo-A a été proposée pour aider le diagnostic de SLA (Pradat *et al.*, 2007). Dans le système nerveux central, Nogo-A est un inhibiteur de la régénérescence neuritique (Schwab, 2004) et dans les modèles SOD1, la suppression de Nogo-A augmente la durée de vie des animaux (Jokic *et al.*, 2006). Les fibres musculaires pourraient contribuer à la pathologie en limitant les capacités de

réinnervation des fibres musculaires par les motoneurones survivants. En croisant des souris transgéniques SOD1-G93A avec des souris génétiquement modifiées exprimant spécifiquement au niveau des fibres musculaires une hormone anabolisante IGF-1 (*Insulin like Growth Factor-1*), l'apparition du phénotype clinique est significativement retardée (Dobrowolny *et al.*, 2005). Bien que cette étude suggère un rôle actif du muscle, la synthèse d'IGF-1 étant médiée par un transgène spécifiquement exprimé dans les muscles, il reste cependant possible que l'IGF-1 sécrétée agisse à la fois sur le muscle et les motoneurones (Boillee *et al.*, 2006a). Il faut noter cependant qu'une étude récente montre que l'apparition et l'évolution de la maladie dans les modèles SOD1 ne sont pas modifiées par la suppression spécifique de la SOD1 mutée au niveau des muscles (Miller *et al.*, 2006) arguant contre un rôle clé des muscles dans le déclenchement de la pathologie.

2 - Les astrocytes.

Dans les modèles de souris SOD1, il a été montré que si l'expression des protéines mutantes se limite aux motoneurones, les souris transgéniques ne développent pas la pathologie de type SLA (Clement *et al.*, 2003; Lino *et al.*, 2002; Pramatarova *et al.*, 2001). Le même constat est fait si les protéines SOD1 mutées sont exprimées seulement dans les astrocytes (Gong *et al.*, 2000). Ce dernier résultat *in vivo* est contesté par des données récentes obtenues avec des co-cultures dans lesquelles des motoneurones sauvages dégénèrent en présence d'astrocytes exprimant des protéines mutantes SOD1 (Di Giorgio *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2007). Au contraire, si la quantité de protéines mutées diminue dans les astrocytes de souris SOD1, la survie des animaux est fortement augmentée (Yamanaka *et al.*, 2008). La mort des motoneurones dépend, au moins en partie, des cellules environnantes (Clement *et al.*, 2003) via des voies de signalisation impliquant le NO intracellulaire (Ferri *et al.*, 2004; Raoul *et al.*, 2002). Il faut aussi noter que les agrégats

contenant des protéines SOD1 mutées sont observés à la fois dans les motoneurones spinaux et les astrocytes de patients SLA et de souris transgéniques (Bruijn *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2001) et sont aussi détectés à partir de broyats de moelle épinière de souris transgéniques (Johnston *et al.*, 2000; Puttaparthi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002). De plus les agrégats contenant des protéines SOD1 sont détectés dans les astrocytes et les motoneurones du modèle G85R bien avant que le phénotype clinique soit apparent et leur quantité augmente avec la progression de la maladie (Bruijn *et al.*, 1997).

Les astrocytes semblent aussi jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie dans le cadre des mécanismes de toxicité liée au glutamate. En effet, parallèlement aux observations effectuées sur des patients atteints de forme sporadique, les souris transgéniques SOD1-G85R présentent une diminution de l'expression du transporteur glial du glutamate GLT1 (ou EAAT2) (Bruijn *et al.*, 1997; Canton *et al.*, 1998). Le transporteur GLT1 est le transporteur majoritaire dans la moelle épinière et prend en charge la quasi-totalité de la recapture du glutamate (Danbolt, 2001). Dans le modèle de rat transgénique SOD1-G93A, une perte de GLT1 est aussi reportée (Howland *et al.*, 2002). Un lien entre la protéine SOD1 mutée et GLT1 est possible grâce à une étude montrant qu'au niveau d'ovocytes de xénopes l'expression de protéines mutées SOD1 (A4V ou I113T) inactive spécifiquement GLT1 (Trotti *et al.*, 1999). Il a récemment été montré qu'une classe d'antibiotique (β -lactame) augmente la transcription de GLT1 avec pour conséquence de retarder l'apparition du phénotype clinique et de rallonger la survie des animaux (Rothstein *et al.*, 2005).

Les astrocytes auraient en plus la capacité de stimuler l'expression de GluR2 des motoneurones spinaux (Van Damme *et al.*, 2007). Dans cette dernière étude les auteurs montrent aussi que les astrocytes qui expriment une protéine SOD1 mutante perdent cette

propriété et les motoneurones environnants sous-expriment GluR2 et possèdent alors des canaux AMPA plus perméables au calcium (Van Damme *et al.*, 2007). La régulation de l'expression de GluR2, en plus de la mauvaise clairance du glutamate par GLT1, pourrait être un second mécanisme par lequel les astrocytes environnants contribuent à la physiopathologie de la SLA (Van Damme *et al.*, 2007).

Une étude récente (Jaarsma *et al.*, 2008) indique qu'une pathologie type SLA se développe chez la souris lorsque les protéines mutantes SOD1-G93A sont spécifiquement exprimées au niveau des motoneurones mais à un taux plus élevé que dans les précédentes études sur les modèles G37R (Pramatarova *et al.*, 2001) et G85R ou G93A (Lino *et al.*, 2002).

Cependant, pour ces souris, l'apparition du phénotype clinique et la mort des animaux sont significativement retardées par rapport aux souris SOD1-G93A qui expriment les protéines mutantes de façon ubiquitaire (Jaarsma *et al.*, 2008), soulignant la contribution de l'environnement glial dans la physiopathologie de la SLA.

MATERIEL ET METHODES

1 - LA SOURIS C57BL /6J ET LE MODELE TRANSGENIQUE SOD1-G85R

Ce travail de thèse a été réalisé avec deux souches de souris : une souche sauvage C57Bl /6J (WT) utilisée comme contrôle et une souche transgénique homozygote SOD1-G85R de la lignée 148, utilisée comme modèle de SLA (Bruijn *et al.*, 1997). Les souris SOD1-G85R ont initialement été fabriquées à San Diego (USA, CA) au Ludwig Institute for cancer research (dirigé par Don Cleveland). L'élevage du laboratoire a été fait à partir de deux couples de souris SOD1-G85R de la lignée 148 provenant de l'unité INSERM-382 (Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II). Le procédé de fabrication de ces souris est identique à celui décrit pour le modèle SOD1-G37R (Wong *et al.*, 1995). En résumé, les souris transgéniques ont été fabriquées à partir de souris hybrides obtenues par croisement entre souris des souches C57BL /6J et C3H/HeJ. Dans le génome de ces souris hybrides plusieurs copies du gène SOD1 humain avec la mutation G85R ont été incorporées. La mutation G85R est une mutation ponctuelle affectant le gène codant pour la SOD1 avec un résidu Glycine substitué par un résidu Arginine en position 85. Ensuite huit backcross successifs avec des souris de la souche sauvage C57Bl /6J ont été réalisés sur ces hybrides. Le patrimoine génétique des deux souches utilisées pour cette étude comparative est donc identique à plus de 99,8%. L'évolution de la pathologie et l'apparition chez ces animaux de certains signes cliniques majeurs ont été décrits de manière précise pour la lignée 148 (Bruijn *et al.*, 1997) (voir table B).

Au laboratoire les souris SOD1-G85R sont maintenues à l'état homozygote et élevées dans les conditions standard, comme pour les souris WT, avec un cycle lumière-obscurité de 12 heures et un libre accès à la nourriture. Dans nos conditions d'élevage, nous avons observé que la période de gestation est équivalente entre les deux souches (21 jours). Le jour postnatal 0 (P0) est défini comme les 24 premières heures qui suivent la naissance et toutes les expériences sur les deux lignées ont été réalisées à partir d'animaux entre P1 et P12. Les

individus de 89 portées (N=52 pour les WT et N=37 pour les SOD1) ont été pesés tous les jours à partir de P2 pendant les trois premières semaines post-natales (de P2 à P20). Le poids moyen des souriceaux à P2 est de $1,73 \pm 0,24$ grammes pour les WT et de $1,76 \pm 0,31$ grammes pour les SOD1 avec respectivement une prise de poids quotidienne de $0,38 \pm 0,01$ grammes et de $0,36 \pm 0,01$ grammes. Les courbes d'évolution de poids des deux souches montrent qu'il n'y a pas de différence en période post natale (Fig. 1A).

Au contraire, le nombre de souriceaux par portée est significativement supérieur pour les souris SOD1 ($6,4 \pm 0,2$ pour les WT n=72 portées et $7,6 \pm 0,3$ pour les SOD1-G85R n=59 portées, $P=0,0011^{**}$, Fig. 1B).

2 - ANALYSE COMPORTEMENTALE

Les tests comportementaux réalisés dans cette étude ont été élaborés par Fox en 1965 (Fox, 1965). Ces tests ont depuis été couramment utilisés pour évaluer le degré de maturation des capacités sensori-motrices des souriceaux provenant de différentes lignées.

L'expérimentation consiste à observer les souriceaux au cours de tests et à enregistrer le jour d'apparition de réflexes sensori-moteurs. La réalisation de ces tests ne nécessite aucun matériel particulier.

Les souriceaux ont été testés tous les jours à partir de P1 jusqu'à l'apparition de la réponse adaptée au stimulus. Les huit tests utilisés sont décrits dans la section suivante.

Définition des tests réalisés.

Retournement (righting). Pour ce test les souriceaux sont placés sur le dos. Le test est considéré comme réussi lorsque l'animal se retourne en moins de dix secondes avec la partie plantaire de chaque patte en contact avec le sol.

Agrippement avant et arrière (Grasping). La partie plantaire de la patte (autopode) est délicatement stimulée avec la pointe d'un crayon. L'animal mature répond par une flexion de l'autopode et saisit la pointe du crayon.

Placement avant et arrière (Placing). Un objet est placé au contact de la partie dorsale de la patte de l'animal. L'animal doit alors placer sa patte sur cet objet.

Placement par stimulation des vibrisses (Vibrissae placing). L'animal est suspendu par la queue et ses vibrisses sont stimulées avec la pointe d'un crayon présenté à l'animal parallèlement à l'axe longitudinal du corps. Le souriceau doit alors agripper le crayon avec ses pattes antérieures.

Évitement de l'à-pic (cliff drop aversion). Le souriceau est placé au bord d'un plan vertical, les pattes avant et le museau dans le vide. Lorsque le souriceau ne rampe pas en direction du vide et évite la chute, la réponse est considérée comme positive. Lorsque les animaux ne rampent plus et sont capables de soutenir leur poids, cette condition expérimentale entraîne le recul de l'animal qui s'éloigne du plan vertical.

Réflexe d'extension croisée (crossed extensor reflex). L'expérimentateur pince délicatement entre le pouce et l'index une patte postérieure de l'animal qui répond alors par une extension du membre contralatéral et une flexion du membre stimulé. Ce réflexe, caractéristique de souriceaux nouveaux-nés, disparaît avec l'âge. Pour ce test, le jour de disparition de la réponse a été noté pour chaque souris.

3 - PREPARATION MOELLE EPINIÈRE / TRONC CEREBRAL ISOLEE.

La préparation *in vitro* de moelle épinière / tronc cérébral isolée a été utilisée pour toutes les expériences d'électrophysiologie et de marquage des motoneurones.

Les souriceaux (jour postnatal P3-P10) ont été anesthésiés par hypothermie, la durée d'exposition aux conditions d'hypothermie (congélateur à -30°C) étant proportionnelle au poids et donc à l'âge des animaux (de 4 à 9 minutes). A la naissance, les souriceaux n'ont pas de régulation thermique et sont donc anesthésiés par un ralentissement progressif du métabolisme. Ce type d'anesthésie permet de garder une préparation éloignée de tout produit toxique exogène et viable pendant plusieurs heures.

Ensuite les souriceaux sont décapités au niveau des colliculi inférieurs, éviscérés et fixés sur une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'une résine transparente (Sylgard®). La boîte de Pétri est remplie par une solution de liquide physiologique à pH 7,4 à température ambiante (voir plus bas), et l'animal est épinglé face dorsale vers le haut afin de procéder au prélèvement de la moelle. Au niveau dorsal la peau et les tissus superficiels sont retirés, le cartilage osseux de la partie crânienne restante est incisé et les vertèbres sont sectionnées bilatéralement le long de la moelle (laminectomie) à partir du niveau cervical jusqu'au niveau sacré (7 vertèbres cervicales, 13 thoraciques, 6 lombaires, 4 sacrales et 6 caudales).

A l'aide de pinces fines, les méninges sont délicatement incisées en partie médiane et ensuite retirées en prenant soin de ne pas léser la moelle. Toute la dissection est pratiquée sous une loupe binoculaire (grossissement de 6x à 24x) à l'aide de pinces ultra fines (diamètres des pointes = 0,1 micron) et de ciseaux ophtalmologiques de taille variable.

La moelle épinière est ensuite récupérée avec les racines dorsales et ventrales puis placée dans une chambre d'enregistrement (Fig. 2A) continuellement perfusée avec une solution de liquide physiologique bullé avec un mélange à 95% de O_2 et 5% de CO_2 . La température du liquide perfusé est constamment ajustée par effet Peltier à 24°C grâce à un thermocontrôleur (Harvard TC-202A). Le pH est ajusté à 7,4 au début de l'expérience. La composition du liquide physiologique se rapproche le plus possible du liquide cérébrospinal et les concentrations des différents sels et du glucose sont données ci-dessous (en mM) :

NaCl, 130 ; KCl, 4 ; MgCl₂, 1,2 ; NaH₂PO₄, 1 ; CaCl₂, 2 ; NaHCO₃, 25 ; glucose, 30.

Pour les expériences réalisées en milieu sans magnésium, le MgCl₂ a simplement été omis lors de la préparation du liquide de perfusion. Cette différence de composition du milieu n'entraîne qu'une faible variation de l'osmolarité (moins de 1 %). L'osmolarité passe de 360,6 milli-osmoles dans le milieu classique à 357 milli-osmoles dans le milieu sans Mg²⁺. Certains enregistrements intracellulaires ont été réalisés avec 4mM de CaCl₂ (différence d'osmolarité de 1,6 % entre les deux solutions).

4 - ELECTROPHYSIOLOGIE

Pour quelques expériences avec application de substances pharmacologiques, deux préparations (une issue de souris WT et l'autre de souris SOD1) ont été placées dans la même chambre d'enregistrement. Ces expériences ont été réalisées dans le but d'effectuer des enregistrements simultanés afin de pouvoir comparer les réponses des deux types de préparation dans les mêmes conditions expérimentales.

a) Enregistrements extracellulaires des sorties motrices

Des électrodes monopolaires en acier sont placées contre les racines ventrales des segments lombaires et sacrés, le tout étant isolé du milieu environnant par de la vaseline soigneusement déposée avec une seringue. L'électrode de référence est une électrode métallique plantée dans la couche de Sylgard® en contact avec le liquide de perfusion et reliée à un point électriquement neutre (masse).

Les signaux extracellulaires ainsi enregistrés au niveau des racines ventrales (sorties motrices) sont amplifiés (gain=10000x) filtrés (bande passante : 0,07 -1 KHz) et digitalisés à une fréquence d'acquisition de 1 KHz (Digidata 1322, Axon Instruments, logiciel Clampex 9.0). L'activité nerveuse recueillie « en passant » sur une racine ventrale est le

reflet direct du niveau d'activité de l'ensemble des motoneurones dont les axones projettent dans cette racine (Fig. 2B1). De cette manière nous avons enregistré la sommation des potentiels d'action unitaires circulant dans les axones de plusieurs motoneurones issus de divers pools. L'amplitude du signal est aussi le reflet de la synchronisation de ces motoneurones.

Les racines dorsales ont été isolées comme décrit ci-dessus afin de pouvoir stimuler électriquement les voies afférentes. Des stimulations d'intensité variable (seuil entre 2 et 20 μA) ont été appliquées à l'aide d'une unité d'isolement (Isoflex ; AMPI, Jerusalem, Israël). De cette manière, la boucle réflexe segmentaire est périodiquement utilisée comme indicateur de viabilité de la préparation au cours de l'expérimentation.

b) Enregistrements intracellulaires des motoneurones et des interneurones

Les enregistrements intracellulaires ont été réalisés à l'aide d'électrodes fines constituées de micropipettes de verre. Les micropipettes sont fabriquées à l'aide d'une étireuse horizontale (modèle P-97, Sutter Instruments) à partir de tubes de verre de 1,2 mm de diamètre externe contenant un filament (Clark Instruments). Les électrodes sont remplies par capillarité avec de l'acétate de potassium à 2 molaires (K-Ac 2M). Les résistances des électrodes ainsi préparées varient de 80 à 130 M Ω .

Au niveau du départ de la racine ventrale du 5^{ème} segment lombaire, pour permettre la pénétration de la microélectrode, la pie mère est délicatement retirée à l'aide de pinces ultra fines. Seul le segment L5 a été étudié car des études de localisation des pools de motoneurones lombaires par marquage rétrograde avec un colorant injecté dans les muscles ont montré que ce segment contient un plus faible nombre de pools de motoneurones comparés aux segments L1 à L4 (McHanwell et Biscoe, 1981). Chez la souris ce segment est homogène et contient préférentiellement (dans ses 2/3 les plus caudaux) des pools de

motoneurones innervant la musculature intrinsèque du pied (musculature plantaire et dorsale) qui sont situés dans la partie latérale de la corne antérieure de la moelle appréhendée en section transversale (McHanwell et Biscoe, 1981).

Ensuite, à l'aide d'un micromanipulateur hydraulique 3D (Narishige), les motoneurones sont piqués entre 150 et 450µm de profondeur à partir de la surface ventrale de la moelle en formant un angle d'environ 45° entre la moelle et l'électrode (Fig. 2B3).

Les motoneurones sont identifiés par leur réponse antidromique évoquée suite à la stimulation de la racine ventrale L5 (Fig. 2B2). Seuls les motoneurones avec un potentiel d'action antidromique d'une amplitude minimale de 55mV et présentant un potentiel au sommet du PA supérieur à 0mV sont considérés dans cette étude. Les potentiels intracellulaires sont enregistrés avec un électromètre (Axoclamp-2B) soit en mode *Bridge* soit en mode *Discontinuous Current Clamp* (DCC). Les signaux sont ensuite digitalisés par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322, Axon Instruments) avec une fréquence d'acquisition de 10KHz. L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées avec les logiciels Clampex et Clampfit 9.0 (Axon instruments).

c) Pharmacologie

L'activité motrice est principalement induite par des applications de N-méthyl-DL-aspartate (NMA, 2 à 20 µM) et de sérotonine-crétinine sulfate (5-HT, 1 à 20 µM) mélangés au liquide physiologique et perfusés simultanément. A ce cocktail, la dopamine-hydrochlorée (DA, 30 à 75 µM) est parfois ajoutée. Les substances utilisées proviennent toutes des laboratoires Sigma ou Tocris. En plus du NMA, de la 5-HT et de la DA, il a aussi été appliqué de la même manière lors de certaines expériences, du threo-B-benzyloxy-DL-aspartate (DL-TBOA, 20 à 100µM qui est un inhibiteur non transportable des systèmes

de recapture du glutamate GLT1, GLAST et EAAC1), de l'acide D-amino-5-phosphonovalérique (D-APV, 80 μ M), du MK-801 (50 μ M), du 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX 10 μ M) et de la tétrodotoxine (TTX, 1 μ M). Toutes ces substances sont stockées à -20°C sous forme d'aliquotes. Ces substances sont appliquées soit seules, soit en association, pour des durées variant entre 20 à 40 minutes selon les expériences. Entre chaque application, un rinçage (perfusion de liquide physiologique) de 30 minutes minimum, est réalisé.

d) Méthode d'analyse des enregistrements électrophysiologiques

o *Analyse de l'activité spontanée.*

L'activité spontanée enregistrée sur les racines ventrales lombaires L3 et L5 est comparée entre les deux souches de souris. La comparaison est effectuée dans deux milieux : un milieu de perfusion classique dans lequel la concentration de MgCl₂ est de 1,2mM, et un milieu sans magnésium. Le nombre d'événements (potentiels d'action globaux) et l'intervalle inter événement (IE) sont les deux variables qui sont comparées entre les deux lignées. Les événements sont dénombrés par détection de pics après seuillage à partir des tracés rectifiés (Fig. 3).

Dans le milieu classique, le calcul du nombre d'événement est réalisé sur des périodes de dix minutes. Pour toutes les racines, nous avons déterminé les seuils à partir de la formule suivante : Seuil = bruit de fond + 33% [P_{Amax} - bruit de fond] ; avec P_{Amax}= amplitude du plus grand potentiel d'action. Dans le milieu sans Mg²⁺, la comparaison est effectuée sur une période de trois minutes. Pour toutes les racines, les seuils ont été définis à partir de la formule suivante : Seuil = bruit de fond + 6.5% [P_{Amax}- bruit de fond].

Pour les deux souches de souris, WT et SOD1-G85R, comme l'activité est plus importante dans le milieu sans Mg²⁺, l'amplitude du P_{Amax} est plus grande alors que le bruit de fond

n'est pas supérieur (observation effectuée sur 5 racines pour lesquelles au cours de la même manipulation les deux milieux ont été perfusés). Cela explique la différence du pourcentage pris pour définir les seuils.

- *Effet des substances pharmacologiques*

Afin de déterminer si les applications de substances pharmacologiques (NMA, NMDA, 5-HT et DA) modifient l'activité motrice enregistrée au niveau des racines ventrales, les tracés sont rectifiés et l'aire sous la courbe avant et pendant l'application est reportée graphiquement en fonction du temps (par tranche de 5 secondes). Après une régression linéaire, une valeur de pente positive et significativement différente de zéro indique un effet de l'application. Chez les rongeurs, ces substances pharmacologiques sont connus pour déclencher une activité rythmique enregistrée sur les racines ventrales à partir de la préparation in vitro de moelle épinière / tronc cérébral isolée (pour revue Kiehn, 2006). Les relations de phase entre les alternances des segments opposés et des racines de nature fléxogènes et extensogènes peuvent être étudiée pour quantifier les paramètres de l'activité rythmique appelée « locomotion fictive » (Pearlstein *et al.*, 2005). Ce type d'analyse n'est pas réalisé dans ce travail de thèse dans lequel nous avons favorisé l'analyse qualitative et comparé entre SOD1 et WT le nombre de racines dont l'activité augmente pendant les applications et la présence ou l'absence d'alternances lors des activités rythmiques.

- *Propriétés électriques des motoneurones enregistrés en intracellulaire*

L'analyse des enregistrements intracellulaires est réalisée avec le logiciel Clampfit (version 9.0. Axon Instruments).

Potentiel de repos.

Le potentiel de repos est déterminé pendant l'expérimentation par simple lecture du voltage donné par l'axoclamp quelques minutes après l'empalement de la cellule une fois le potentiel de membrane stabilisé. A la fin de l'enregistrement, en sortant l'électrode de la cellule, nous vérifions la valeur de voltage affiché en extracellulaire et dans quelques cas le potentiel de repos est réajusté.

Résistance d'entrée

La détermination de la résistance d'entrée des motoneurones est réalisée à partir des mesures des déflexions de voltage en réponse à des créneaux de courant hyperpolarisant et dépolarisant d'une durée de 350 ms injectés par la microélectrode. La gamme de courant utilisée (de -0,4 à +0,4 nA avec des sauts successifs de 0,05nA) a été déterminée afin d'étudier les propriétés linéaires des motoneurones et d'éviter l'activation de courants de rectification activés pour des potentiels très négatifs. La mesure du voltage est réalisée sur les 50 dernières ms des pulses. Pour chaque motoneurone, trois protocoles identiques et successifs sont effectués et à chaque intensité de courant la moyenne des trois valeurs de voltage est prise en compte pour construire la relation entre le voltage et l'intensité ; d'après la loi d'Ohm ($V=RI$) la pente de la régression linéaire détermine la valeur de la résistance d'entrée.

Mesure de la constante de temps et calcul de la capacité membranaire

La constante de temps membranaire (τ_m) est mesurée pendant l'injection d'un créneau hyperpolarisant de 0,5nA d'intensité. (τ_m) correspond au temps que le potentiel de membrane met pour atteindre 63% de la déflexion de voltage. La réponse du motoneurone suit un décours exponentiel avant de se stabiliser à une valeur de potentiel qui dépend de sa

résistance d'entrée (R_{in}). Pour chaque cellule à partir de 10 à 20 tracés moyennés, la constante de temps est calculée à partir du décours exponentiel par le logiciel Clampfit. La capacité membranaire (C_m) est donnée par la relation : $(C_m) = (\tau_m) / (R_{in})$; où R_{in} est la résistance d'entrée de la cellule mesurée comme décrit précédemment.

Gains des relations intensité fréquence et fréquences maximales de décharge

L'étude de la fréquence de décharge des motoneurones est réalisée avec des pulses de courant de longue durée (850ms) et d'intensité croissante. Les sauts successifs de courant sont soit de 0,1 nA soit de 0,2 nA en fonction de l'excitabilité de la cellule enregistrée. Pour chaque valeur d'intensité, la fréquence moyenne de décharge sur les 500 dernières millisecondes, après la phase initiale d'adaptation, est calculée par le logiciel Clampfit afin de construire la relation intensité-fréquence (I-F). Avec ce protocole et dans nos conditions expérimentales, la relation entre la fréquence de décharge et l'intensité du courant injecté est toujours linéaire. Les motoneurones déchargent dans la première gamme de fréquence (pour revue Brownstone, 2006). Le gain du motoneurone est donné par la pente de la régression linéaire. Comme pour la détermination de la résistance d'entrée, trois protocoles identiques sont successivement appliqués pour chaque motoneurone et à chaque intensité la moyenne des trois fréquences de décharge obtenues a été considérée pour la construction de la courbe I-F. La fréquence maximale de décharge des motoneurones est calculée par Clampfit pendant l'injection du créneau de courant de plus grande intensité.

Pour construire la courbe I-F lors de l'injection de créneaux de courant et déterminer le gain des motoneurones, certains auteurs ne considèrent que la fréquence instantanée entre les deux premiers potentiels d'action (Kuo *et al.*, 2004). A partir des mêmes tracés nous avons aussi mesuré la fréquence instantanée des deux premiers potentiels d'action (PA) au début du créneau pour chaque intensité de courant injecté. De cette manière nous avons

ainsi construit une seconde relation I-F, et dans nos conditions expérimentales, cette relation vérifie une courbe sigmoïde pour tous les motoneurones enregistrés. Dans ce cas là, le gain du motoneurone a été mesurée lors de l'accélération de la fréquence de décharge (2^{ème} gamme de décharge : 2nd range en anglais). La fréquence instantanée maximale entre les deux premiers PA (f_{\max}) et le I_{50} (intensité à laquelle le motoneurone décharge à une fréquence égale à la moitié de la fréquence maximale) sont déterminés pour chaque motoneurone à partir des courbes sigmoïdes.

Courant de rhéobase

Dans ce travail, le courant de rhéobase (I_{rh}) est défini comme l'intensité minimale de courant nécessaire pour évoquer un potentiel d'action pendant l'injection des pulses de courant utilisés pour construire les courbes I-F (trois protocoles identiques).

Seuil de déclenchement du PA

Le seuil de déclenchement des potentiels d'action (PA_{seuil}) est la valeur du voltage mesuré au pied du PA déclenché par le courant de rhéobase. La mesure du voltage est faite au pied du PA (trois protocoles identiques).

Caractéristiques des potentiels d'action antidromiques et orthodromiques

Pour les potentiels d'action antidromiques et orthodromiques, l'amplitude (mV), la durée (ms), la demi-durée (ms), le temps de montée (10-90%, en ms), la vitesse de dépolarisation (mV/ms), la valeur maximale de la vitesse de dépolarisation (mV/ms), le temps de repolarisation (90-10%, en ms), la vitesse de repolarisation (mV/ms) et la valeur maximale de la vitesse de repolarisation (mV/ms) sont mesurés sur un minimum de 3 PA par motoneurone. La demi-durée du PA correspond à la durée pendant laquelle le potentiel de

membrane du motoneurone reste dépolarisé au dessus de la moitié de l'amplitude totale du PA. Pour les potentiels d'action antidromiques la mesure de la latence d'apparition du PA est aussi mesurée. La figure 4A illustre la façon dont l'amplitude (1), la demi-durée (2), les temps et vitesse de montée (3 et 4), les temps et vitesse de repolarisation (5 et 6) du PA antidromique sont mesurés. Dans le cas des motoneurones pour lesquels une post-dépolarisation importante (>à 10% de l'amplitude du PA) est enregistrée (voir Fig. 4A, 4C et 4D) les valeurs concernant la vitesse de repolarisation sont exclues de l'analyse statistique. Par contre la post-dépolarisation n'influe pas la vitesse de repolarisation maximum et pour ce paramètre les statistiques sont faites avec l'échantillon complet. Des stimulations infraliminaire de la racine ventrale peuvent déclencher dans les motoneurones des potentiels post synaptiques (Fig. 4B et 4D). Ces potentiels sont probablement dus à l'activation des cellules de Renshaw par des collatérales d'axones. En injectant directement dans le motoneurone un courant continu à l'aide de la microélectrode intracellulaire il est possible d'inverser l'effet dépolarisant de ces potentiels (voir Fig. 4B). La post hyperpolarisation des potentiels d'action antidromiques (AHP en anglais) n'est pas mesurée du fait de l'existence de ces potentiels postsynaptiques lors de stimulations infraliminaire.

Paramètres de la post-hyperpolarisation (AHP)

Immédiatement après un PA, il y a une première phase de l'AHP (AHP brève), qui dure généralement 1-10ms et qui est due à l'activation des conductances potassiques voltage-dépendantes qui sous-tendent la repolarisation du PA (Sah, 1996). Après cette phase rapide de l'AHP, il est possible d'enregistrer une phase qui dure plusieurs dizaines de millisecondes (longue AHP) et qui est due à l'activation de conductances potassiques dépendantes de la concentration de calcium intracellulaire (Sah, 1996). Les résultats présentés dans ce travail font référence à cette partie de l'AHP. Les paramètres suivants

sont mesurés sur un minimum de trois PA déclenchés par le courant de rhéobase : l'amplitude maximale de AHP (en mV), le temps mis pour atteindre le maximum d'amplitude (ms), la durée totale de l'AHP (ms), le temps de repolarisation de l'AHP (ms).

Protocole de stimulation en rampe

Pour quelques motoneurones enregistrés, nous avons appliqué des rampes de courant (courants triangulaires) de différente intensité (pente: $0,21 - 1,47 \text{ nA}\cdot\text{s}^{-1}$; durée : $5,4 - 10,8$ s) dans le but de comparer les réponses dans chaque lignée. Ce protocole de stimulation est complémentaire des stimulations en créneau car il est connu pour activer les conductances persistantes importantes pour l'excitabilité des motoneurones (Bennett *et al.*, 2001; Button *et al.*, 2006; Li et Bennett, 2003; Powers et Binder, 2003). Pour chaque rampe nous avons construit les relations intensité de courant – fréquence de décharge. Le $I_{\text{début}}$ est défini comme l'intensité de courant pour laquelle le premier PA est enregistré lors de la rampe montante et le I_{fin} comme l'intensité de courant pour laquelle le dernier PA est enregistré lors de la rampe descendante. Le gain est donné par la pente de la régression linéaire de la relation I-F sur la partie montante et la fréquence maximale de décharge est mesurée au sommet de la rampe toujours sur la partie montante. Dans un second temps les décharges des motoneurones et les paramètres définis ci dessus sont considérés seulement pour les rampes de vitesse lente ($<0,85 \text{ nA}\cdot\text{s}^{-1}$), qui sont le plus susceptibles d'activer des conductances persistantes (Bennett *et al.*, 2001).

5 - MARQUAGE INTRACELLULAIRE ET MORPHOLOGIE DES MOTONEURONES

A la fin des expériences d'électrophysiologie, certains motoneurones ont été injectés par la neurobiotine dans le but de caractériser leur propriétés morphologiques.

a) Protocole d'injection intracellulaire du marqueur neuronal

L'injection intracellulaire de neurobiotine (Vectorlab®) est réalisée lors des expériences électrophysiologiques sur la préparation tronc cérébral / moelle épinière isolée à partir de souriceaux entre P4 et P9. La microélectrode est remplie d'une solution de K-Ac à 2 molaires dans laquelle la neurobiotine diluée à 2% est rajoutée. Le procédé expérimental concernant l'enregistrement intracellulaire est décrit dans la partie précédente. La neurobiotine est injectée dans le motoneurone par électrophorèse via l'application de créneaux de courant dépolarisant (intensité de 1 à 4 nA) d'une durée de 150 ms à la fréquence de 3 Hz, pendant 10 à 12 minutes. La moelle épinière est ensuite maintenue dans la chambre d'enregistrement pour une durée de 1 heure à 2 heures afin de permettre la diffusion de la neurobiotine dans les parties les plus distales du motoneurone. La préparation tronc cérébral / moelle épinière isolée est ensuite fixée toute la nuit à 4°C dans une solution saline de tampon phosphate (PBS) avec 4% de paraformaldéhyde. Puis, la préparation est placée dans un bloc d'agarose à 3% (pour faciliter la coupe) dont un angle est sectionné afin de contrôler l'orientation des coupes sur les lames. Pour la coupe, le bloc est placé dans du PBS au pH de 7,3 et sectionné dans le plan transversal de la moelle pour obtenir des coupes sériées de 75 µm (microtome coulissant MICROM HM 650 V). Puis les coupes sèchent à l'air libre toute la nuit avant de pouvoir révéler le marquage neurobiotine par une procédure de révélation avidine-HRP-diaminobenzidine classique. Enfin les coupes sont montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage aqueux.

b) Reconstruction des motoneurones

Les cellules reconstruites ont fait l'objet de critères de sélection stricts. Premièrement, les cellules doivent avoir une membrane somatique intacte, un bon contraste avec un faible bruit de fond, et lorsque plusieurs motoneurones sont marqués au sein de la même série de

coupes, ces derniers n'ont pas été reconstruits. Les motoneurones présentant une faible intensité de marquage ont été écartés de l'étude morphométrique.

Une première reconstruction à la chambre claire avec un microscope (Axiophot ZEISS) réglé sur un objectif x20 est réalisée pour faire un repérage de tous les segments marqués sur chaque coupe et déterminer le nombre de coupes sur lesquelles s'étend l'arborisation dendritique du motoneurone. Pour les zones les plus complexes, les objectifs x40 ou 100x sont utilisés afin de pouvoir repérer les segments colorés avec une meilleure définition.

Les cellules marquées sont ensuite reconstruites de manière précise à plus fort grossissement grâce au logiciel Neurolucida® (version 7, MBF Bioscience Inc., Williston, VT) installé sur un ordinateur relié à un microscope Nikon réglé sur l'objectif 20x.

Cependant, la projection sur l'écran de l'image obtenue avec l'objectif 20x du microscope est observée avec un zoom numérique de 3 tel que le grossissement final est de 60x. Une interface numérique contrôlant la platine motorisée permet d'encoder les coordonnées (x,y,z) des points entrés grâce au logiciel Neurolucida. L'acquisition de ces points s'effectue à l'aide d'un curseur circulaire de diamètre variable ajusté en fonction de celui du segment dendritique considéré. La fréquence d'acquisition choisie ici est très élevée puisqu'un point est entré pour chaque changement de diamètre et de direction du segment dendritique. Le nombre total de points (x,y,z) encodés par reconstruction est distribué de 5923 à 17780 pour les motoneurones WT et SOD1. Les frontières externes des coupes de moelle sont également tracées. Un facteur de correction est appliqué dans l'axe des Z (épaisseur) à la fin de la reconstruction afin de compenser la distorsion introduite par la procédure histologique. En effet, un rétrécissement (*shrinkage* en anglais) dû à la fixation au séchage à l'air libre et au montage entre lame et lamelle interfère avec les propriétés métriques. Ce rétrécissement est pris en compte et corrigé pour pouvoir comparer les

paramètres métriques des motoneurones reconstruits en 3D. Pour déterminer le facteur de correction nous avons procédé comme suit pour chaque motoneurone:

pour les trois coupes les plus médianes (la coupe contenant le corps cellulaire et les deux coupes adjacentes) les prolongements dendritiques sont suivis du bord supérieur jusqu'au bord inférieur des différentes coupes et l'épaisseur moyenne est alors calculée (de 18,8 à 29,2 μm). Sachant que l'épaisseur de coupe initiale est de 75 μm , un facteur d'écrasement (de 0,25 à 0,39) est calculé en effectuant le rapport épaisseur moyenne mesurée sur l'épaisseur initiale des coupes. Ensuite un facteur de correction dans l'axe des Z est appliqué pour chaque motoneurone en fonction de son propre facteur d'écrasement (de 2,57 à 3,99). Par exemple pour un motoneurone dont l'épaisseur moyenne des coupes est mesurée à 25 μm , un facteur de correction de 3 a été appliqué dans le Z pour compenser le rétrécissement (facteur d'écrasement de 0,33). Le rétrécissement dans les autres dimensions n'est pas compensé car il est considéré comme négligeable comparé à celui observé dans l'épaisseur. Pour comparaison, nous avons mesuré les longueurs dorso-ventrales et les largeurs de moelles à partir de tranches vivantes de moelle lombaire prises au même âge. Ces mesures sont équivalentes aux valeurs données par le système NeuroLucida à partir des bords externes des moelles fixées contenant les motoneurones marqués.

c) Les mesures morphométriques.

Les cellules reconstruites sont visualisées et analysées avec le logiciel NeuroLucida Explorer (version 7, MBF Bioscience Inc., Williston, VT) qui permet d'effectuer les mesures morphométriques et de générer les dendrogrammes, les histogrammes polaires et les diagrammes de Sholl. Les dendrogrammes sont des représentations schématiques en 2D des motoneurones qui conservent la topologie et la géométrie interne des dendrites sans tenir compte de leur position spatiale ou des angles définis par l'orientation des branches.

Les diagrammes de Sholl permettent de représenter le nombre total de points de branchement ou par exemple la longueur dendritique totale en fonction de la distance radiale au soma. Des sections avec un rayon de 25 μm sont utilisées pour délimiter des zones concentriques péri-somatiques et ainsi comptabiliser les éléments du motoneurone en fonction de leur distance euclidienne par rapport au soma (Fig. 5A). Ces diagrammes renseignent considérablement sur l'arrangement dans l'espace des segments dendritiques par rapport au soma (Sholl, 1953).

Dans les histogrammes polaires les motoneurones sont représentés par des sections formant un angle de 30° et appartenant à l'une des douze directions ainsi définies dans les 360° du plan transversal de la moelle. Ces sections possèdent une longueur qui est la somme des longueurs des segments dendritiques ayant la même direction que celle de la tranche. De cette manière les directions préférentielles de la croissance dendritique peuvent être mises en avant (McMullen *et al.*, 1984). Nous avons généré pour chaque motoneurone un histogramme polaire (Fig. 5D). Ensuite pour chacune des douze directions nous avons fait la somme des longueurs des segments dendritiques ayant la même direction en considérant tous les motoneurones de chaque lignée. Enfin pour chaque lignée, le pourcentage représenté par chacune des douze directions est calculé afin de générer un histogramme polaire « moyen » qui illustre les directions préférentielles de la pousse dendritique. Sur un cercle trigonométrique, la direction dorsale pointe vers $0 / 360$ degrés ; la direction médiane vers 90 degrés ; la direction ventrale vers 180 degrés et la direction latérale vers 270° (Fig. 5C).

d) Définition des paramètres mesurés.

A l'aide du logiciel NeuroLucida-Explorer®, plusieurs paramètres morphologiques sont déterminés et caractérisent les propriétés métriques et topologiques des arborisations

dendritiques des motoneurones reconstruits. Les définitions et les abréviations des paramètres analysés sont données ci-dessous :

Paramètres métriques

P_{soma}	Périmètre du soma mesuré dans le plan transversal (μm).
A_{trans}	Aire du soma mesurée dans le plan transversal (μm^2).
Frt_{max}	Maximum feret du soma (en μm , voir Fig. 5B).
Frt_{min}	Minimum feret du soma (en μm , voir Fig. 5B).
D_{soma}	Diamètre du soma (en μm , calculé à partir de A_{trans}).
A_{soma}	Surface membranaire du soma ($\Pi \times D_{\text{soma}}^2$, en μm^2).
D_{prim}	Diamètre moyen des dendrites primaires au départ du soma pour chaque motoneurone (μm).
A_{prim}	Aire totale par motoneurone des sections formées sur le soma par les dendrites primaires (μm^2).
\sum_{Long}	Longueur dendritique totale pour chaque motoneurone (μm).
\sum_{Surf}	Surface dendritique totale pour chaque motoneurone (μm^2).
Long_{max}	Plus grande longueur dendritique du soma à une terminaison pour chaque motoneurone (μm).
Long_{moy}	Longueur dendritique moyenne du soma vers toutes les terminaisons pour chaque motoneurone (μm).

Paramètres topologiques

Den	Nombre de départs dendritiques pour chaque motoneurone.
Brcmt	Nombre de points de branchement pour chaque motoneurone.
Trms	Nombre de segments terminaux par motoneurone.
Sgmt	Nombre total de segments dendritiques par motoneurone.
Ordmax	Ordre dendritique maximal pour chaque motoneurone.
Ordmoy	Ordre dendritique moyen de tous les segments pour chaque motoneurone.
TrmOrdmoy	Ordre dendritique moyen des segments terminaux pour chaque motoneurone.

La plupart de ces définitions sont intuitives mais les mesures relatives au soma nécessitent des explications complémentaires. Les mesures du corps cellulaire des motoneurones sont obtenues à partir de la surface (A_{trans}) définie par le contour externe du soma dans le plan

transversal. Le diamètre du soma (D_{soma}) est calculé à partir d'un cercle de même surface par la formule $A_{\text{trans}} = (\Pi.D_{\text{soma}}^2)/4$. La surface de la sphère de diamètre équivalent a été calculée pour déterminer la surface membranaire du soma ($A_{\text{soma}} = \Pi.D_{\text{soma}}^2$).

Les Frt_{Min} (μm) et Frt_{Max} (μm) sont respectivement la plus petite et la plus grande largeur du contour somatique, définies par NeuroLucida comme si un pied à coulisse était utilisé pour mesurer le soma (NeuroLucida, version 7, MBF Bioscience Inc., Williston, VT, guide utilisateur, p 15-7) (Fig. 5B). La longueur dorso-ventrale et la largeur de la moelle dans le plan transversal ont aussi été mesurées afin de voir si la taille des motoneurones est corrélée avec la dimension de la moelle (Fig. 5C).

6 - MARQUAGE RETROGRADE

A partir de la préparation in vitro de moelle épinière / tronc cérébral isolée, des marquages rétrogrades des pools de motoneurones du segment L5 sont effectués avec de la rhodamine couplée à des billes de dextran (dextran, tetramethylrhodamine, 3000 MW, anionic, lysine fixable ; Molecular Probes®). Après la dissection et la récupération de la moelle épinière (voir § 3 : préparation moelle épinière / tronc cérébral isolée), la partie distale de la racine ventrale est délicatement sortie du liquide physiologique en utilisant une baguette de verre. Cette précaution est nécessaire pour limiter le plus possible la dispersion des cristaux de rhodamine dans le liquide physiologique lorsqu'ils sont déposés sur le bout de la racine ventrale L5. Malgré cette précaution, lorsque la racine est replacée dans le liquide physiologique, certains cristaux se déposent sur d'autres parties de la préparation. Ces derniers sont alors retirés avec du papier absorbant. Ensuite la moelle est placée dans la chambre d'enregistrement continuellement perfusée avec du liquide physiologique bullé avec un mélange à 95% de O_2 - 5% CO_2 pendant plusieurs heures (de 5 heures en moyenne pour les WT à 12 heures pour les SOD1) pour permettre l'acheminement de la rhodamine

jusqu'au corps cellulaire des motoneurones via le transport rétrograde. La chambre d'enregistrement est recouverte de papier d'aluminium et la pièce plongée dans l'obscurité afin de limiter au maximum la photodégradation de la rhodamine. Pour les préparations de souris SOD1 le débit de la perfusion et la température du milieu sont augmentés respectivement de 3 à 6 mL/min et de 24 à 28°C. Ces ajustements sont réalisés afin de favoriser le transport rétrograde plus lent chez les souris SOD1 dès la période embryonnaire (Kieran *et al.*, 2005). La procédure de fixation, de coupe au vibratome et de montage entre lames et lamelles est décrite plus haut (voir § 5 : marquage intracellulaire). Les cellules marquées sont visualisées à l'aide d'un microscope confocal (Olympus FV 500, objectifs 10x et 40x ; longueur d'onde d'excitation du laser 543nm). A partir des coupes de 75 µm d'épaisseur, nous avons comptabilisé les cellules marquées sur chaque coupe adjacente (du rostral vers le caudal). Une cellule est comptabilisée seulement s'il est possible de visualiser dans un plan focal donné son noyau et/ou son nucléole. Pour chaque coupe, les zones contenant des motoneurones marqués sont visualisées à l'objectif 40x avec des sections optiques de 1,5 µm espacées de 3µm sur toute l'épaisseur de la coupe. De cette manière, les cellules marquées situées aux bords supérieurs et inférieurs des coupes ne sont pas comptabilisées deux fois sur des coupes adjacentes.

7 - ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les valeurs présentées dans ce mémoire de thèse sont exprimées en tant que moyenne \pm écart standard à la moyenne (s.e.m.), sauf précision. Quand la distribution des échantillons comparés est normale (vérifiant une courbe de Gauss) et que les variances ne sont pas différentes, des tests paramétriques pour séries non appariées (test-t de Student) sont appliqués pour évaluer la signification statistique des différences observées. Lorsque la distribution est normale mais les variances différentes, la valeur statistique donnée

correspond à un test-t de Student appliqué avec la correction de Welch. Cependant pour la grande majorité des paramètres comparés, nous avons travaillé sur des petits échantillons ($n < 30$) dont la normalité des distributions ne peut être vérifiée. Dans ces cas-là (et dans les cas où la distribution ne suit pas une loi normale), des test non paramétriques sont alors utilisés pour comparer les échantillons : test sur les rangs de Mann-Whitney et test exact de permutation des valeurs de rang qui tient compte de l'amplitude des différences. Dans de rares cas, des différences de significativité ont été trouvées entre ces deux tests ; elles sont alors précisées dans la légende des figures ou des tables correspondantes. Pour l'analyse comportementale, nous avons déterminé pour chaque réflexe sensorimoteur étudié et à chaque jour postnatal, si les proportions de souris répondant correctement sont identiques entre les deux lignées. Pour cette partie, des tests de Fischer exacts sont réalisés pour comparer les effectifs.

Enfin, les corrélations entre deux variables sont testées par le test non paramétrique de Spearman ou le test paramétrique de Pearson selon la distribution des variables considérées (pour ces deux tests la valeur du coefficient de corrélation r sera donné avec la valeur statistique). Pour tous ces tests, la différence entre deux échantillons est significative quand $P < 0,05$ (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$). Toute l'analyse statistique est réalisée avec les logiciels Prism 4 (GraphPAD Softwares) et StatXact-7 (Cytel Inc., Cambridge, MA) pour le test de permutation.

CHAPITRE I
DEVELOPPEMENT SENSORIMOTEUR DES SOURICEAUX
WT ET SOD1

1 - INTRODUCTION.

A la naissance, après 21 jours de vie intra-utérine, les souriceaux ne sont pas pleinement matures et les deux premières semaines postnatales sont une période d'intenses modifications physiologiques comme par exemple l'ouverture des yeux autour de P14 (Le Roy *et al.*, 1998). Certaines de ces modifications se manifestent par l'apparition ou la disparition graduelle de réflexes neurologiques qui dépendent de la maturation du système sensori-moteur (Le Roy *et al.*, 2001; Le Roy *et al.*, 1999). Une batterie de tests comportementaux permet d'étudier ces réflexes et ainsi d'appréhender la maturation des capacités sensori-motrices des souriceaux (Roubertoux *et al.*, 2003). Ces tests sont couramment employés sur des souriceaux de lignées sauvages et mutantes (Dierssen *et al.*, 2002; Le Roy *et al.*, 1998) dans différentes conditions pathologiques (Tremml *et al.*, 1998), ou dans le cas d'exposition à des substances mutagènes ou toxiques (Venerosi *et al.*, 2001).

La maturation des capacités sensori-motrices des souris SOD1 n'avait jamais été abordée par une telle approche comportementale lorsque ce travail a commencé. Pour les modèles transgéniques SOD1, le plus souvent le modèle G93A-G1H, les capacités locomotrices des souris adultes pré-symptomatiques sont évaluées au cours de l'évolution de la maladie par le test du *rotarod* ou par l'étude de la marche sur tapis roulant (Stam *et al.*, 2008; Vercelli *et al.*, 2008; Wooley *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). L'objectif de ces études était de quantifier les déficits moteurs dans le but d'étudier le décours temporel de la maladie ou d'essayer de ralentir l'évolution de la maladie. Dans la huitième semaine postnatale (autour de P60), bien que les souris SOD1-G93A ne présentent pas de déficits moteurs lors de la marche sur tapis roulant, les phases d'appui et les longueurs des pas sont plus longues que pour les souris sauvages (Wooley *et al.*, 2005). Il vient récemment d'être montré par une approche électromyographique que pour certains muscles des pattes postérieures des souris SOD1-G93A, comme le muscle gastrocnémien, le nombre d'unités motrices est déjà

significativement plus faible dès P40 (Hegedus *et al.*, 2007), suggérant que les processus de dénervation ont déjà commencé. A partir de P60, 65% des fibres IIB innervées par des motoneurons de grande taille (motoneurons de type FF pour *fast fatigable*) ont déjà disparu et la force contractile de ces muscles est diminuée de 80% (Hegedus *et al.*, 2008). Il semble donc que les tests comportementaux évaluant les capacités motrices (*rotarod* et tapis roulant) manquent de sensibilité car ils ne permettent pas de déceler des déficits fonctionnels avant l'apparition du phénotype clinique (P90 pour les souris SOD1-G93A). Ces données peuvent suggérer l'apparition de déficits moteurs plus précoces que ceux décrits jusqu'à présent.

Dans ce travail, nous avons utilisé huit des tests comportementaux initialement proposés par Fox en 1965 (Fox, 1965) pour comparer les réponses réflexes des souris SOD1 et WT afin d'évaluer l'influence de la mutation SOD1-G85R sur le développement sensorimoteur des souriceaux pendant la période postnatale et de rechercher d'éventuels déficits moteurs chez les animaux transgéniques.

2 - RESULTATS

Pour les tests de retournement, d'agrippement avant et arrière, de placement avant, d'évitement de l'à-pic et de placement après stimulation des vibrisses, 37 souris provenant de cinq portées ont été testées pour chaque lignée tous les jours de P1 à P6. Concernant les tests d'agrippement arrière et de placement après stimulation des vibrisses, pour chaque lignée des souris provenant de deux portées (n=13 souris WT et n=12 souris SOD1) ont été testées entre P7 et P11 pour vérifier si les déficits comportementaux observés étaient transitoires. Enfin, pour les tests de placement arrière et d'extension croisée, des souris provenant de sept portées (n=46 et n=51 souris WT et SOD1 respectivement) ont été testées

tous les jours jusqu'à que toute la population présente la réponse appropriée à la stimulation.

Analyse comportementale du développement sensorimoteur des souriceaux.

Les graphiques montrant l'évolution des réponses sont présentés dans la figure 6. Pour chaque test et à chaque jour postnatal, la table 1 donne les proportions (exprimées en pourcentage) de souriceaux répondant correctement aux tests ainsi que les valeurs des tests statistiques.

Pour le test de retournement, la proportion de souris SOD1 capables de se retourner une fois placées sur le dos est significativement plus faible quelque soit le jour postnatal considéré. A P3, 65% des souris WT se retournent alors que seuls 19% des souris SOD1 en sont capables. Le retard est récupéré au début de la seconde semaine postnatale. A P7 toutes les souris WT et SOD1 se retournent en moins de 10 secondes.

L'apparition et l'évolution des réponses au test d'agrippement arrière sont comparables au test de retournement avec à chaque jour postnatal considéré des proportions plus faibles pour les souris SOD1. A P6 la réponse correcte est observée pour 36 des 37 souris WT testées alors qu'elle est présente seulement chez 18 des 37 souris SOD1 testées. En seconde semaine postnatale alors qu'à P7 toutes les souris WT ont la bonne réponse seulement 50% des souris SOD1 sont capables de saisir la pointe du crayon une fois l'intérieur de l'autopode stimulé. A P8, bien que 25% des souris SOD1 ne répondent pas à la stimulation, la différence n'est plus significative. Le retard est complètement rattrapé à P11 avec 100% des souris SOD1 présentant la bonne réponse (100 % de souris WT à P7).

Pour le test de placement des membres postérieurs (placement arrière) les différences observées jusqu'à P8 ne sont pas significatives bien que les proportions de souris SOD1 qui

répondent correctement sont plus faible à chaque jour postnatal étudié. De plus les premières réponses positives pour les souriceaux WT sont observées à P2 et seulement à P4 pour les SOD1. A P8 et P9, les proportions de souris SOD1 présentant la réponse correcte sont significativement plus faibles comparées aux réponses des souris WT. Toutes les souris WT à P10 placent correctement leurs membres arrière après la stimulation alors que ce score est atteint à P11 pour les souris SOD1.

Les réponses aux tests de placement et d'agrippement des membres antérieurs ne montrent pas de différence entre les deux lignées contrairement aux réponses observés pour les membres postérieurs. Toutes les souris WT et SOD1 ont une réponse positive à P2 au test d'agrippement avant et à P6 pour le test de placement avant avec une évolution comparable entre les deux lignées.

Pour le test de placement après stimulation des vibrisses (composante sensorielle prépondérante), les différences pendant la première semaine postnatale sont significatives. De P4 à P6 la proportion de souris SOD1 répondant correctement est significativement plus importante. Toutes les souris WT et SOD1 se placent correctement après stimulation des vibrisses à P8.

Pour le test d'évitement de l'à-pic, de P2 à P3 la proportion de souris SOD1 qui évitent l'à-pic est significativement plus importante. A P5, toutes les souris WT et SOD1 sont capables d'éviter la chute.

Nos observations mettent en évidence que la réponse au réflexe d'extension croisée perdure plus longtemps chez les souris SOD1. A P10, la différence est significative, le réflexe d'extension croisée est toujours présent pour 11% des souris SOD1 testées alors que les souriceaux WT les plus âgés présentant ce réflexe sont observés à P9.

3 - DISCUSSION

Avec l'approche comportementale, nous venons de montrer que les souris SOD1-G85R présentent des retards dans l'expression de réflexes dès la première semaine postnatale. Ces anomalies représentent les premiers déficits moteurs décrits dans un modèle transgénique SOD1. Les résultats des tests comportementaux sur les souris WT sont comparables aux précédentes études (Fox, 1965; Le Roy *et al.*, 1999; Le Roy *et al.*, 1998). La maturation de certains réflexes sensori-moteurs est différente chez les souris SOD1-G85R et il est important de noter, dans le cadre de la maladie, que les tests comportementaux pour lesquels les souris SOD1 présentent des retards sont des tests dont la composante motrice est prépondérante (retournement, placement et agrippement) (Le Roy *et al.*, 2001). Le test de retournement nécessite l'intégrité des fonctions musculaires, motrices et labyrinthiques. Un retard dans la maturation des fonctions labyrinthiques est exclu car les souris SOD1 sont en avance pour le test d'évitement de l'à-pic qui dépend principalement de l'intégrité des fonctions labyrinthiques. Les différences observées pour le test de retournement suggèrent donc un retard dans la maturation du contrôle postural et/ou de la composante motrice des souris SOD1. Les tests de placement et d'agrippement des membres postérieurs et antérieurs renseignent sur la motricité des pattes et le développement de la motricité fine pour le réflexe d'agrippement (Le Roy *et al.*, 2001). Pour le test d'agrippement, alors qu'aucune différence n'est observée entre les deux lignées au niveau des membres antérieurs, l'apparition des réponses positives des membres postérieurs est retardée pour les souris SOD1 (table 1). La même dichotomie est observée pour le test de placement avec, pour les souris SOD1, un retard concernant les membres postérieurs seulement. Ces réflexes se bouclent au niveau de la moelle lombaire pour les membres postérieurs et de la moelle cervicale pour les membres antérieurs. Pendant la période périnatale, il a été montré que la maturation de la moelle épinière s'effectue selon un gradient rostro-caudal lié à la

maturation des projections des voies descendantes des centres supérieurs vers leurs cibles spinales (pour revue Vinay *et al.*, 2000b). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un retard de maturation de la moelle épinière et particulièrement des réseaux lombaires chez la souris SOD1. La possibilité d'un défaut de maturation des réseaux lombaires est aussi compatible avec les résultats sur le réflexe d'extension croisée, qui est observé plus tardivement chez les souris SOD1. Ce réflexe est caractéristique des souriceaux immatures et disparaît avec l'âge de façon concomitante à la diminution au niveau des réseaux spinaux du nombre de circuits poly-synaptiques aberrants ainsi qu'à la maturation des mécanismes inhibiteurs (Le Roy *et al.*, 2001). Il semble donc que le retard observé pour le test de retournement soit principalement d'origine spinale bien qu'un retard dans la maturation du contrôle postural (composante musculo-squelettique) reste une possibilité qu'il n'est pas possible d'éliminer complètement avec nos résultats. Une analyse posturale ainsi qu'une étude de la marche dans des conditions réduites de contrainte gravitaire permettraient de nous renseigner sur cette possibilité.

Les réflexes de placement après stimulation des vibrisses et d'évitement de l'à-pic pour lesquels les souris SOD1 sont en avance par rapport aux souris WT sont considérés comme des réponses réflexes dont la composante sensorielle est prédominante (Le Roy *et al.*, 2001). Le test de placement après stimulation des vibrisses renseigne sur le degré de maturation des voies de la sensibilité des vibrisses et le test d'évitement de l'à-pic dépend de la maturation et de l'intégrité des fonctions labyrinthiques.

Pour les tests sensori-moteurs, il a été montré que la taille des portées peut influencer l'apparition des réponses (Tanaka, 1998). Dans cette étude, les auteurs observent des différences entre des souriceaux provenant de portées avec 5 à 7 souris et ceux issus de portées avec 14 à 17 souris (Tanaka, 1998). Alors que dans notre étude, la différence observée dans la taille des portées (§ matériel et méthodes, Fig. 1B.), bien que significative,

semble trop faible pour pouvoir être la cause des déficits moteurs précédemment discutés (environ n=6 et n=7 souriceaux par portée respectivement pour les WT et les SOD1).

Le fond génétique des souris est un paramètre important pour l'acquisition de ces réflexes neurologiques (Le Roy *et al.*, 1998). Cependant pour trouver des différences dans l'acquisition d'une des réponses réflexes étudiées ici, les différences génétiques doivent être importantes puisqu'il faut comparer des lignées distinctes (Le Roy *et al.*, 1998) ou des souris provenant de croisements de ces lignées entraînant au moins 50% de variation sur le plan génétique (Dierssen *et al.*, 2002). Les souris SOD1-G85R ont un fond génétique équivalent à plus de 99,8% aux souris sauvages de la lignée C57Bl 6/J utilisées comme contrôles (WT), puisqu'à partir des hybrides de la première génération exprimant les gènes SOD1-G85R, huit backcross successifs ont été réalisés avec des souris de la souche C57Bl 6/J (voir § matériel et méthodes). Il semble donc que comme pour la différence de taille des portées, le fond génétique ne soit pas à l'origine des différences observées.

L'analyse comportementale suggère donc que la maturation du système sensori-moteur des souris SOD1 est perturbée par la mutation SOD1-G85R qui entraîne un retard de maturation pour les réflexes moteurs (retournement, placement et agrippement), lequel pourrait provenir principalement d'un défaut de maturation des réseaux lombaires de la moelle épinière.

CHAPITRE II
ACTIVATION DES RESEAUX LOMBO-SACRES DES SOURICEAUX
EN PREMIERE SEMAINE POSTNATALE

1 - INTRODUCTION.

Lors de la période postnatale, les rongeurs (rats et souris) passent d'un mode de déplacement par reptation à une véritable locomotion, le ventre complètement décollé du sol (Serradj et Jamon, 2007; Vinay *et al.*, 2002). Une locomotion spontanée, bien qu'encore immature, s'observe chez le rat à partir de P11-P12 (Westerga et Gramsbergen, 1990). En revanche, les souriceaux sont capables de supporter leur poids et commencent à marcher spontanément à partir de P9 (Jiang *et al.*, 1999a; Serradj et Jamon, 2007; Whelan, 2003). Les contraintes posturales sont le facteur limitant pour une locomotion spontanée des animaux en première semaine post-natale (Vinay *et al.*, 2002), et l'apparition d'une véritable locomotion est liée à la maturation graduelle du contrôle postural (Brocard *et al.*, 1999; Vinay *et al.*, 2002; Vinay *et al.*, 2000b). En effet, il est possible d'induire expérimentalement une locomotion *in vivo* en première semaine postnatale, par exemple lorsque les jeunes souriceaux sont suspendus en l'air et ainsi placés dans des conditions de contrainte gravitaire réduite (McEwen *et al.*, 1997; Serradj et Jamon, 2007).

Chez les rongeurs et de façon plus générale chez les mammifères, la locomotion est sous le contrôle de réseaux de neurones qui forment les centres générateurs de rythme (CPGs pour *central pattern generator*) situés dans la moelle épinière. L'activité motrice peut être déclenchée par certaines voies provenant du tronc cérébral (par exemple la région mésencéphalique locomotrice) qui contactent et activent les CPGs spinaux (pour revue Jordan *et al.*, 2008). Les données obtenues sur les préparations *in vitro* de moelle épinière de rongeurs (rat et souris) montrent qu'il est possible de déclencher des épisodes d'activité rythmique dès la première semaine post-natale en appliquant des substances pharmacologiques ou des stimulations électriques (pour revue Jordan *et al.*, 2008; Kiehn *et al.*, 2008). En de rares occasions ces épisodes peuvent être observés de façon spontanée

(Bonnot et Morin, 1998). Ces données mettent en évidence que les réseaux et les CPGs spinaux sont déjà fonctionnels dès la naissance et que activés par des moyens pharmacologiques ils peuvent générer des rythmes moteurs comparables à l'activité locomotrice *in vivo* des adultes.

Sur la préparation *in vitro* de moelle épinière isolée de souris nouveaux-nés, ces rythmes moteurs se présentent sous la forme de bouffées rythmiques de potentiels d'action qui sont enregistrées aux sorties motrices des réseaux *i.e.* au niveau des racines ventrales lombaires pour les membres postérieurs (Bonnot *et al.*, 2002) et cervicales pour les membres antérieurs (Gordon *et al.*, 2008). Au niveau lombaire, ces activités rythmiques sont en alternance de phase entre les racines homonymes opposées (alternance droite/gauche) et entre les segments adjacents de nature fléchogène (comme le segment L2) et ceux de nature extensogène (comme le segment L5) (Kiehn, 2006). Les CPGs sont distribués sur tous les segments lombaires (Bonnot et Morin, 1998; Kremer et Lev-Tov, 1997) avec un gradient rostro-caudal de rythmogénicité (Bertrand et Cazalets, 2002; Cazalets *et al.*, 1995) qui pourrait s'expliquer par une plus forte expression des récepteurs à la sérotonine dans les segments les plus rostraux (pour revue Kiehn, 2006).

Grâce à la manipulation génétique les différents constituant des CPGs et des réseaux commencent à être décortiqués (pour revue Brownstone et Wilson, 2008; Kiehn *et al.*, 2008). Il est maintenant possible chez la souris de visualiser sur les préparations *in vitro* des populations spécifiques d'interneurones et ainsi de caractériser leurs propriétés pendant des comportements locomoteurs (Hinckley *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). Ces travaux montrent que certains groupes d'interneurones ont des propriétés autorythmiques et seraient les cellules des CPGs génératrices de rythme alors que d'autres groupes d'interneurones distribuent et coordonnent l'activité motrice entre les différents segments de moelle (Tazerart *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2007). Enfin, longtemps considérés

comme des simples relais passifs de l'activité des réseaux vers les muscles (la voie finale commune), il semblerait que les motoneurones fassent aussi partie intégrante des réseaux locomoteurs. En effet les motoneurones spinaux sont capables de moduler leur excitabilité et leur activité en fonction du type d'activité locomotrice (Brownstone, 2006; Heckman *et al.*, 2008a; Hyngstrom *et al.*, 2007).

Dans cette partie, nous avons comparé l'activité des réseaux de la moelle lombaire des souris SOD1 et des souris WT. Pour cela nous avons tiré profit de la préparation *in vitro* de moelle épinière-tronc cérébral isolée de souris nouveaux-né et du fait que dès la première semaine post-natale, des épisodes d'activité motrice peuvent être induits expérimentalement par des applications combinées de substances neuroactives (Whelan, 2003).

Pour déceler d'éventuelles modifications dans le fonctionnement des réseaux moteurs lombaires nous avons, dans un premier temps, enregistré « en passant » au niveau des sorties motrices l'activité spontanée de ces réseaux. L'activité spontanée représente un index du degré de maturation des réseaux et des motoneurones. En effet, il a été montré chez le rat que l'activité spontanée diminue graduellement avec l'âge pendant la première semaine post-natale (parallèlement à une baisse d'excitabilité des motoneurones spinaux) (Hanson et Landmesser, 2003; Vinay *et al.*, 2002; Vinay *et al.*, 2000b). Ensuite dans le but d'activer ces réseaux nous avons appliqué des substances neuro-actives (NMA et 5-HT) et comparé les réponses entre les deux lignées. Au cours de ces expériences, nous avons aussi étudié le fonctionnement des réseaux de la moelle sacrée dont la majorité des motoneurones innerve la musculature de la queue (Lev-Tov et Delvolve, 2000).

2 - RESULTATS

a) Activité spontanée des réseaux lombaires.

Dans les deux préparations, une activité motrice spontanée irrégulière est enregistrée au niveau des racines ventrales lombaires L3 et L5 sur cinq préparations SOD1 et six préparations WT entre P3-P6. Les racines lombaires présentent une faible activité composée de potentiels d'action (PA) spontanés, avec de temps en temps des bouffées de PA (Fig. 7A).

Le nombre moyen de PA par tranche de 10 minutes est de 181 ± 44 (n=10 racines) et de 169 ± 43 (n=11) pour les souris WT et SOD1 respectivement (P=0,84 ; Fig. 7B1).

L'intervalle inter événement (IE) est similaire entre les deux lignées ($6,01 \pm 1,66$ s pour les WT et $6,17 \pm 1,40$ s pour les SOD1 ; P=0,82 ; Fig. 7B2).

b) Effets des applications de N-méthyl-DL-aspartate et de sérotonine.

o *Au niveau des segments lombaires*

L'activité des réseaux lombaires pendant des applications de N-méthyl-DL-aspartate (NMA) et de sérotonine (5-HT) est enregistrée au niveau des racines ventrales lombaires à partir de neuf préparations de souris WT et onze préparations de souris SOD1. Les proportions de racines lombaires dont l'activité augmente pendant l'application de NMA et de 5-HT sont significativement différentes entre les deux lignées (P=0,013 **, test exact de Fischer). Pour les préparations WT, le cocktail suivant NMA (10 μ M) et 5-HT (5 μ M) induit des activités rythmiques réversibles enregistrées sur la quasi totalité (15 sur 16 racines) des racines lombaires avec des épisodes d'activité alternée entre racines lombaires opposées (Fig. 8A).

Pour les préparations de souris SOD1, les mêmes applications n'entraînent aucune augmentation d'activité pour 12 des 20 racines lombaires enregistrées (Fig. 8B). Sur les huit autres racines de souris SOD1, seules des décharges en bouffées transitoires (6 / 20) ou une activité tonique soutenue (2 / 20) sont enregistrées (Fig. 8C). Sur l'exemple de la figure 8D montrant des enregistrements d'une préparation SOD1, la concentration de NMA est augmentée à 20 μ M et des décharges irrégulières en bouffées de potentiel d'action sont alors enregistrées dans les racines lombaires opposées. Ces bouffées irrégulières sont aussi obtenues lorsque la concentration de 5-HT est augmentée jusqu'à 20 μ M. Le fait d'augmenter les concentrations des substances neuro-actives (soit le NMA ou la 5-HT, soit les deux) permet d'enregistrer au niveau de toutes les racines lombaires des préparations SOD1 une activité de type tonique ou en bouffées irrégulières pendant toute la durée des applications.

Pour les préparations SOD1, si au cocktail NMA (ou NMDA) / 5-HT, nous associons la dopamine (DA, 30-75 μ M), il est alors possible d'enregistrer des activités rythmique alternées entre racines lombaires dans les préparations de souris SOD1 (n=2 préparations sur 6) (Fig. 9A1 et 9A2). Contrairement aux préparations WT, la DA est nécessaire pour déclencher des décharges rythmiques alternées au niveau lombaire des souris SOD1. En effet sur ces préparations le NMDA combiné à la 5-HT ne suffit pas à induire de telles activités rythmiques alternées (Fig. 9A3).

Cependant, le résultat principal de cette partie est l'absence au niveau lombaire d'alternance entre segments opposés (ou adjacents) chez les préparations de souris SOD1 lors d'applications de NMA et de 5-HT.

○ *Au niveau des segments sacrés*

Contrairement aux observations réalisées au niveau lombaire, les activités rythmiques enregistrées sur les racines des segments sacrés (S1-S3) lors des applications de NMA et 5-HT sont comparables entre les préparations WT et SOD1.

Dans toutes les racines (n=12 pour les WT et n=16 pour les SOD1) des activités rythmiques alternées entre segments opposés sont enregistrées lors des applications de NMA 10 μ M et de 5-HT 5 μ M (Fig. 10).

Les résultats sur l'activité spontanée et des effets des applications de NMA et de 5-HT montrant la difficulté d'activer les réseaux lombaires chez les souris SOD1 sont publiés avec les données de l'analyse comportementale dans la revue European Journal of Neuroscience (Voir annexe I).

c) Rôle de la composante NMDA dans la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1.

L'activité spontanée est enregistrée à partir des racines lombaires L3 et L5 dans un milieu de perfusion sans magnésium (Mg²⁺). Dans cette condition expérimentale, une forte activité en bouffées de PA irrégulière en durée et en fréquence est observée pour les deux souches et s'explique par la levée du bloc magnésium des récepteurs NMDA (Fig.11A et 11B). Le nombre moyen de PA est significativement différent entre les deux lignées (P=0,018* ; Fig. 11C). Il est de 4886 \pm 1972 pour les racines lombaires (n=13) des souris SOD1 et de 6564 \pm 1392 pour les souris WT (n=13). Les fréquences moyennes sont de l'ordre de 27 Hz et de 36 Hz respectivement pour les souches SOD1 et WT.

L'intervalle inter-événement moyen (IE) est significativement différent entre les deux lignées (IE=43,2 ± 5,3 ms pour les SOD1 et IE=28,3 ± 1,8 ms pour les WT ; P=0,007** ; Fig. 11D).

Le NMA appliqué à 30 µM (WT, n=8 et SOD1, n=7) augmente l'activité des réseaux spinaux lombaires enregistrée sur les racines ventrales (L2 à L6). L'augmentation s'observe à la fois pour les préparations WT et SOD1 (Fig. 12A) mais dans des proportions différentes entre les deux lignées (16 racines sur 21 pour les WT et 6 racines sur 17 pour les SOD1 ; P=0,021 *, test exact de Fischer).

De plus, la majorité des racines « activées » chez les WT présentent des décharges en bouffées rythmiques (10/16) qui peuvent être alternées, alors que les 6 racines « activées » chez les SOD1 le sont de manière tonique avec quelques bouffées de faible amplitude.

Dans l'exemple de la figure 12, une activité alternée rapide entre les racines adjacentes ipsilatérales L3 et L5 de la préparation WT est enregistrée pendant une application de NMA à 30 µM (Fig. 12B1). Pour la préparation SOD1 enregistrée simultanément, quelques bouffées de faible amplitude sont enregistrées au début de l'application (Fig. 12B1).

Ensuite l'activité tonique s'installe dans la préparation SOD1 alors que les rythmes alternés sont toujours présents pour la préparation WT (Fig. 12B2).

Comme pour les applications de NMA et de 5HT une telle dichotomie entre WT et SOD1 s'observe seulement au niveau des segments lombaires. Les enregistrements des racines sacrées pendant les applications de NMA (30µM) montrent des activités rythmiques qui peuvent être alternées entre segments opposés dans les deux types de préparation (non illustré).

3 - DISCUSSION

Concernant l'activité spontanée enregistrée sur les racines lombaires des souris WT et SOD1-G85R, nos données sont comparables aux études antérieures (Bonnot *et al.*, 1998; Li et Burke, 2001; Whelan *et al.*, 2000). Pour les souris WT, les applications de NMA et de 5-HT induisent des activités motrices alternées au niveau de la moelle lombaire comme décrit précédemment chez la souris (Kullander *et al.*, 2003; Whelan *et al.*, 2000). Lors des mêmes applications, l'absence d'activité rythmique au niveau lombaire des préparations SOD1-G85R suggère un problème dans l'activation sérotoninergique et/ou glutamatergique et/ou des différences dans les propriétés endogènes des éléments constitutifs des réseaux (interneurones et motoneurones). Nos résultats appuient la possibilité que la composante NMDA contribue à la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1. La levée du bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA entraîne une augmentation de l'activité enregistrée spontanément sur les racines lombaires des préparations WT et SOD1, mais l'activité spontanée des segments lombaires est alors plus faible dans les préparations SOD1 par rapport aux préparations WT. De plus, les applications de NMA sont peu efficaces chez les préparations SOD1 contrairement aux préparations WT, aucune activité rythmique n'est déclenchée et un faible nombre de racines lombaires présente une augmentation de l'activité. Ces données suggèrent que le nombre de récepteurs NMDA sur les neurones et/ou les motoneurones des segments lombaires SOD1 est plus faible et/ou que ces récepteurs ne sont pas fonctionnels. Cependant, les activités rythmiques alternées enregistrées au niveau lombaire lorsque la dopamine est ajoutée au cocktail NMA / 5-HT suggèrent que la connectivité des réseaux lombaires est préservée dans les préparations SOD1.

Les réseaux sacrés (S1-S3) ont des capacités rythmiques utilisées lors des mouvements de la queue et peuvent être activés *in vitro* par des applications de NMA et de 5-HT (Lev-Tov

et Delvolve, 2000). Il est important de souligner dans le cadre de la maladie que l'absence d'alternance lors des applications de NMA et de 5-HT concerne seulement le niveau lombaire des souris SOD1. Les segments lombaires commandent l'activité motrice des membres postérieurs qui sont dans ce modèle animal les premiers à montrer des signes de paralysie à l'âge adulte. Au contraire, nous avons observé que les mouvements de la queue, dont l'activité motrice est commandée par des pools moteurs des segments sacrés, ne sont pas affectés dans ce modèle animal même lorsque la paralysie des membres postérieurs est complète, suggérant que ces motoneurones sont épargnés par la maladie. Or, dans ce travail, les co-applications de NMA et de 5-HT induisent, sur les racines sacrées des préparations SOD1 et WT, des activités rythmiques alternées comparables.

Nous montrons dans cette partie la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1 lors de stimulations pharmacologiques avec le NMA et la 5-HT. Cette difficulté semble être principalement liée à la composante glutamatergique. Cette anomalie dans le fonctionnement des réseaux lombaires est compatible avec les retards d'expression de certains réflexes moteurs que nous avons décrit avec l'approche comportementale. En effet ces retards suggéraient un défaut de maturation des réseaux lombaires de la moelle épinière. Enfin le fait que les réseaux sacrés ne présentent pas cette anomalie permet de soutenir l'idée que les anomalies observées au niveau lombaire sont bien spécifiques de la maladie.

CHAPITRE III
ACTIVITE DES RESEAUX ET DES MOTONEURONES LOMBAIRES
DES SOURICEAUX WT ET SOD1 LORS DE L'INHIBITION DES
TRANSPORTEURS DU GLUTAMATE.

1 - INTRODUCTION

Dans les mécanismes pathologiques de la SLA, une mauvaise clairance du glutamate de la fente synaptique pourrait expliquer une part de la toxicité du glutamate. Il a été montré sur des synaptosomes obtenus à partir de tissus de patients humains de SLA une diminution de la clairance du glutamate dans les zones du système nerveux central concernées par la maladie (Rothstein *et al.*, 1992). De plus à partir de tissus de patients SLA, les marquages immuno-histochimiques des transporteurs ont montré pour la moelle épinière et le cortex une diminution importante du transporteur glial GLT1 (70-90%) mais pas de l'autre transporteur glial GLAST (Rothstein *et al.*, 1995). La diminution de 20% du transporteur neuronal EAAC1 était corrélée avec la perte motoneuronale (Rothstein *et al.*, 1995). Cette perte de GLT1 pourrait provenir de défauts d'édition de son ARN codant retrouvés chez des patients SLAs spécifiquement dans les zones affectées par la pathologie (Lin *et al.*, 1998). Une mutation du gène codant pour GLT1, responsable d'un ralentissement de la recapture de glutamate, a été détectée dans un cas de SLA sporadique (Trotti *et al.*, 2001). Ces données sont en faveur d'un rôle du transporteur glial GLT1 dans la physiopathologie de la SLA.

Dans les modèles animaux comme les souris SOD1-G93A, les protéines SOD1 mutantes inactivent de façon sélective le transporteur glial GLT1 (Trotti *et al.*, 1999). Dans le modèle de rat transgénique G93A, le stade terminal de la maladie est caractérisé par une perte de 90% de GLT1 dans la corne ventrale de la moelle épinière (Howland *et al.*, 2002). De même, chez les souris G85R au stade terminal, la quantification de GLT1 effectuée à partir de broyats de moelle épinière montre une perte de 50% de ce transporteur (Bruijn *et al.*, 1997).

Dans cette partie nous avons étudié les effets de l'accumulation de glutamate lors d'application de DL-TBOA, sur l'activité des réseaux lombaires. Le DL-TBOA est un inhibiteur spécifique de la recapture du glutamate et bloque les transporteurs gliaux GLT1 (EAAT2) et GLAST (EAAT1) (Shimamoto *et al.*, 1998) ainsi que le transporteur neuronal EAAC1 (EAAT3) qui sont les trois types de transporteurs présents au niveau de la moelle épinière (Danbolt, 2001). Les enregistrements ont été obtenus à partir des racines ventrales lombaires (L3 à L6) et sacrés (S1 à S4) pendant les applications de TBOA (20 μ M) sur n=11 préparations WT et n=13 préparations SOD1. Lors de certaines de ces expériences avec le TBOA, l'activité intracellulaire des motoneurones du segment L5 a aussi été enregistrée de façon concomitante aux enregistrements extracellulaires de racines ventrales et dorsales.

2 - RESULTATS

a) Activité rythmique enregistrée sur les racines ventrales lors de l'accumulation de glutamate pendant les applications de TBOA.

Pour les deux types de préparation WT et SOD1, le TBOA appliqué à la concentration de 20 μ M induit des décharges de longue durée et de grande amplitude qui sont synchrones sur toutes les racines ventrales enregistrées. Aucune différence n'a été observée entre WT et SOD1 lors des enregistrements extracellulaires. La figure 13 illustre pour chaque lignée un exemple de réponse pendant une application de TBOA à 20 μ M. Pour les deux lignées, la fréquence d'apparition de ces larges bouffées (environ toutes les 2 minutes) et leur durée (environ 25s) sont comparables. Dans n=5 expériences nous avons enregistré simultanément les racines dorsales et ventrales L5 ainsi qu'un motoneurone du même segment pendant l'application de TBOA à 20 μ M (Fig. 14). Dans n=3 cas, le début des larges dépolarisations intracellulaires est synchrone avec l'apparition de bouffées rythmiques enregistrées sur la racine dorsale. Ces bouffées précèdent d'environ une seconde les bouffées de grande amplitude observées sur la racine ventrale L5.

b) Enregistrements intracellulaires de l'activité des motoneurones pendant l'application de TBOA

Avant l'application de TBOA, des potentiels synaptiques avec des dépolarisations apparaissent spontanément et sont enregistrés à la fois dans les motoneurones WT (n=15) et SOD1 (n=12) de façon simultanée avec l'activité motrice récupérée sur la racine ventrale correspondante (Fig. 15A et 15B). L'application de TBOA (20 μ M) augmente la fréquence et l'amplitude des fluctuations synaptiques dans tous les motoneurones WT (n=15) et SOD1 (n=12) enregistrés. Des dépolarisations lentes de large amplitude entraînant des bouffées de potentiels d'action sont enregistrées 10 à 15 minutes après le début de

l'application de TBOA dans tous les motoneurones WT et SOD1 de manière concomitante avec les décharges des racines ventrales (Fig. 15C et 15D).

Pour les motoneurones des deux lignées, on peut observer que l'amplitude du potentiel d'action (PA) diminue pendant les bouffées avec l'augmentation de la fréquence instantanée de décharge (Fig. 16A), ce qui est probablement dû à l'inactivation des conductances sodiques voltage-dépendantes qui sous tendent le PA. Mais pour les motoneurones SOD1, un blocage total du PA est observé lors des bouffées de grande amplitude où la composante somato-dendritique (SD) disparaît et la composante IS est présente (initial segment) (Fig. 15D, 16B).

Afin de déterminer si les dépolarisations induites par le TBOA sont dépendant du potentiel d'action sodique, les effets de la tétrodotoxine (TTX) ont été enregistrés dans n=4 motoneurones WT et n=5 motoneurones SOD1 pendant les applications de TBOA (20 μ M). Après cinq à dix minutes de perfusion, la TTX (1 μ M) bloque toute l'activité induite par le TBOA dans les motoneurones WT et SOD1 et un retour progressif de ces activités est enregistré après deux à trois heures de rinçage (perfusion de TBOA 20 μ M seul). La figure 17 illustre un exemple de blocage par la TTX (1 μ M) dans un motoneurone WT et sur les racines ventrales L5 et L6 pendant une application de TBOA (20 μ M). Le même effet est obtenu dans les préparations de souris SOD1.

c) La genèse des dépolarisations de large amplitude induites par le TBOA est différente entre les motoneurones WT et SOD1

Pour déterminer la contribution des différents types de récepteurs au glutamate dans la genèse des bouffées de large amplitude enregistrées lors des applications de TBOA (20 μ M), nous avons tout d'abord ajouté du D-APV, un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA. À la concentration de 80 μ M, le D-APV bloque complètement les lentes

bouffées de large amplitude dans les motoneurones WT (n= 3 sur 3) et l'activité induite par le TBOA disparaît sur les racines ventrales de façon concomitante (Fig.18C).

Pour les motoneurones SOD1, le D-APV appliqué à la même concentration empêche les motoneurones d'émettre des PA et bien qu'aucune activité ne soit enregistrée sur la racine ventrale des oscillations de faible amplitude persistent dans ces conditions (n= 4 sur 4 ; Fig. 18D), contrairement aux motoneurones des souris WT. Afin d'éliminer la possibilité d'un effet compétitif entre le D-APV et le glutamate endogène accumulé pendant l'application de TBOA, nous avons vérifié que ces oscillations persistaient en présence de d'un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, le MK-801 appliqué à 50 μ M (n=3). Pour les motoneurones SOD1, ces oscillations membranaires persistantes sont totalement bloquées si l'on ajoute au D-APV (ou au MK-801) du CNQX (10 μ M), un antagoniste des récepteurs AMPA/kainate (Fig. 19).

Pour les motoneurones WT, les récepteurs AMPA participent aussi à la genèse des bouffées induites par le TBOA. Ces bouffées sont très fortement réduites lors d'applications de CNQX (10 μ M) mais ne disparaissent pas totalement. De faibles dépolarisations sont toujours enregistrées pendant ces applications (n=3).

3 - DISCUSSION.

Appliqué à 20 μM , le DL-TBOA bloque partiellement les systèmes de recapture du glutamate (Danbolt, 2001) et induit au niveau de la moelle épinière de souris nouveaux-nés une accumulation de glutamate dans le milieu extra-cellulaire qui engendre une synchronisation des décharges motrices comparable entre les deux types de préparation.

Il a été suggéré, au niveau de l'hippocampe lors d'application de TBOA à 20 μM (Demarque *et al.*, 2004), une augmentation cyclique des niveaux endogènes de glutamate par le phénomène d'inversion des transporteurs (Danbolt, 2001). Dans la moelle épinière, un tel mécanisme pour expliquer la genèse des bouffées rythmiques peut être exclu puisque des concentrations saturantes de TBOA (100 μM) provoquent ces activités rythmiques et synchrones dans les racines ventrales (non illustrées). A de telles concentrations le blocage est complet et le phénomène d'inversion est impossible (Danbolt, 2001).

Dans ce travail les décharges rythmiques sont synchronisées sur différents segments de moelle et ont une période (2 minutes) comparable à celles des activités rythmiques induites par le TBOA dans le cortex (Demarque *et al.*, 2004), l'hippocampe (Cattani *et al.*, 2007) ou dans le noyau hypoglosse du tronc cérébral (Sharifullina et Nistri, 2006), qui sont des structures à la connectivité très différente. Ceci suggère que le câblage spécifique entre les neurones n'est pas important pour la régulation de cette activité rythmique. Les enregistrements de bouffées sur les racines dorsales synchrones avec les dépolarisations intracellulaires suggèrent que l'apparition des bouffées de large amplitude observées sur plusieurs segments de moelle et leur synchronisation peuvent résulter de la dépolarisation massive des afférences primaires lors de l'accumulation de glutamate endogène pendant les applications de TBOA. En effet, en période postnatale les afférences primaires des racines

dorsales projettent sur plusieurs segments adjacents (Cajal, 1952; Mirmics et Koerber, 1997).

Nos résultats suggèrent également des réponses plus importantes lors de l'activation des récepteurs AMPA dans les motoneurons SOD1 qui pourraient être la conséquence d'un ratio différent entre récepteurs AMPA et NMDA ou être dues à une plus grande perméabilité des canaux associés aux récepteurs AMPA. Le fait que la composante SD des PA soit moins souvent déclenchée dans les motoneurons SOD1 suggère que l'accumulation de glutamate dépolarise fortement les dendrites des motoneurons SOD1. Les antagonistes des récepteurs NMDA (MK-801 et D-APV) bloquent complètement pour les motoneurons WT les dépolarisations rythmiques induites par les applications de TBOA (Fig. 18). Ce blocage des activités rythmiques via les antagonistes NMDA a aussi été retrouvé dans d'autres régions du système nerveux (Angulo *et al.*, 2004; Cattani *et al.*, 2007; Demarque *et al.*, 2004; Sharifullina et Nistri, 2006), indiquant que les récepteurs NMDA jouent un rôle déterminant dans l'apparition de ces dépolarisations.

Cependant, des dépolarisations membranaires rythmiques persistent au niveau des motoneurons SOD1 en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA. Le fait que des dépolarisations persistent appuie la possibilité d'un déséquilibre du ratio entre récepteurs AMPA et NMDA avec un plus faible nombre de récepteurs NMDA pour les motoneurons SOD1, comme le suggèrent aussi l'activité spontanée enregistrée lors de la levée du bloc Mg^{2+} et les enregistrements lors des applications de NMA (Chap. II). Cependant, ces dépolarisations persistantes sont bloquées par l'addition de CNQX, ce qui suggère aussi que la composante AMPA est plus importante au niveau des motoneurons SOD1 avec, soit un plus grand nombre de récepteurs, soit une plus grande perméabilité des canaux associés aux récepteurs AMPA. Cependant, ces hypothèses restent à vérifier. Dans les motoneurons SOD1-G93A mis en culture à partir du stade embryonnaire, les canaux associés aux

récepteurs AMPA sont presque trois fois plus perméables au Na^+ et au K^+ que les motoneurones avec la SOD1 humaine non mutée, mais ne montrent pas de différence pour la perméabilité calcique (Pieri *et al.*, 2003b). Au niveau de la moelle épinière, le taux de récepteurs NMDA diminue considérablement pendant la première semaine postnatale (Fukaya *et al.*, 2005; Kalb *et al.*, 1992; Stegenga et Kalb, 2001). Ainsi, un rapport plus élevé AMPA/NMDA pour les motoneurones SOD1 implique soit une diminution plus rapide du nombre de récepteurs NMDA soit une augmentation de la densité de récepteurs AMPA. Des changements précoces des taux d'expression des récepteurs AMPA et NMDA n'ont pas été montrés dans les souris SOD1, bien qu'une étude récente montre à un stade pré-symptomatique une sur-expression de la sous-unité GluR1 et une diminution de la sous-unité GluR2 au niveau des récepteurs AMPA des motoneurones SOD1-G93A (Zhao *et al.*, 2008). La diminution de la sous-unité GluR2 est en faveur d'une plus grande perméabilité des canaux ioniques associés aux récepteurs AMPA (Sommer *et al.*, 1991).

CHAPITRE IV
PROPRIETES ELECTRIQUES DES MOTONEURONES WT ET SOD1
EN PERIODE POST-NATALE

1 - INTRODUCTION

Les résultats obtenus lors des applications de NMA et de 5-HT sur la préparation *in vitro* de moelle épinière / tronc cérébral isolée de souris en première semaine post-natale (P3-P6) montrent la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1. Ces données suggèrent une hypoexcitabilité de ces réseaux qui pourrait résulter de changements des propriétés des neurones spinaux et/ou des motoneurones. Par une approche électrophysiologique intracellulaire sur la préparation *in vitro*, nous avons donc étudié et comparé les propriétés électriques de motoneurones WT et SOD1 pendant la première semaine postnatale.

Actuellement, l'utilisation de la souris pour étudier le développement de la locomotion est plus courante du fait de son fort potentiel de manipulation génétique (pour revue Brownstone et Wilson, 2008). Paradoxalement, à ce jour aucune étude n'a encore caractérisé dans cette espèce l'évolution des principales propriétés électriques des motoneurones au cours de la période postnatale.

La majorité de nos connaissances sur l'évolution de ces propriétés vient des études réalisées chez le rat sur des populations de motoneurones lombaires et du tronc cérébral (Carrascal *et al.*, 2005; Greer et Funk, 2005; Viana *et al.*, 1994; Vinay *et al.*, 2000b; Walton et Navarrete, 1991; Ziskind-Conhaim, 1988).

Lors de la période postnatale s'opèrent d'importantes modifications des propriétés électriques des motoneurones spinaux à la base de changements d'excitabilité de ces cellules (Carrascal *et al.*, 2005; Spitzer *et al.*, 2000; Vinay *et al.*, 2000b). Il a été décrit que la résistance d'entrée des motoneurones diminue pendant la période postnatale (Fulton et Walton, 1986; Seebach et Mendell, 1996). Cette diminution semble être corrélée avec une augmentation de la taille des motoneurones observée pendant la même période chez le rat

(Westerga et Gramsbergen, 1992). Une augmentation de la taille des motoneurones pendant la période postnatale est aussi observée chez la souris (Li *et al.*, 2005) et le chat (Simon *et al.*, 1996; Ulfhake et Cullheim, 1988). Une diminution de la résistivité membranaire liée à des changements de densité des canaux ioniques exprimés à la membrane pourrait aussi expliquer la diminution de la résistance d'entrée (Viana *et al.*, 1994). Parallèlement à la diminution de la résistance d'entrée, le courant de rhéobase augmente pendant la période postnatale, alors que le potentiel de repos membranaire reste constant (Carrascal *et al.*, 2005; Greer et Funk, 2005; Seebach et Mendell, 1996). D'autres changements concernent les conductances ioniques membranaires (pour revue Vinay *et al.*, 2000b). L'augmentation de la densité et de la cinétique d'activation des canaux sodiques et calciques ainsi que la maturation des canaux potassiques dépendants du voltage sont à la base des modifications des propriétés actives des motoneurones (Carrascal *et al.*, 2005; Greer et Funk, 2005; Seebach et Mendell, 1996; Viana *et al.*, 1994; Vinay *et al.*, 2000b). Ces modifications des propriétés actives entraînent une diminution de la durée des potentiels d'action et de l'AHP avec pour conséquence directe une augmentation de la fréquence de décharge des motoneurones pendant la période postnatale. Pour les motoneurones lombaires, la densité des canaux sodiques qui sous-tendent le potentiel d'action augmente pendant la période post-natale (Gao et Ziskind-Conhaim, 1998). Cette augmentation et le fait que la proportion de ces canaux, qui restent dans un état activable, soit plus grande avec l'âge explique aussi pour partie l'augmentation de la fréquence de décharge des motoneurones au cours de cette même période (Carlin *et al.*, 2008).

Des études réalisées à partir de cultures de moelles embryonnaires et néonatales ont montré des changements d'excitabilité des motoneurones SOD1 (Kuo *et al.*, 2004; Pieri *et al.*, 2003a). Ces motoneurones sont caractérisés par une augmentation de leur excitabilité intrinsèque avec une nette augmentation de leur gain (pente de la relation intensité-

fréquence de décharge). Il semblerait que cette hyperexcitabilité concerne particulièrement les motoneurones avec un grand diamètre somatique et soit liée aux conductances sodiques persistantes (Kuo *et al.*, 2005). Les modifications des propriétés électriques des motoneurones SOD1 issus de culture pourraient prendre place pendant la maturation des conductances membranaires au cours de la période postnatale bien qu'une hyperexcitabilité telle qu'elle est décrite dans les conditions de mise en culture semble difficilement compatible avec les résultats obtenus dans la première partie sur l'activité spontanée et la difficulté d'activer les réseaux lombaires des souris SOD1.

Sur la préparation *in vitro* de tronc-cérébral / moelle-épineuse isolée, nous avons pour les motoneurones WT et SOD1-G85R étudié les modes de décharges et caractérisé les propriétés passives et celles du potentiel d'action pendant la période postnatale. Nous avons aussi soumis les motoneurones à des protocoles de stimulation en rampe dans le but d'activer les conductances persistantes sodiques et calciques (Bennett *et al.*, 2001; Powers et Binder, 2003; Tazerart *et al.*, 2008).

Chez la souris les canaux calciques de type L sont pleinement matures au début de la deuxième semaine postnatale (P7) (Jiang *et al.*, 1999b), ce qui suggère que les propriétés électriques des motoneurones continuent d'évoluer après la fin de la première semaine postnatale. De plus, l'étude comportementale montre que les souris SOD1 présentent un délai dans l'acquisition de certains réflexes neurologiques impliquant la moelle lombaire, comme les réflexes de placement et d'agrippement des membres postérieurs. Les retards pour ces tests et pour d'autres tests moteurs comme le test de retournement sont transitoires et pleinement récupérés en 2nde semaine postnatale. De fait, nous avons poursuivi l'étude longitudinale des paramètres électriques des motoneurones en deuxième semaine postnatale (de P7 à P10). Quand ce travail a été entrepris, il n'y avait aucune donnée concernant les

propriétés électriques de motoneurones dans la préparation *in vitro* de moelle épinière entière.

En utilisant la préparation *in vitro* moelle épinière / tronc cérébral isolée de souris, 65 motoneurones WT et 48 motoneurones SOD1 du segment L5 ont été enregistrés entre P3 et P10. Pendant cette période de développement (de P3 à P10), nous avons tout d'abord pour les deux lignées étudié la maturation des propriétés électriques entre la première et la seconde semaine postnatale (entre P3-P6 et P7-P10). Puis nous avons comparé les propriétés électriques des motoneurones WT et SOD1 dans ces deux groupes d'âge ainsi définis.

2 - RESULTATS

a) Propriétés passives des motoneurones

Pour les motoneurones (MNs) des deux lignées, le potentiel de repos reste stable au cours des deux premières semaines postnatales malgré une hyperpolarisation de 1,8mV en moyenne pour les MNs WT entre la première et la deuxième semaine postnatale (tables 2 et 3 respectivement pour les MNs WT et SOD1). Lorsqu'on compare le potentiel de membrane au repos des MNs des deux lignées, aucune différence n'est observée (tables 4 et 5 respectivement pour la première et la seconde semaine postnatale).

Contrairement au potentiel de repos, l'évolution entre la première et la seconde semaine postnatale de la résistance d'entrée (R_{in}) est différente entre les MNs WT et SOD1. Alors que pour les MNs WT, la R_{in} diminue légèrement entre les deux groupes d'âge (table 2), elle chute de façon significative pour les MNs SOD1 de 21,9 M Ω pour les P3-P6 à 12,3 M Ω pour les P7-P10 (table 3). Afin de donner un aperçu longitudinal de l'évolution de la R_{in} , les données sont présentées dans la figure 20 en quatre groupes de taille comparable en

fonction de l'âge: P3-P5, P6-7, P8 et P9-10. Cette figure montre clairement que la diminution pour les MNs SOD1 est continue entre P3 et P10 avec une chute bien nette de la R_{in} à partir de P8. En effet, à partir de ce jour postnatal, les R_{in} des MNs SOD1 enregistrés ne dépassent plus $18M\Omega$.

De cette évolution différente, il résulte pour les MNs SOD1 à P7-P10 une résistance d'entrée significativement plus faible que celle des MNs WT (voir Fig. 21A ; table 5). En seconde semaine postnatale, la valeur moyenne des résistances d'entrée des MNs SOD1 (n=28) est 24% plus faible que celle des MNs WT (n=38) (table 5). En première semaine postnatale, la différence entre les résistances d'entrée des MNs des deux lignées n'est pas significative (table 4).

b) Paramètres biophysiques membranaires des motoneurones à P7-P10

Pour n=12 MNs WT et n=9 MNs SOD1 du groupe d'âge P7-P10, la constante de temps membranaire (τ_m) a été mesurée sur un créneau hyperpolarisant de 0,5nA d'intensité (Fig. 22A) et la capacité membranaire (C_m) calculée à partir de la relation $C_m = \tau_m / R_{in}$. On retrouve pour cette population de MNs la différence de R_{in} observée avec l'ensemble de l'échantillon apparié en âge (Fig. 22C). Cependant, la constante de temps membranaire n'est pas significativement différente entre les deux lignées (Fig. 22B ; table 5). Il en résulte que la capacité membranaire est significativement plus grande pour les MNs SOD1 (Fig. 22D ; table 5).

c) Propriétés des potentiels d'action antidromique et orthodromique

o *PA antidromique.*

Pour les MNs des deux lignées, la latence d'apparition du PA antidromique diminue de façon significative entre la première et la seconde semaine postnatale (tables 2 et 3).

Concernant le décours temporel du PA antidromique, le résultat le plus significatif concerne la diminution avec l'âge de la durée du PA (1/2 durée) pour les MNs WT et SOD1 (Fig. 23A et 23D). Pour les MNs des deux lignées, la diminution de la durée du PA est en grande partie expliquée par une repolarisation plus rapide (Fig. 23C-F) alors que le temps de montée (Fig. 23B-E) reste identique entre les deux groupes d'âge (tables 2 et 3 pour les valeurs).

La « vitesse de repolarisation maximum » est différente entre les deux groupes d'âge de façon hautement significative (tables 2 et 3). Il faut noter pour les deux lignées que le paramètre «vitesse de montée maximum» est lui aussi significativement différent entre les deux groupes d'âge (tables 2 et 3).

Le nombre de MNs pour lequel le PA antidromique « complet » (avec toutes ses composantes) est analysé est plus faible que le nombre total de MNs enregistrés. Dans n=4 MNs (WT+SOD1) la composante somato-dendritique (SD) est absente suite à la stimulation de la racine ventrale. Pour d'autres MNs (n=14), le PA antidromique est déclenché après stimulation de la racine ventrale seulement lorsqu'un courant dépolarisant est injecté dans le motoneurone (réduisant donc l'amplitude du PA). Pour n=6 MNs, le PA axonique (M spike) est visible après la stimulation de la racine ventrale et la nature motoneuronale de la cellule enregistrée est vérifiée par l'enregistrement de PA orthodromique sur la racine ventrale L5.

Pour les caractéristiques du PA antidromique, l'évolution est comparable entre les deux lignées. De plus, pour ces paramètres, aucune différence significative entre les MNs WT et les MNs SOD1 n'a été mise en évidence ni en première ni en seconde semaine postnatale (voir tables 4 et 5).

○ *PA orthodromique*

L'analyse du PA déclenché par l'injection intracellulaire de courant montre pour les MNs WT que le PA orthodromique est lui aussi significativement plus bref en seconde semaine postnatale avec une diminution significative du temps de repolarisation, alors que le temps de montée ne varie pas avec l'âge (table 2). La diminution de la durée du PA des MNs SOD1 n'est pas statistiquement significative, probablement due au faible effectif (table 3). Comme pour le PA antidromique, aucune différence significative entre les MNs WT et SOD1 n'a été mise en évidence ni en première ni en seconde semaine postnatale concernant les paramètres des PA orthodromiques (tables 4 et 5).

d) Caractéristiques de la post hyperpolarisation des potentiels d'action.

Les caractéristiques de l'AHP sont mesurées lors de l'injection d'un créneau de courant avec une intensité donnant un seul PA (courant de rhéobase). Pour les MNs des deux lignées, l'amplitude, la durée et le temps de repolarisation de l'AHP ne présentent pas de différence significative entre les deux premières semaines postnatales (tables 2 et 3). Cependant, on peut noter pour les MNs SOD1 une tendance non significative ($P=0,09$) à la diminution de la durée de l'AHP entre les deux groupes d'âge. Cette durée passe de 110 millisecondes en moyenne pour le groupe P3-P6 à 90 millisecondes pour les MNs P7-P10. Alors que pour les MNs WT la durée moyenne de l'AHP est de 82 millisecondes à P3-P6 et de 95 millisecondes à P7-P10. De plus, pour les MNs SOD1, le temps mis pour atteindre le maximum d'amplitude de l'AHP est plus important en première semaine postnatale par rapport à la seconde (table 3). Au contraire, ce paramètre est relativement stable entre les deux groupes d'âges pour les MNs WT (table 2).

De fait, pour le groupe P3-P6, l'AHP des MNs SOD1 est significativement plus longue (table 4) que celle des MNs WT. De plus, le décours temporel est différent. Pour les MNs

SOD1, le maximum d'amplitude est atteint significativement plus tard après le début de l'AHP (Fig 24 et table 4 pour les valeurs). Concernant les MNs du groupe P7-P10, aucune différence significative n'est observée pour les paramètres de l'AHP entre les MNs WT et SOD1 (table 5).

e) Propriétés actives des motoneurones mesurées lors d'injections de créneaux de courant dépolarisant.

Pour les MNs des deux lignées, le seuil de déclenchement du PA reste stable au cours des deux premières semaines postnatales alors que le courant de rhéobase augmente de façon significative entre les deux groupes d'âge (tables 2 et 3). Si l'on compare ces deux paramètres entre les MNs WT et SOD1, nous n'observons pas de différence significative pour aucun des deux groupes d'âge (table 4 et 5).

L'application de créneaux de courant dépolarisant d'intensité croissante a permis d'analyser les fréquences de décharge et de construire les courbes intensité-fréquence (IF) pour 42 MNs WT (n=15 à P3-P6 et n=27 à P7-P10) et 32 MNs SOD1 (n=15 à P3-P6 et n=17 à P7-P10). La proportion de cellules capables d'émettre des PA sur toute la durée du créneau (Fig. 25A3) est comparable pour les deux lignées et les deux groupes d'âge (autour de 85%).

Avec ce protocole (Fig. 25A) et dans nos conditions expérimentales, la relation entre la fréquence de décharge et l'intensité du courant injecté est toujours linéaire (Fig. 25B). Pour les MNs des deux lignées, le gain est identique entre la première et la seconde semaine postnatale alors que la fréquence de décharge maximale du motoneurone (F_{max}) augmente de façon significative avec l'âge des animaux (Fig. 25C et 25D ; table 2 et table 3 pour les valeurs). Aucune différence significative entre les MNs WT et SOD1 n'est observée pour

ces deux paramètres à P3-P6 (table 4). Au contraire, pour la période P7-P10, alors que la F_{\max} est comparable entre les MNs des deux lignées, les MNs SOD1 ont un gain significativement plus faible que les MNs WT (Fig. 21B ; table 5).

Des études précédentes réalisées sur des MNs issus de cultures embryonnaires et néonatales (Kuo *et al.*, 2004; Pieri *et al.*, 2003a), ont montré que la fréquence de décharge et la pente de la relation intensité - fréquence de décharge des MNs SOD1-G93A étaient supérieures à celles des MNs WT. Pour déterminer le gain et la fréquence de décharge des MNs, les auteurs de ces études n'ont considéré que la fréquence instantanée entre les deux premiers PA engendrés par des créneaux de courant dépolarisant d'intensité croissante. Nous avons réalisé les courbes intensité – fréquence de décharge avec cette méthode (Fig. 26A). Pour les MNs du groupe P7-P10, (n=25 MNs WT et n=17 MNs SOD1), la relation vérifie une courbe sigmoïde (Fig. 26B). La pente mesurée lors de l'accélération de la fréquence de décharge est comparée entre les deux lignées. La pente de cette relation est significativement plus faible pour les MNs SOD1 (Fig. 26C1) alors que la fréquence maximale de décharge (f_{\max}) est identique (Fig. 26C2). Les valeurs sont données dans la table 5. La figure 26D représente les relations moyennes dans chaque lignée avec un gain plus faible pour les MNs SOD1 et une fréquence maximale de décharge équivalente entre les deux lignées.

f) Propriétés actives des MNs mesurées lors d'injections de courants triangulaires (rampes) d'intensité variable

Dans cette série d'expériences, nous avons appliqué des rampes de courant (courants triangulaires) de différente intensité (pente: 0,21 – 1,47 nA/s; durée : 5,4 – 10,8 s) et comparé les réponses des MNs WT (n=19) et SOD1 (n=19). Les rampes de courant ont été appliquées sur des MNs de P3 à P10.

La distribution est la suivante :

P3-P6, n=12 MNs WT et n=10 MNs SOD1;

P7-P10, n=7 MNs WT et n=9 MNs SOD1.

○ *Types de décharge*

Pour les deux lignées, quatre patrons de décharge sont enregistrés (Fig. 27A-D).

Les protocoles de stimulation en rampe peuvent révéler une asymétrie entre les décharges enregistrées pendant les rampes de courant ascendantes et descendantes, qui sont elles symétriques. Les réponses de type 1 et 4 révèlent des phénomènes d'hystérésis, la fréquence de décharge étant différente en montée et en descente pour un courant donné (Fig. 27A et 27D). Le type 2 est linéaire car les fréquences de décharge se superposent à la montée et à la descente. Le type 3 (Fig. 27C) est aussi linéaire mais la décharge est plus longue lors de la phase descendante. Cette décharge soutenue (plateau) lors de la rampe descendante peut être le reflet de l'activation de conductances persistantes calciques (Bennett *et al.*, 2001; Powers et Binder, 2003).

Dans nos conditions expérimentales, la distribution des différents types de décharge est comparable entre les MNs WT et SOD1. Une hystérésis de type 1 est enregistrée dans n=8 WT et n=5 MNs SOD1, alors qu'une hystérésis de type 4 est enregistrée dans n=5 WT et n=4 MNs SOD1. Les types de décharges linéaires (2 et 3) sont enregistrés dans n=6 MNs WT (dont n=3 de type 3, avec une décharge soutenue à la descente) et n=10 MNs SOD1 (dont n=2 de type 3).

○ *Réponses des MNs en seconde semaine postnatale (P7-P10)*

A P7-P10, la répartition des types de décharge est équivalente entre MNs des deux lignées (n=7 WT et n=9 SOD1) et aucune différence significative n'est observée pour les

paramètres comparés. Le type 1 a été enregistré respectivement pour les motoneurones WT et SOD1 pour n=2 et n=1, le type 2 : n=1 et n=3, le type 3 : n=1 et n=2 et le type 4 : n=3 et n=3.

Lors d'injections de courant triangulaire et dans nos conditions expérimentales, le paramètre important pour l'activation des conductances persistantes est la vitesse de la rampe (pente). Les courants persistants sont préférentiellement activés pendant des rampes de vitesse lentes (Bennett *et al.*, 2001). Ici, les pentes des rampes appliquées (dépendant de la durée et de l'intensité du courant injecté) sont en moyenne équivalentes entre les deux lignées (WT=0,61 ± 0,11 nA.s⁻¹ et SOD1=0,63 ± 0,10 nA.s⁻¹ ; P=0,92). Cependant la gamme de vitesse utilisée est assez variable (de 0,22 à 1,22 nA.s⁻¹). Pour déceler d'éventuelles différences lorsque l'activation des conductances persistantes est favorisée, *i.e.* pour des rampes de vitesse lente, nous avons considéré pour chaque motoneurone les rampes réalisées avec une vitesse inférieure à 0,85 nA/s. Pour des rampes de vitesse lente (table 6), les MNs SOD1 déchargent significativement plus longtemps que les WT lors de la phase ascendante de la rampe (1358 ± 156 ms pour les WT ; 2076 ± 256 ms pour les SOD1). Alors que les vitesses des rampes appliquées sont identiques entre les MNs des deux lignées (table 6), les MNs SOD1 atteignent plus vite le seuil de déclenchement des PA et déchargent donc plus tôt. En effet l'intensité à laquelle le premier PA est déclenché ($I_{\text{début}}$) est significativement plus faible chez les SOD1 (table 6). L'intensité à laquelle le dernier PA est enregistré (I_{fin}) est aussi plus faible pour les MNs SOD1 mais la différence reste au dessus du seuil de significativité (P=0,07 ; table 6). La durée totale de décharge n'est pas différente entre les deux lignées même si les MNs SOD1 déchargent plus longtemps (une seconde supplémentaire) par rapport aux MNs WT, alors que les rampes injectées sont plus brèves de plus d'une seconde. Cette augmentation de la durée totale de

décharge s'observe pour les rampes montantes comme descendantes et peut être reliée au fait que les courants $I_{\text{début}}$ et I_{fin} sont plus faibles pour les MNs SOD1 (table 6).

Pour ces motoneurones soumis aux courants triangulaires, les potentiels de membrane au repos et les seuils de déclenchement du PA sont identiques entre les deux lignées et les résistances d'entrée des MNs SOD1 sont plus faibles que celles des MNs WT (bien que cette différence ne soit pas significative pour cet échantillon réduit de MNs). Le gain des MNs SOD1 et WT mesuré pendant les rampes montantes est équivalent (WT= $33,2 \pm 3,7$ Hz/nA et SOD1= $28,7 \pm 3,6$ Hz/nA ; t test, P=0,45) et la fréquence de décharge mesurée au sommet de la rampe est plus importante pour les MNs SOD1, mais la différence n'est pas significative (WT= $33,2 \pm 4,3$ Hz et SOD1= $40,1 \pm 4,9$ Hz). La figure 28 présente un exemple de décharge représentatif des MNs de chaque lignée. Enfin, si l'on représente graphiquement la durée de décharge en fonction de la pente de la rampe (Fig. 28C et D), une corrélation négative est observée pour les MNs SOD1 (test de Pearson ; P=0,01 * ; r=-0,39) alors que ces paramètres ne sont pas corrélés pour les MNs WT (test de Pearson ; P=0,17 ; r=-0,22). La différence vient du fait que pour les vitesses les plus lentes (<0,5nA/s) la durée moyenne de décharge obtenue pendant ces rampes pour les MNs SOD1 (durée = 4163 ± 345 ; de 1692 à 7363 ms) est plus importante que celle des MNs WT (3288 ± 190 ; de 1025 à 5279 ms ; P=0,03 *).

Les différences décrites pour la période P7-P10 ne sont pas observées en première semaine postnatale. Pendant cette période la répartition des types de décharge ainsi que les durées et les fréquences de décharge sont équivalentes entre les MNs WT et SOD1, même en ne considérant que les rampes de vitesse inférieure à 0,85 nA/s.

g) Comparaison des propriétés électriques des motoneurones et des interneurones enregistrés en haut calcium (4mM)

Dans cette partie réalisée chronologiquement en premier, les motoneurones et les interneurones ont été enregistrés dans un milieu extra-cellulaire contenant 4mM de Ca^{2+} . Cette étude montre que les modifications sont spécifiques des MNs. Comme nous l'avons aussi observé lorsque $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extra}}=2 \text{ mM}$, des différences de propriétés électriques entre MNs WT et SOD1 sont rapportées pour la période P6-P10 (R_{in} et gain plus faibles chez les SOD1 ; table 7), alors que les propriétés des interneurones sont comparables entre les deux lignées.

Pour les interneurones, la R_{in} et le gain sont équivalents entre WT et SOD1, ce qui souligne la spécificité de l'atteinte motoneuronale ($R_{\text{in}}=57,2 \pm 7,7 \text{ M}\Omega$, $n=26$ et gain= $15,4 \pm 2,6 \text{ Hz/nA}$, $n=8$ pour les interneurones WT ; $R_{\text{in}}=46,0 \pm 6,6 \text{ M}\Omega$, $n=29$ et gain= $17,8 \pm 2,4 \text{ Hz/nA}$, $n=10$ pour les interneurones SOD1).

Cette partie de l'étude a été publiée dans la revue European Journal of Neuroscience (Voir annexe II).

Si les valeurs obtenues à 2 mM et à 4 mM sont comparées, on constate que pour les MNs des deux lignées la plupart des paramètres électriques sont différents entre les deux concentrations de calcium. Ces valeurs sont regroupées dans la table 8. Cependant, ces paramètres varient de manière comparable pour les deux lignées. L'effet du changement de la concentration de calcium a été testé expérimentalement sur dix MNs WT en 2^{ème} semaine postnatale. Ces motoneurones ont été enregistrés consécutivement dans un milieu extra-cellulaire avec une concentration de Ca^{2+} de 2mM puis de 4 mM. Seules les données concernant la R_{in} et le potentiel de membrane sont présentées ici. Trop peu de MNs ont été soumis dans les deux conditions expérimentales aux protocoles de stimulation pour pouvoir comparer directement les propriétés de décharge de ces cellules.

Le passage de $[Ca^{2+}]_{extra}=2$ mM à 4mM entraîne une augmentation significative (réversible) de la R_{in} (test exact de permutation pour séries appariés ; $P=0,002$ **). A 2mM, $R_{in}=16,4 \pm 1,9$ M Ω et à 4 mM, $R_{in}=22,9 \pm 3,6$ M Ω , soit une augmentation de 40% (Fig. 29). De même, le potentiel de membrane au repos est significativement plus dépolarisé lorsque $[Ca^{2+}]_{extra}=4$ mM. (Fig. 29).

Il a récemment été montré chez les rongeurs en période postnatale une modulation de la conductance sodique persistante ($I-Na_p$) par le calcium extra-cellulaire sur une population d'interneurones pré-moteurs (Tazerart *et al.*, 2008). Plus la $[Ca^{2+}]_{extra}$ est élevée, plus cette conductance est inactivée. Cette inactivation peut contribuer à augmenter la R_{in} lors du passage à 4mM de $[Ca^{2+}]_{extra}$. Cette modulation de $I-Na_p$ est aussi compatible avec les plus faibles gains et F_{max} observés à 4mM. En effet, $I-Na_p$ augmente l'excitabilité des motoneurones (Kuo *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2005). La baisse du gain et de la F_{max} peut aussi être liée à la plus longue AHP enregistrée quand le $[Ca^{2+}]_{extra}=4$ mM. Dans un tel milieu la quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule via les canaux calciques à haut seuil activés par la dépolarisation est probablement plus massive et active de façon plus importante les conductances potassiques calcium-dépendantes de type SK qui modulent la durée de l'AHP. Le fait que la rhéobase soit plus faible quand le $[Ca^{2+}]_{extra}=4$ mM peut être relié au fait que la R_{in} est plus importante et le potentiel de membrane au repos plus dépolarisé alors que le seuil de déclenchement du PA n'est pas significativement différent entre les deux concentrations (table 8). La plus petite amplitude des PA antidromiques peut être expliquée en partie par le fait que le potentiel de membrane au repos est plus dépolarisé à 4mM (5,7mV d'écart entre les deux concentrations chez les WT). Un raisonnement similaire peut être fait pour expliquer l'amplitude réduite des PA orthodromiques avec un seuil de déclenchement qui est plus dépolarisé à 4mM (bien que la différence ne soit pas significative).

3 - DISCUSSION

Cette étude est la première à caractériser lors du développement postnatal l'évolution des principales propriétés électriques des motoneurones lombaires à la fois dans une lignée de souris sauvage et dans une lignée de souris SOD1 modèle de SLA. De plus, nous montrons pendant cette période des anomalies dans les propriétés électriques des motoneurones des souris SOD1. La première anomalie, observée en première semaine postnatale (P3-P6), concerne la durée de la post hyper polarisation (AHP). La maturation de certaines propriétés électriques est différente entre les motoneurones WT et SOD1, comme le montre par exemple l'évolution de la résistance d'entrée au cours des deux premières semaines post-natales. Cela entraîne une hypoexcitabilité des motoneurones SOD1 en deuxième semaine postnatale (R_{in} et gain plus faibles). Nous avons aussi constaté que, bien que l'excitabilité des motoneurones lombaires SOD1 soit altérée pendant cette période, les autres neurones spinaux (interneurones) ne sont pas concernés par ces changements et possèdent des propriétés électriques comparables aux interneurones WT. Cela renforce l'idée que les atteintes que nous décrivons sont spécifiques de la maladie et que dès le plus jeune âge les motoneurones sont la cible privilégiée des mécanismes physiopathologiques.

Evolution de la résistance d'entrée : différences entre WT et SOD1.

Pour les motoneurones WT, la résistance d'entrée (R_{in}) n'est pas différente entre les deux premières semaines postnatales. Cependant une analyse plus précise des données montre une diminution significative de la R_{in} des motoneurones WT ($P=0,03^*$) entre P3-P5 ($R_{in}=19,4 \pm 1,4 \text{ M}\Omega$; $n=19$) et P6-P7 ($R_{in}=14,7 \pm 1,4 \text{ M}\Omega$; $n=12$) qui reste ensuite stable jusqu'à P10 (voir Fig. 20); Une récente étude longitudinale sur la période embryonnaire de motoneurones lombaires de souris montre une diminution continue de la R_{in} qui passe de $945 \pm 96 \text{ M}\Omega$ (à E13) à $41,4 \pm 11,4 \text{ M}\Omega$ (à P0) (Delpy *et al.*, 2008).

Plusieurs études réalisées chez le rat montrent une diminution continue de la R_{in} des motoneurones de la moelle et du tronc cérébral pendant la période postnatale (Carrascal *et al.*, 2006; Fulton et Walton, 1986; Nunez-Abades et Cameron, 1995; Vinay *et al.*, 2000a; Vinay *et al.*, 2000b). Nos données suggèrent que la chute de R_{in} qui commence dès la période embryonnaire (Delpy *et al.*, 2008) se poursuit en première semaine postnatale pour les motoneurones WT. Ces résultats suggèrent que chez la souris les motoneurones lombaires mûrissent plus vite que chez le rat. Cette hypothèse est appuyée par la proportion identique de motoneurones qui déchargent de façon soutenue pendant toute la durée d'un créneau de courant entre les deux premières semaines postnatales (85%) alors que chez le rat nouveau-né il est montré que cette proportion est de 40% à P0 et de 70% à P5 pour les motoneurones extenseurs (Vinay *et al.*, 2002), le segment L5 où nos motoneurones ont été enregistrés étant de nature extensogène (Kiehn, 2006). D'autres données de la littérature suggèrent également que les processus de maturation vont plus vite chez la souris par rapport au rat. Par exemple la spécificité musculaire des afférences monosynaptiques sur les motoneurones est établie chez la souris à P0 (Mears et Frank, 1997) et à P5 chez le rat (Seebach et Ziskind-Conhaim, 1994). Les souriceaux commencent à marcher spontanément à partir de P9 (Jiang *et al.*, 1999a; Serradj et Jamon, 2007; Whelan, 2003) alors qu'une locomotion spontanée s'observe chez le rat à partir de P11-P12 (Westerga et Gramsbergen, 1990).

Nous venons de voir pour les motoneurones WT que la R_{in} se stabilise à partir de P6 jusqu'à P10. Pour les motoneurones SOD1 la baisse se poursuit en deuxième semaine postnatale (Fig. 20), ce qui explique la différence de R_{in} entre les motoneurones WT et SOD1 à P7-P10, alors que la R_{in} est comparable à P3-P6. Ces données suggèrent que la maturation des motoneurones SOD1 est anormale pendant la période postnatale. Cette diminution de R_{in} pourrait s'expliquer par une augmentation de la taille des motoneurones et/ou par une

augmentation des conductances qui sont actives pour des potentiels de membrane proches du potentiel de repos. Les conductances de fuite essentiellement perméables au potassium ne dépendent pas du voltage et sont des candidats potentiels pouvant expliquer la baisse de R_{in} (McLarnon, 1995). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que les protéines mutantes SOD1 (dont la G85R) peuvent former des pores lors du phénomène d'agrégation. Ces pores pourraient perméabiliser les membranes en formant des canaux ioniques (Chung *et al.*, 2003). De tels canaux ioniques se forment à partir des protéines β -amyloïdes impliquées dans la maladie d'Alzheimer (Kagan *et al.*, 2002; Lin et Kagan, 2002). Cependant, il est montré que les motoneurones avec une faible R_{in} (grande taille) ont une constante de temps membranaire (τ_m) plus faible (Zengel *et al.*, 1985), alors que τ_m est identique dans les motoneurones des deux lignées. Cette donnée suggère que l'augmentation de taille pourrait être associée à une diminution de la densité de canaux ioniques chez les motoneurones SOD1 (Viana *et al.*, 1994). Cela rend difficilement compatible l'hypothèse d'une augmentation des conductances pour expliquer la chute de R_{in} et renforce l'idée que la différence de R_{in} est essentiellement due à une taille plus importante des motoneurones SOD1 à P7-P10. Cette possibilité est appuyée par le fait que la capacité membranaire des motoneurones SOD1 est plus grande que celle des motoneurones WT.

Le gain plus faible des motoneurones SOD1 révèle une diminution de leur excitabilité.

Le gain mesuré sur les relations Intensité-Fréquence est un paramètre couramment pris en compte dans l'analyse de l'excitabilité des motoneurones dans différentes situations expérimentales comme des conditions pathologiques ou pendant la période de développement (Brownstone, 2006; Button *et al.*, 2006; Carrascal *et al.*, 2005; Heckmann *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2006; Mentis *et al.*, 2007). Pour les motoneurones WT, le gain est stable pendant la période analysée (P3-P10). Ce résultat a aussi été décrit pour certaines

populations de motoneurones chez le rat (Carrascal *et al.*, 2006; Fulton et Walton, 1986). Cependant pour les motoneurones SOD1 en deuxième semaine postnatale, le gain est plus faible que celui des motoneurones WT. Ce résultat ne semble pas pouvoir être expliqué par la chute de la résistance d'entrée des motoneurones SOD1. En effet, ces deux paramètres ne sont pas corrélés (Fig. 21C). De même au niveau de l'hypoglosse, en période postnatale, la R_{in} et le gain des motoneurones ne sont pas corrélés (Viana *et al.*, 1995). L'AHP est identique entre les deux types de motoneurones à P7-P10 et ne semble pas intervenir dans la différence de gain observée entre les motoneurones des deux lignées. Ces données suggèrent que la diminution du gain des motoneurones SOD1 peut être attribuée à des modifications de conductances ioniques des motoneurones. Certaines conductances potassiques (courants I_A et I_M) jouent un rôle de filtre et ralentissent la fréquence de décharge en s'opposant à la dépolarisation lors d'un pulse de courant (Wang et McKinnon, 1995). Une augmentation de ces courants dans les motoneurones SOD1 pourrait expliquer le gain plus faible et serait aussi compatible avec le fait que la fréquence maximale de décharge soit comparable entre les motoneurones WT et SOD1, ces courants étant inactivés à des potentiels de membrane très dépolarisés. Le courant I_M diminue le gain de la relation IF des motoneurones adultes de tortue (Alaburda *et al.*, 2002) et des motoneurones lombaires chez le rat à P7-P11 (Rivera-Arconada et Lopez-Garcia, 2005). De façon intéressante, il a été montré au niveau des motoneurones spinaux de rat que le courant I_A diminue en période postnatale (Gao et Ziskind-Conhaim, 1998).

L'évolution de certaines propriétés électriques est comparable entre les motoneurones WT et SOD1.

Nos données suggèrent aussi que des processus de maturation sont équivalents entre les motoneurones WT et SOD1. Comme il a été observé pour les motoneurones de rat, les

motoneurones des deux lignées voient leur courant de rhéobase augmenter (Carrascal *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 1994; Vinay *et al.*, 2002; Vinay *et al.*, 2000b). Nos données montrent que le courant de rhéobase est corrélé négativement avec la valeur de la R_{in} pour les motoneurones des deux lignées (Fig. 21D).

La latence d'apparition du PA antidromique diminue entre la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine postnatale à la fois dans les motoneurones WT et SOD1. Ce résultat suggère que le processus de myélinisation des axones des motoneurones qui commence à cette période (entre P6 et P9 chez le rat) se met en place au même moment dans les deux lignées (Dziewulska *et al.*, 1999).

Pour les motoneurones des souris WT et SOD1, la durée du PA diminue entre les deux premières semaines postnatales et ce résultat s'explique essentiellement par une repolarisation plus rapide (voir Fig. 23). Chez le rat, il a été montré pour les motoneurones que le raccourcissement de la durée du PA est la conséquence de l'augmentation de la densité et/ou de l'accélération des cinétiques d'activation des canaux potassiques sensibles au voltage (Carrascal *et al.*, 2006; Gao et Ziskind-Conhaim, 1998; Viana *et al.*, 1993).

Dans les deux groupes d'âge les caractéristiques du PA et le seuil de déclenchement du PA (qui dépend du potentiel de repos, de la R_{in} et du courant de rhéobase) sont comparables entre les motoneurones WT et SOD1. Ces observations suggèrent que les propriétés et la maturation des conductances voltage-dépendantes responsables de la genèse du PA ne sont pas altérées par la mutation.

L'augmentation de la fréquence maximale de décharge observée dans les motoneurones des deux lignées entre la première et la deuxième semaine postnatale a aussi été décrite dans les motoneurones phréniques (Greer et Funk, 2005), oculomoteurs (Carrascal *et al.*, 2006), hypoglosses (Viana *et al.*, 1995) et lombaires chez le rat (Fulton et Walton, 1986; Vinay *et*

al., 2000b). Ce processus développemental s'explique en partie par les phénomènes de maturation des conductances voltage-dépendantes, comme l'augmentation de la densité de canaux sodiques (Gao et Ziskind-Conhaim, 1998), leur capacité à rester plus longtemps dans un état activable (Carlin *et al.*, 2008) et le développement des conductances potassiques (Viana *et al.*, 1994; Vinay *et al.*, 2000b) responsables de la diminution de la durée du PA (Carrascal *et al.*, 2006; Vinay *et al.*, 2002). Ces données appuient aussi l'hypothèse que la mutation SOD1-G85R n'altère pas les propriétés et la maturation des conductances voltage-dépendantes qui sous-tendent le PA. D'autres mécanismes peuvent aussi expliquer l'augmentation de la fréquence de décharge pendant la période postnatale comme la maturation des courants calciques de type L (Jiang *et al.*, 1999b) ou encore l'activation de conductances sodiques persistantes (Bennett *et al.*, 2001).

L'AHP est la modification la plus précoce observée dans les motoneurones SOD1.

En première semaine postnatale (P3-P6), l'AHP mesurée au courant de rhéobase est plus longue pour les motoneurones SOD1 (Fig. 24 et table 4), alors qu'à cette période les autres paramètres électriques sont comparables entre les deux lignées. Cette donnée suggère des modifications des propriétés ioniques dès la première semaine post-natale. Lors d'un PA, la phase de repolarisation résulte de l'inactivation graduelle des canaux sodiques par la dépolarisation membranaire et de l'activation de conductances potassiques dépendantes du voltage qui entraînent une sortie de potassium du neurone et repolarise la membrane. La première phase de l'AHP s'explique par le fait que ces conductances potassiques ne s'inactivent pas à cette échelle de temps et sont encore ouvertes, laissant échapper du potassium du neurone bien que le potentiel de membrane soit revenu à une valeur très négative. D'autres conductances potassiques activées par le calcium intracellulaire (conductances SK et BK) contribuent à la longue durée de l'AHP (Miles *et al.*, 2005; Viana

et al., 1993). Les différences que nous observons ici sont situées dans une échelle de temps plus compatible (entre 80-100ms) avec des modifications concernant ce dernier type de conductances plutôt qu'avec des altérations dans la cinétique d'inactivation des canaux potassiques intervenant dans la phase de repolarisation. Ces conductances potassiques calcium-dépendantes sont activées par le Ca^{2+} qui entre dans le neurone via les canaux calciques à haut seuil d'activation (HVA pour *high-voltage-activated*, activés lors d'un PA) (Sah, 1996; Viana *et al.*, 1993). Une augmentation de ces conductances HVA entraînerait une entrée plus massive de calcium qui activerait en retour plus fortement les canaux de type SK.

La différence d'AHP décrite en première semaine post-natale est transitoire. La durée de l'AHP entre les motoneurones WT et SOD1 est comparable en deuxième semaine postnatale. Des études récentes suggèrent un lien entre la vitesse de repolarisation de l'AHP et l'activation des conductances sodiques persistantes ($I-Na_p$) dans les motoneurones de souris et de chat (Kuo *et al.*, 2006; Lee et Heckman, 2001). Plus cette vitesse est importante (AHP courte) moins $I-Na_p$ est nécessaire pour l'émission d'un nouveau PA (Kuo *et al.*, 2006). Une augmentation de $I-Na_p$ pour les motoneurones SOD1 pourrait se développer en seconde semaine post-natale pour compenser la plus longue AHP observée à P3-P6.

Les rampes révèlent des différences entre les motoneurones WT et SOD1 à P7-P10 : contribution de la conductance sodique persistante ?

Avec les protocoles de stimulation en rampe, les types 1, 3 et 4 de décharge sont influencés par l'activation de conductances persistantes. Chez la souris, les conductances calciques de type L responsables de plateau lors des stimulations en rampe (Bennett *et al.*, 2001) sont pleinement matures à partir de P7 (Jiang *et al.*, 1999b). Avec ce protocole de stimulation en

rampe, aucune différence entre les motoneurones WT et SOD1 n'a été observée en première semaine postnatale.

Nous avons aussi comparé les réponses des MNs WT et SOD1 en seconde semaine postnatale, après maturation de ces conductances. Les enregistrements obtenus suggèrent de manière indirecte que les conductances persistantes sodiques et probablement calciques sont plus fortes pour les motoneurones SOD1 en seconde semaine postnatale. Les courants persistants sont préférentiellement activés pour des rampes de vitesse lente (Bennett *et al.*, 2001). A P7-P10, en ne considérant que les rampes dont la vitesse est inférieure à 0,85nA/s, le courant minimal pour déclencher le premier PA ($I_{\text{début}}$) est plus faible pour les motoneurones SOD1. A partir d'un potentiel de membrane au repos ainsi que d'un seuil de déclenchement du PA (PA_{seuil}) identiques entre les motoneurones des deux lignées, l'activation de conductances qui dépolarisent la membrane plus rapidement jusqu'au PA_{seuil} est nécessaire pour que les motoneurones SOD1 possèdent un $I_{\text{début}}$ plus faible, la R_{in} de ces cellules étant plus faible que celles des motoneurones WT. Le courant sodique persistant (I_{Na_p}) est la principale conductance persistante activée lors des phases ascendantes des rampes (Kuo *et al.*, 2005; Powers et Binder, 2003; Tazerart *et al.*, 2008), alors que les courants calciques persistants sont responsables des décharges soutenues lors des phases descendantes (Powers et Binder, 2003). Une activation plus importante de I_{Na_p} chez les motoneurones SOD1 pourrait expliquer le fait qu'ils déchargent plus tôt ($I_{\text{début}}$ plus faible) lors des rampes de courant.

De plus le gain mesuré lors de la phase ascendante est comparable entre les motoneurones WT et SOD1. Cela appuie également l'hypothèse d'une plus forte activation des courants sodiques persistants dans les motoneurones SOD1 dès la période postnatale (Heckman *et al.*, 2008a; Heckman *et al.*, 2008b). En effet, lors des protocoles de stimulation en créneaux le gain est significativement plus faible pour ces motoneurones (différence significative $>$ à

27%). Une plus forte activation de $I-Na_p$ lors des stimulations en rampe expliquerait que le gain des motoneurones SOD1 se rapproche des valeurs des MNs WT (différence alors de 14% non significative).

Enfin le graphique de la figure 28D montre pour les motoneurones SOD1 que plus la vitesse de la rampe est faible plus la durée de décharge est longue. Cette donnée est compatible avec une plus forte activation des conductances persistantes pour les motoneurones SOD1 lors des rampes, cette relation n'étant pas vérifiée pour les motoneurones WT (Fig. 28C). La différence vient du fait que pour les rampes les plus lentes les motoneurones SOD1 déchargent significativement plus longtemps. Cela appuie aussi la possibilité d'une plus forte activation des conductances persistantes sodiques et calciques pour les motoneurones SOD1.

Lors des rampes, le fait que les motoneurones SOD1 commencent à décharger plus tôt et donc plus longtemps avec un gain comparable aux MNs WT leur permet d'atteindre une fréquence de décharge plus importante (40 Hz vs 33 Hz pour les WT). La chute de résistance d'entrée pourrait déjà être une adaptation diminuant l'excitabilité des motoneurones pour compenser une trop forte stimulation au travers des conductances persistantes plus développées.

CHAPITRE V
ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES MOTONEURONES WT ET
SOD1 EN PERIODE POST-NATALE

1 - INTRODUCTION

Nous venons de montrer à l'aide des enregistrements intracellulaires que les motoneurones SOD1 présentent une résistance d'entrée plus faible ainsi qu'une capacité membranaire plus grande que les motoneurones WT pendant la 2^{ème} semaine postnatale, ce qui suggère une taille plus importante. A l'aide de reconstructions en 3D des motoneurones du segment L5 après injection de neurobiotine, nous avons testé cette hypothèse. De nombreuses études établissent un lien entre la résistance d'entrée et la taille des motoneurones (Kernell et Zwaagstra, 1989; Nieto-Gonzalez *et al.*, 2007; Torikai *et al.*, 1996), les motoneurones avec une faible R_{in} étant des motoneurones de grande taille.

Après injection de colorant (neurobiotine, peroxidase, biocytine) et reconstruction en trois dimensions de motoneurones de la moëlle épinière et du tronc cérébral, plusieurs études réalisées sur différentes espèces, préférentiellement le chat (Cameron *et al.*, 1991b; Horcholle-Bossavit *et al.*, 1990) et le rat (Dekkers *et al.*, 1994), plus récemment la souris (Li *et al.*, 2005), montrent que la période postnatale est associée à d'importants changements morphologiques. Quelle que soit la population et l'espèce animale considérée, une règle générale pour les motoneurones semble concerner leur augmentation de taille entre la naissance et l'âge adulte. Parmi d'autres, nous pouvons citer les motoneurones de l'hypoglosse (Nunez-Abades *et al.*, 1994), du tibialis antérieur et de l'*extensor digitorum longus* chez le rat (Dekkers *et al.*, 1994), les motoneurones phréniques (Cameron *et al.*, 1991a), du muscle péroné (Horcholle-Bossavit *et al.*, 1990) et du triceps sural (Ulfhake et Cullheim, 1988) chez le chat. Il semble donc qu'entre la naissance et l'âge adulte, la taille des arborisations dendritiques et du corps cellulaire des motoneurones augmente en lien avec l'intense maturation des capacités motrices observée pendant cette période.

Parallèlement à cette croissance, les arborisations dendritiques connaissent un remodelage avec des phénomènes de rétractation. Ces modifications sont associées avec des changements de complexité des arborisations. Chez le rat, l'augmentation de taille des motoneurones phréniques et de ceux de l'hypoglosse s'accompagne d'une augmentation du nombre de points de branchement (Cameron *et al.*, 1991a; Nunez-Abades *et al.*, 1994). Chez le chat, on observe, parallèlement à l'augmentation de taille, un remodelage et une redistribution spatiale des structures dendritiques des motoneurones innervant le muscle du triceps sural (Ulfhake *et al.*, 1988). Pendant la maturation, certaines périodes sont associées à des phénomènes de rétractation dendritique. Par exemple, bien que la complexité des motoneurones phréniques du chat soit plus importante à l'âge adulte par rapport à la naissance, il est observé pour ces motoneurones une diminution du nombre de segments terminaux dans la période post-natale précoce (Cameron *et al.*, 1991a). Ces modifications sont en lien direct avec le raffinement des connections synaptiques.

Récemment chez la souris, une étude a montré que la taille des motoneurones lombaires doublait entre P2 et P11 (Li *et al.*, 2005). Paradoxalement, la complexité des motoneurones est identique entre les deux groupes d'âge. Cette relative constance dans la topologie dendritique de ces motoneurones entre P2 et P11 est surprenante au regard de l'importante maturation des capacités motrices de ces animaux pendant la même période. Avant notre travail, cette étude était la seule réalisée chez la souris à partir de reconstructions complètes de motoneurones lombaires pendant la période postnatale.

2 - RESULTATS

a) Description générale

L'injection intracellulaire de neurobiotine a été réalisée dans n=42 motoneurones à P4-P9 (WT, n=24 et SOD1 n=18). Des exemples de motoneurones marqués par la neurobiotine sont illustrés dans la figure 30. Le nombre total de motoneurones reconstruits en 3D (n=18) est inférieur au nombre total de motoneurones pour lesquels le marquage est « positif » (n=28). Les reconstructions n'ont pas toujours été possibles soit parce que le marquage n'était pas assez contrasté par rapport au bruit de fond (n=3), soit car des marquages multiples étaient observés (n=7). Ces marquages multiples ont été observés alors qu'un seul protocole d'injection avait été réalisé au cours de l'expérimentation (voir Fig. 30C). Dans ces cas l'entrecroisement des dendrites rend impossible l'individualisation de chaque motoneurone. L'existence de couplages électriques (jonctions gap) est la seule possibilité permettant d'expliquer l'obtention de marquages multiples. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'abondance des jonctions gap pendant la période post-natale (Chang *et al.*, 1999; Kiehn et Tresch, 2002). Notre étude suggère donc la présence de jonctions gap dans 25% des marquages positifs à la fois pour l'échantillon dans son ensemble (n=7/28) et pour chacune des deux lignées de souris (4/16 chez les WT et 3/12 chez les SOD1).

La majorité des expérimentations et des reconstructions (n=14 sur 18) a été réalisée pendant la tranche d'âge P8-P9; les autres reconstructions concernent 3 motoneurones WT et un motoneurone SOD1 à P4- P7. Pour plus d'homogénéité, à la vue des différences observées entre 1^{ère} et 2^{ème} semaines postnatales (Chap. IV), tous les résultats exposés ci-dessous concernent exclusivement les données obtenues à partir des marquages intracellulaires de motoneurones à P8-P9.

Les résultats de la comparaison des propriétés morphologiques des motoneurones WT et SOD1 à P8-P9 sont publiés dans la revue Journal of Comparative Neurology (annexe III).

b) Position au sein du segment L5 des motoneurones reconstruits en 3D.

Sur six préparations de moelle épinière isolée (2 WT et 4 SOD1), les motoneurones ont été marqués de façon rétrograde avec de la rhodamine appliquée sur le bout d'une racine ventrale L5 sectionnée (Fig. 31A). Les premières expériences de marquage des pools de motoneurones chez les souris SOD1 (n=2) ont été tentées avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour les moelles WT et le marquage des motoneurones par la rhodamine était alors presque inexistant. Dans les deux autres préparations SOD1, comme pour les préparations WT, environ 450 motoneurones sont retrouvés pour chaque moelle épinière. Ces marquages ont surtout permis d'envisager l'organisation topographique des motoneurones au sein du segment. Pour les moelles WT et SOD1, trois zones contenant des motoneurones sont mises en évidence, une en position ventro-médiane et les deux autres positionnées plus latéralement (Fig. 31A). Les enregistrements électrophysiologiques des motoneurones ont été réalisés dans la partie caudale du segment L5, où seul le pool le plus ventro latéral est présent. Les marquages rhodamine ont permis de dessiner une moelle schématique représentant les trois pools au sein du segment L5 (Fig. 31B). En ajustant à la même échelle les schémas des moelles contenant les motoneurones injectés avec la neurobiotine, il est possible d'évaluer la position respective des corps cellulaires des motoneurones reconstruits en 3D. La figure 31B montre que les motoneurones reconstruits sont enregistrés dans le pool ventro-latéral de façon assez homogène.

c) Comparaison des propriétés morphologiques des motoneurones WT et SOD1 à P8-P9.

Le nombre de motoneurones complètement reconstruits en 3D au cours de la période P8-P9 est de 14 (WT : n=8 et SOD1 : n=6). Pour ces échantillons, la résistance d'entrée des motoneurones SOD1 est significativement plus faible que celle des motoneurones WT (Fig. 32B). Les histogrammes de distribution montrent que les échantillons des motoneurones reconstruits sont représentatifs des populations entières (Fig. 32A) en terme de résistance d'entrée. Cependant, bien que les échantillons soient petits, des différences significatives sont mises en évidence entre les motoneurones des deux lignées pendant cette période. Par exemple, la surface membranaire totale (soma + dendrites) des motoneurones SOD1 ($62789 \pm 6410 \mu\text{m}^2$) est significativement plus importante ($P=0,022^*$) que celle des motoneurones WT ($40696 \pm 4922 \mu\text{m}^2$) (Fig. 32C). A partir des coupes contenant le soma les dimensions des moelles ont aussi été mesurées. Aucune différence entre les deux lignées n'a été trouvée pour la largeur (WT= $1727 \pm 53 \mu\text{m}$ et SOD1= $1649 \pm 57 \mu\text{m}$; $P=0,57$) et la longueur dorso-ventrale (WT= $1157 \pm 52 \mu\text{m}$ et SOD1= $1116 \pm 57 \mu\text{m}$; $P=0,66$). De même, le diamètre de base des axones est comparable entre les motoneurones des deux lignées (WT= $2,97 \pm 0,43 \mu\text{m}$; SOD1= $2,73 \pm 0,92 \mu\text{m}$; $P=0,64$).

o *Caractéristiques des corps cellulaires et des dendrites primaires.*

Dans le plan transversal, la forme des corps cellulaires des motoneurones varie de plutôt arrondie à assez allongée (Fig. 33). La taille du soma est envisagée à partir de l'aire de la projection 2D dans le plan transversal. De cette mesure d'aire est déterminé un diamètre équivalent, à partir duquel ont été calculés la surface et le volume de la sphère correspondante. A P8-P9, pour les motoneurones reconstruits en 3D les différences observées entre WT et SOD1 ne sont pas significatives (table 9). Dans cette table sont aussi données les valeurs concernant les dendrites primaires : le diamètre de base moyen, l'aire

totale des sections formées par les dendrites primaires (somme des trous dendritiques) ainsi que le nombre de dendrites primaires par motoneurone. Comme pour le corps cellulaire, les valeurs concernant les paramètres des dendrites primaires ne sont pas significativement différentes entre les MNs WT et SOD1.

○ *Caractéristiques des arborisations dendritiques.*

Pour les motoneurones les dendrites sont orientées dans des directions bien précises qui dépendent en partie de la position du corps cellulaire. Les dendrites projettent majoritairement dans 3 directions (dorsale, dorso-latérale et médiane) quand le soma se trouve proche de la limite latérale du pool de motoneurones (Fig. 34B). Lorsque le motoneurone est situé plus près de la ligne médiane, les directions ventrales et ventro-latérales sont aussi représentées (Fig. 34A). L'orientation de la pousse dendritique est similaire entre les deux lignées comme le montrent les histogrammes « moyens » représentant pour chaque lignée les pourcentages relatifs des 12 directions définies par des sections de 30°. Pour les deux lignées les directions dorsale et ventro-médiane sont les plus représentées (voir Fig. 34C et D).

Le motoneurone est une grande cellule multipolaire avec plusieurs départs dendritiques émergeant du corps cellulaire (voir par exemple, Fig. 33 et 35). Le nombre de départs dendritiques est comparable entre les motoneurones WT et SOD1 (table 9). Pour chaque motoneurone nous avons retrouvé des segments dendritiques sur plusieurs coupes adjacentes à la coupe contenant le soma (sur 6 à 11 coupes). Cela correspond à une extension dendritique rostro-caudale allant de 440 μm à 730 μm . Aucune différence n'a été observée pour ce paramètre entre les motoneurones SOD1 et WT (P=1 test de Mann-Whitney ; 595 \pm 34 μm chez les WT et 601 \pm 38 chez les SOD1).

En analysant la morphologie des arborisations dendritiques des motoneurones reconstruits, des différences significatives sont observées à la fois pour les paramètres métriques et topologiques. L'ensemble des paramètres comparés est donné dans la table 10. Le nombre total de segments dendritiques (Sgmt) est plus élevé pour les motoneurones SOD1 avec en moyenne 293 segments par motoneurone et 152 segments seulement pour les motoneurones WT. La longueur dendritique totale est aussi plus importante pour les motoneurones SOD1 avec en moyenne $\sum_{Long} = 27485 \mu\text{m}$ et pour les motoneurones WT, $\sum_{Long} = 16658 \mu\text{m}$. D'autres paramètres comme le nombre de points de branchements (Brcmt), le nombre de terminaisons (Trms), la surface dendritique totale suivent la même règle et sont significativement plus élevés pour les motoneurones SOD1. Cependant, les longueurs dendritiques moyennes (i.e. du soma aux terminaisons, $Long_{moy}$) ainsi que la plus longue distance dendritique du soma à une terminaison ($Long_{max}$) sont similaires entre les motoneurones des deux lignées indiquant que l'enveloppe des champs dendritiques est comparable. D'ailleurs, la surface des enveloppes dendritiques est comparable pour les motoneurones WT et SOD1 (WT = $1079 \pm 69 (x10^3 \mu\text{m}^2)$ et SOD1 = $1144 \pm 48 (x10^3 \mu\text{m}^2)$; P=0,49).

La figure 35 illustre les différences métriques et topologiques des arborisations dendritiques des motoneurones observés dans le plan transversal. Les motoneurones illustrés dans cette figure sont comparés 2 à 2 et représentent pour chaque lignée le motoneurone avec le moins de point de branchement (en haut), celui avec le nombre de branchement le plus proche des valeurs médianes (au milieu) et le motoneurone avec le plus grand nombre de points de branchement (en bas). Les dendrogrammes et les diagrammes de Sholl de ces motoneurones sont aussi présentés par paire dans les figures 36 et 37. Tous les motoneurones reconstruits en 3D pendant cette tranche d'âge sont présentés dans le plan transversal sur la figure 38.

Les dendrogrammes des motoneurones de la figure 36 renseignent sur la relation spatiale entre les différentes dendrites d'un motoneurone. Les distances dendritiques les plus longues atteignent 700 μ m et sont comparables entre motoneurones WT et SOD1. Pour les motoneurones WT, 9 dendrites sur les 63 ont moins de 3 points de branchement (voir pour exemple les dendrites n°2, n°6 et n°6 de la figure 36A, C, et E respectivement). Aucune dendrite issue de motoneurones SOD1 (0 sur 42) ne possède moins de 3 points de branchement. Au contraire, le nombre de dendrites avec 18 points de branchements ou plus représentent environ 50% (20 sur 42) des dendrites issues des motoneurones SOD1 mais moins de 20% (12 sur 63) pour les motoneurones WT.

La figure 37 présente le nombre de points de branchement en fonction de la distance radiale au soma des motoneurones illustrés dans la figure 35. Dans tous les cas, le nombre de points de branchement entre 100 μ m et 200 μ m à partir du soma est plus important pour les motoneurones SOD1 par rapport à leurs homologues WT. A partir de 200 μ m du soma, le nombre de points de branchement diminue à la fois pour les motoneurones WT et SOD1. Si l'on considère la distribution radiale des points de branchement par rapport au soma pour toute la population de motoneurones reconstruits en 3D, la différence entre les motoneurones WT et SOD1 est évidente, notamment entre 50 et 250 μ m, comme l'illustre la figure 39A. Pour la population WT, le branchement atteint sa valeur maximale entre 50 et 75 μ m et reste élevé jusqu'à 175 μ m. Au contraire pour la population SOD1 le nombre de points de branchement observés sur les dendrites continue d'augmenter entre 50 et 125 μ m du soma avant de diminuer comme pour les motoneurones WT à partir de 175 μ m.

Les différences hautement significatives observées entre les motoneurones WT et SOD1 pour les paramètres concernant l'ordre moyen des segments dendritiques (Ord_{moy}), l'ordre moyen des segments dendritiques terminaux ($TrmOrd_{moy}$) ainsi que l'ordre dendritique maximal pour chaque motoneurone (Ord_{max}) reflètent aussi la différence du nombre de

points de branchement et de la complexité des motoneurones SOD1. Cette augmentation de complexité observée sur les dendrites des motoneurones SOD1 explique leur plus grande taille.

De la même manière nous avons analysé la distribution de la longueur dendritique en fonction de la distance radiale au soma (Fig. 39B). Cette analyse montre clairement la différence de longueur dendritique entre les motoneurones WT et SOD1 avec une différence maximale autour de 200 μm , zone où pour les deux types de motoneurones les plus grandes valeurs sont atteintes. Cette différence de longueur dendritique reflète le nombre de segments dendritiques plus élevé du fait de la multiplication des points de branchements pour les motoneurones SOD1.

Les histogrammes de distribution de la surface somatique, de la longueur dendritique totale, de la surface dendritique totale et du nombre total de point de branchement illustrent les principales différences des paramètres topologiques et métriques entre les motoneurones WT et SOD1 (Fig. 40).

Cette étude montre clairement que les arborisations dendritiques des motoneurones SOD1 sont plus développées (longueur et surface plus importantes) et plus complexes (plus grand nombre de points de branchement donc de segments dendritiques, Ord_{max} et Ord_{moy} supérieurs). La figure 41 illustre, pour les 2 lignées, une dendrite représentative en terme de longueur, de surface dendritique et de nombre de points de branchement.

Un paramètre important, souvent corrélé avec la taille et la complexité de l'arborisation dendritique, est le diamètre de base des dendrites primaires (Cameron *et al.*, 1991a; Kernell et Zwaagstra, 1989; Li *et al.*, 2005). Dans notre étude les distributions des diamètres de base pour les motoneurones des deux lignées suivent une loi normale (de 2,2 μm à 9,9 μm pour les WT ; de 3,2 μm à 12 μm pour les SOD1). Pendant la période P8-P9 pour les

motoneurones reconstruits en 3D, la surface et la complexité des dendrites de chaque motoneurone sont positivement corrélées avec leur diamètre de base (Fig. 42). Pour la taille (surface membranaire), cette relation est plus forte pour les dendrites des motoneurones SOD1. Les pentes des régressions linéaires sont significativement différentes entre les deux populations (test F de variances, $P=0,00058^{***}$). La pente est presque deux fois plus importante pour les SOD1 (pente = $2,02 \pm 0,24$ pour les SOD1 et pente = $1,02 \pm 0,17$ pour les WT).

Pour la complexité (nombre de points de branchement), nous observons la même différence entre les motoneurones WT et SOD1 avec une relation plus puissante pour les SOD1. Les pentes des régressions linéaires sont là encore significativement différentes entre les motoneurones des deux lignées (test F de variances, $P=0,0033^{**}$) avec à nouveau une pente presque deux fois plus importante pour les SOD1 (pente = $4,68 \pm 0,74$ pour les SOD1 et pente = $2,41 \pm 0,37$ pour les WT).

Si l'on s'intéresse aux dendrites d'un diamètre de base supérieur à $5 \mu\text{m}$, on voit sur ces deux graphiques que les valeurs de surface et le nombre de points de branchement sont nettement supérieurs pour les dendrites des motoneurones SOD1 ; cette tendance est encore plus évidente pour le nombre de points de branchement (Fig. 42B). L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que les dendrites des motoneurones SOD1 ont une croissance anormale.

3 - DISCUSSION.

Notre analyse quantitative des caractéristiques métriques et topologiques des motoneurones WT et SOD1 prouve sans ambiguïté que la structure dendritique des motoneurones SOD1 est profondément affectée par la mutation pendant la deuxième semaine postnatale. Le principal résultat est une prolifération des branches dendritiques commençant à environ $100\mu\text{m}$ du soma dans les motoneurones transgéniques entraînant une augmentation de complexité des arborisations.

Puisque nos enregistrements intracellulaires *in situ* indiquent que la résistance d'entrée des motoneurones SOD1 est inférieure et leur capacité membranaire plus élevée en comparaison des motoneurones WT, notre hypothèse était que ces paramètres résultent principalement d'une plus grande surface membranaire. Nos résultats prouvent clairement que la longueur et la superficie membranaire des arborisations dendritiques sont significativement plus importantes dans les motoneurones SOD1 en raison de la multiplication des points de branchement. Bien que nous ne puissions pas totalement exclure la possibilité que les motoneurones WT et SOD1 reconstruits en 3D innervent des muscles de différents types, les données morphologiques soutiennent fortement le fait qu'ils appartiennent à une population homogène, tout d'abord sur le plan de leur position dans la corne antérieure de la moelle (Fig. 31 ; § matériels et méthodes). En outre, le diamètre du soma (D_{soma}), le diamètre moyen des dendrites primaires (D_{prim}), l'extension rostro-caudale, la plus grande longueur dendritique du soma à une terminaison (Long_{max}), la longueur dendritique moyenne du soma vers les terminaisons (Long_{moy}), et l'enveloppe des champs dendritiques sont similaires entre les motoneurons WT et SOD1. Ces paramètres sont généralement différents selon les types de motoneurones (Burke, 1982; Burke *et al.*, 1977; Ulfhake et Kellerth, 1982). Les dendrites représentent le compartiment cellulaire spécialisé dans la collecte d'informations et il est admis que la pousse dendritique est organisée dans

ce but. Les motoneurones d'un même groupe de muscles forment des contacts avec les éléments pré-synaptiques dans les mêmes régions de la moelle. Les motoneurones innervant des muscles différents montrent généralement des différences dans la topographie dendritique, par exemple les motoneurones des muscles trapèzes et des muscles dorsaux du cou (Vanner et Rose, 1984), ou les muscles associés à la fermeture ou à l'ouverture de la mâchoire (Moritani *et al.*, 2003). Les histogrammes polaires montrent clairement que la pousse dendritique pour les dendrites des motoneurones des deux lignées est orientée dans les mêmes directions. Cette donnée renforce l'idée d'une homogénéité du type de motoneurones reconstruits entre les deux lignées. Enfin, les axones des différents types de motoneurones (lents vs rapides) n'ont pas la même vitesse de conduction. Cette vitesse est étroitement liée au diamètre des axones, les axones les plus rapides possédant un plus grand diamètre (Burke *et al.*, 1977; Ulfhake et Kellerth, 1982). Ici les diamètres de base des axones sont équivalents entre les deux lignées. Il est donc peu probable que la plus grande taille des arborisations dendritiques des motoneurones SOD1 par rapport aux motoneurones WT soit le reflet d'une proportion différente dans le type de motoneurones reconstruits.

Par ailleurs, les paramètres métriques et topologiques des motoneurones WT sont dans la gamme de ceux récemment décrits pour les motoneurones lombaires chez la souris en deuxième semaine postnatale (Li *et al.*, 2005), alors que le nombre moyen de points de branchement des motoneurones SOD1 est presque deux fois supérieur à celui observé dans les motoneurones WT.

La période de développement se caractérise par des phénomènes d'addition et de rétraction des branches dendritiques (Jan et Jan, 2003) en fonction des contacts synaptiques établis. Cela peut expliquer que certaines dendrites ont très peu voire aucun point de branchement. Pour les motoneurones WT, la présence de dendrites avec peu ou pas de point de

branchement suggère que de tels mécanismes se produisent également dans les motoneurones lombaires des souris à P8-P9. Cependant, dans les motoneurones SOD1, les arborisations dendritiques les plus simples possèdent au moins trois points de branchement, confirmant leur propension à multiplier leur nombre de segments. De plus le nombre de dendrites extrêmement branchées (avec plus de 18 bifurcations) représente environ 50 % et 20 % des dendrites des motoneurones SOD1 et WT respectivement. Un défaut dans les mécanismes d'élagage peut expliquer les arborisations dendritiques anormales observées dans les motoneurones SOD1.

La complexité des arborisations dendritiques est principalement modulée par l'activité neuronale et les facteurs trophiques pendant la période de développement (Libersat et Duch, 2004). Sur des neurones corticaux en culture, le BDNF (pour *Brain-Derived-Neurotrophic-Factor*) induit une augmentation locale du nombre de branchements dendritiques (Horch et Katz, 2002). Au niveau musculaire de patients SLA, le stade initial de la maladie est caractérisé par une forte expression de BDNF alors que d'autres facteurs neurotrophiques comme le NGF (pour *Nerve-Growth-Factor*), NT-3 (pour *Neurotrophin-3*) et NT-4/5 voient leur expression augmenter avec la progression de la maladie (Kust *et al.*, 2002). Cette dernière étude suggère que dans la SLA les motoneurones sont exposés à des taux anormalement élevés de facteurs neurotrophiques en provenance de la périphérie.

Une autre explication pour la multiplication des points de branchements peut être fournie par les données obtenues sur le modèle transgénique de souris de SOD1-G93A montrant un ralentissement du transport axonal dès la période embryonnaire (Kieran *et al.*, 2005). Des défauts dans le transport axonal lent ont été également décrits dans les souris SOD1-G85R et SOD1-G37R plusieurs mois avant le début de la maladie (Williamson et Cleveland, 1999). Les marquages rétrogrades avec la rhodamine suggèrent que dans le modèle SOD1-

G85R le transport axonal est également ralenti pendant la période étudiée (P8-P9). En effet pour les préparations SOD1, le temps de migration de la rhodamine-dextran a été prolongé jusqu'à 12 heures (5 heures pour les WT) et le débit de la perfusion ainsi que la température du milieu ont été augmentées pour favoriser l'activité de la préparation dans le but de marquer massivement les pools de motoneurones du segment L5. Dans les modèles SOD1, le ralentissement du transport axonal, probablement en raison des interactions entre la dynéine et la protéine SOD1 mutée, est associé à une accumulation de neurofilaments (Williamson *et al.*, 1998; Williamson et Cleveland, 1999; Zhang *et al.*, 1997). Ces neurofilaments pourraient être utilisés pour la multiplication du nombre de segments dendritiques des motoneurones SOD1.

Une plus grande superficie peut être liée à une augmentation des contacts synaptiques sur les motoneurones SOD1 (Libersat et Duch, 2004). Une morphologie dendritique altérée peut également être due à un manque de stabilisation des synapses et un mécanisme d'élagage défectueux comme le suggèrent nos données. A partir de culture organo-typique de moelle, il a été proposé un dysfonctionnement synaptique subtil dans le modèle SOD1-G93A résultant d'un rapport sensiblement accru entre les synapses excitatrices et inhibitrices contactant les motoneurons SOD1 (Avossa *et al.*, 2006). Il est important de noter qu'une diminution du nombre de synapses inhibitrices a comme conséquence une augmentation du nombre de points de branchement des structures dendritiques (Huang *et al.*, 2007; Sanes et Chokshi, 1992; Sanes et Hafidi, 1996). Ainsi un déséquilibre entre les entrées excitatrices et inhibitrices pourrait être impliqué dans la multiplication des segments dendritiques des motoneurones SOD1.

La croissance dendritique des neurones dépend également de l'activation des récepteurs NMDA et AMPA (Kalb, 1994; Lee *et al.*, 2005; Prithviraj et Inglis, 2008; Prithviraj *et al.*, 2008). Le BDNF induit la translocation à la membrane de la sous-unité GluR1 dans les

neurones corticaux en culture (Nakata et Nakamura, 2007). Dans les dendrites de neurones moteurs, la surexpression de GluR1 a pour conséquence d'augmenter la complexité des branches dendritiques notamment en multipliant le nombre de synapses excitatrices (Prithviraj *et al.*, 2008). A un stade pré-symptomatique, les récepteurs AMPA des motoneurones de souris SOD1-G93A présentent une sur-expression de la sous-unité GluR1 et une diminution de l'expression de la sous-unité GluR2 (Zhao *et al.*, 2008). L'absence de GluR2 confère une perméabilité calcique aux canaux associés aux récepteurs AMPA (Sommer *et al.*, 1991). Une étude récente montre que plus les canaux associés aux récepteurs AMPA sont perméables au calcium, plus le nombre de segments dendritiques des neurones moteurs est grand avec, pour les neurones pour lesquels la perméabilité calcique est forte, une multiplication du nombre de points de branchement entre 100 et 200 μm autour du soma (Jeong *et al.*, 2006). Ce résultat est à considérer au regard de la morphologie des motoneurones SOD1 caractérisée par notre étude. Ces résultats sont en faveur de modifications des propriétés des récepteurs AMPA au cours de la période pré-symptomatique et nos données offrent la possibilité que de tels changements commencent dès la période postnatale.

DISCUSSION GENERALE

La SLA est une maladie qui commence avant l'expression du phénotype clinique, et les travaux sur les modèles animaux suggèrent une longue phase préclinique pendant laquelle la maladie bien qu'active n'est pas symptomatique. Dans ce travail, nous avons abordé les modifications précoces dans le modèle de souris SOD1-G85R. Nous avons déjà expliqué le choix de ces souris dans la partie sur les modèles transgéniques. En effet, les souris de ce modèle ne présentent pas la pathologie vacuolaire mitochondriale observée dans les modèles SOD1 dans lesquels le taux de protéine humaine est anormalement élevé (Bergemalm *et al.*, 2006). Nous venons de montrer successivement que les souris SOD1-G85R présentent dès la période postnatale des déficits moteurs, des dysfonctionnements des réseaux lombaires et des modifications des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones lombaires.

Atteinte des réseaux lombaires.

L'analyse comportementale montre que la mutation SOD1-G85R perturbe la maturation du système sensori-moteur des souris et ralentit l'expression des capacités motrices comme le montrent les retards pour les tests de retournement, de placement et d'agrippement des membres postérieurs (Chap. I). Ces retards pourraient principalement résulter d'un défaut de maturation des réseaux lombaires de la moelle épinière. Cette hypothèse est appuyée par les données qui montrent la difficulté d'activer les réseaux lombaires chez les souris SOD1 sur la préparation *in vitro* (Chap. II).

Pendant la période périnatale, il a été montré que la maturation de la moelle épinière s'effectue selon un gradient rostro-caudal lié à la maturation des projections des voies

descendantes des centres supérieurs (pour revue Vinay *et al.*, 2000b). Chez les rongeurs, les voies supra-spinales sérotoninergiques atteignent les segments lombaires entre la fin de la période embryonnaire et le début de la période postnatale (pour revue Vinay *et al.*, 2000b). Un défaut de projection de ces voies vers les segments lombaires serait compatible avec la dichotomie observée entre les membres antérieurs et postérieurs lors des tests de placement et d'agrippement et avec la difficulté d'activer les réseaux lombaires avec le NMA et la 5-HT sur la préparation *in vitro*.

La plus longue AHP des motoneurones lombaires SOD1 en 1^{ère} semaine post-natale est compatible avec un niveau plus faible de 5-HT. En effet il est montré que la 5-HT réduit la durée de l'AHP (Talley *et al.*, 1997; Wallen *et al.*, 1989). En rajoutant la dopamine au cocktail NMA-5HT, nous avons montré qu'il est possible d'induire des activités rythmiques alternées. Il a aussi été montré chez la lamproie que la DA est capable de réduire l'AHP (Kemnitz, 1997).

Toutefois nos données ne permettent pas d'affirmer un retard de maturation de ces voies. Par contre elles suggèrent un défaut de l'activation des récepteurs NMDA. En effet nos expériences concernant l'activité spontanée sans magnésium qui est plus faible dans les préparations SOD1, celles sur l'application directe de NMDA (Chap. II) ou encore le fait que des oscillations persistent lors des applications de D-APV pendant le blocage des transporteurs du glutamate (Chap. III) appuient cette hypothèse.

Modifications des propriétés électriques des motoneurones lombaires SOD1.

Cette étude est la première à caractériser des anomalies concernant les propriétés électriques des motoneurones lombaires des souris SOD1 pendant la période de développement. Ces anomalies résultent d'une évolution différente des propriétés

électriques qui amène les motoneurones SOD1 à devenir hypo-excitables en deuxième semaine postnatale (résistance d'entrée et gain plus faibles). Nous montrons que l'augmentation anormale de la surface membranaire des motoneurones SOD1 est une explication suffisante pour rendre compte de leur plus faible résistance d'entrée alors que la baisse du gain mesuré lors des relations Intensité-Fréquence indique plutôt des modifications de conductances ioniques qui restent à caractériser.

Nos résultats obtenus lors des stimulations en rampe montrent de manière indirecte que la conductance sodique persistante pourrait être plus importante dans les motoneurones SOD1. Il faut noter que les motoneurones spinaux SOD1-G93A mis en culture à partir du stade embryonnaire et postnatal développent une conductance sodique persistante plus puissante qui conduit à une hyperexcitabilité (Kuo *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2005). Ces études suggèrent que les motoneurones SOD1 possèdent dans leur génome les capacités de développer une hyperexcitabilité.

La chute de la résistance d'entrée et du gain des motoneurones SOD1 pourrait déjà être une adaptation diminuant l'excitabilité des motoneurones SOD1 et ainsi compenserait une trop forte stimulation au travers d'une conductance sodique persistante plus puissante. Ceci permettrait d'éviter une toxicité précoce induite par la sur-activation des motoneurones. La divergence avec nos résultats (hyperexcitabilité vs hypoexcitabilité) pourrait s'expliquer par les conditions de mises en culture qui ne permettent peut-être pas aux motoneurones de compenser.

Modifications morphologiques des motoneurones lombaires SOD1.

La sur-expression de la sous-unité GluR1 et la diminution de l'expression de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA des motoneurones de souris SOD1-G93A sont observées à un

stade pré-symptomatique (Zhao *et al.*, 2008). Cette modification des récepteurs AMPA, en modulant la perméabilité calcique, pourrait expliquer les modifications morphologiques des motoneurones SOD1 montrées par notre travail (Chap. V). Cela suggère que ce mécanisme décrit à un stade pré-symptomatique plus avancé pourrait déjà s'exprimer dès la période post-natale.

Enfin, les diamètres du corps cellulaire et des dendrites primaires sont équivalents entre les motoneurones des deux lignées alors que les dendrites des motoneurones SOD1 sont hyper développées. Cette observation laisse émerger la possibilité que les motoneurones puissent dès cette période dépenser plus d'énergie pour développer des arborisations dendritiques exubérantes. Il est important de rappeler dans ce contexte, les états d'hyper-métabolisme et d'augmentation de dépenses énergétiques retrouvés à la fois dans des modèles SOD1 et les patients SLA (Dupuis *et al.*, 2004; Gonzalez de Aguilar *et al.*, 2005).

Les anomalies observées semblent être spécifiques de la maladie

L'atteinte motoneuronale observée pendant la SLA montre des exceptions et quelques noyaux moteurs sont relativement épargnés par la maladie comme les noyaux extra-oculaires et le noyau d'Onuf (pour revue Bruijn *et al.*, 2004). Une telle spécificité, observée chez les patients humains, est également présente dans le modèle de souris, où le noyau moteur équivalent au noyau d'Onuf chez l'homme est épargné et les fonctions des muscles périnéaux préservées (Hamson *et al.*, 2002). Nos données fournissent d'autres indications d'une telle spécificité chez la souris SOD1-G85R. Par exemple par le fait que l'activation rythmique des réseaux spinaux est altérée au niveau lombaire mais reste inchangée dans les segments sacrés dont les motoneurones ne dégènèrent pas à l'âge adulte. Nous avons aussi constaté que, bien que les propriétés électriques des motoneurones lombaires montrent des anomalies, les interneurones ont des propriétés électriques comparables entre les deux

lignées. Cela renforce l'idée que dès le plus jeune âge les motoneurones sont la cible privilégiée des mécanismes physiopathologiques de la SLA.

Conséquences pathologiques des anomalies post-natales.

La différenciation des propriétés contractiles des fibres musculaires est effective pour la majorité des muscles des membres postérieurs à P11-P12 chez le rat (Ishihara et Taguchi, 1991; Picquet *et al.*, 1997), et à la fin de la 3^{ème} semaine postnatale les patrons d'activité des muscles sont similaires à ceux observés à l'âge adulte (Vrbova *et al.*, 1985). Le développement simultané des propriétés des motoneurones et des fibres musculaires mène graduellement à la correspondance observée à l'âge adulte entre les propriétés de ces deux composants de l'unité motrice (Navarrette et Vrbova, 1993; Vrbova *et al.*, 1985).

Pendant la période postnatale où la poly-innervation des fibres est encore abondante (Brown *et al.*, 1976; Buffelli *et al.*, 2002), une modification de l'excitabilité des motoneurones pourrait perturber cet équilibre et avoir des conséquences sur la différenciation du phénotype des fibres et sur la stabilisation des jonctions neuro-musculaires et ainsi fragiliser ces synapses qui sont une cible privilégiée de la SLA.

En conclusion, les motoneurones lombaires des souris SOD1-G85R se développent anormalement et deviennent hypoexcitables pendant la deuxième semaine postnatale au moment où les souris commencent à soutenir leur poids et à marcher. La dénervation périphérique a récemment été proposée comme un processus pathologique prédominant et précoce de la maladie dans les modèles SLA (Gould *et al.*, 2006). Cependant, ces auteurs n'excluent pas la possibilité que la dénervation possède une origine centrale. Ici, nous prouvons que des dysfonctionnements des motoneurones apparaissent longtemps avant la dégénérescence axonale.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A - B.

- Abel EL. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis. *Percept Mot Skills* 104:1251-1254. (2007)
- Abhinav K, Al-Chalabi A, Hortobagyi T, Leigh PN. Electrical injury and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:450-453. (2007)
- Adams CR, Ziegler DK, Lin JT. Mercury intoxication simulating amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA* 250:642-643. (1983)
- Alaburda A, Perrier JF, Hounsgaard J. An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540:875-881. (2002)
- Albo F, Pieri M, Zona C. Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J Neurosci Res* 78:200-207. (2004)
- Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6:37-46. (2006)
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927. (2004)
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810. (2004)
- Attarian S, Vedel JP, Pouget J, Schmied A. Cortical versus spinal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 33:677-690. (2006)
- Attarian S, Vedel JP, Pouget J, Schmied A. Progression of cortical and spinal dysfunctions over time in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 37:364-375. (2008)
- Avossa D, Grandolfo M, Mazzarol F, Zatta M, Ballerini L. Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: Characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience* 138:1179-1194. (2006)
- Bailey-Wilson JE, Plato CC, Elston RC, Garruto RM. Potential role of an additive genetic component in the cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the western Pacific. *Am J Med Genet* 45:68-76. (1993)
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584. (1993)

- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Rattray M, Mennini T. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* 79:737-746. (2001)
- Bennett DJ, Li Y, Siu M. Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *J Neurophysiol* 86:1955-1971. (2001)
- Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Rehnmark A, Marklund SL. Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neurosci* 26:4147-4154. (2006)
- Bertrand S, Cazalets JR. The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* 16:1741-1750. (2002)
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59. (2006a)
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392. (2006b)
- Bonnot A, Morin D. Hemisegmental localisation of rhythmic networks in the lumbosacral spinal cord of neonate mouse. *Brain Res* 793:136-148. (1998)
- Bonnot A, Morin D, Viala D. Organization of rhythmic motor patterns in the lumbosacral spinal cord of neonate mouse. *Ann N Y Acad Sci* 860:432-435. (1998)
- Bonnot A, Whelan PJ, Mentis GZ, O'Donovan MJ. Locomotor-like activity generated by the neonatal mouse spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev* 40:141-151. (2002)
- Brocard F, Vinay L, Clarac F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 117:81-89. (1999)
- Brown MC, Jansen JK, Van Essen D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J Physiol* 261:387-422. (1976)
- Brown RH, Jr., Meininger V, Swash M. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Martin Dunitz Ltd, London*. (2001)
- Brown WF, Doherty TJ, Chan M, Andres A, Provost SM. Human motor units in health and disease. *Muscle Nerve Suppl* 9:S7-18. (2000)
- Brownstone RM. Beginning at the end: repetitive firing properties in the final common pathway. *Prog Neurobiol* 78:156-172. (2006)

- Brownstone RM, Wilson JM. Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis. *Brain Res Rev* 57:64-76. (2008)
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-338. (1997)
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854. (1998)
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-749. (2004)
- Buffelli M, Busetto G, Cangiano L, Cangiano A. Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13200-13205. (2002)
- Burke RE. Motor units in cat muscles: anatomical considerations in relation to motor unit types. *Adv Neurol* 36:31-45. (1982)
- Burke RE, Strick PL, Kanda K, Kim CC, Walmsley B. Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J Neurophysiol* 40:667-680. (1977)
- Button DC, Gardiner K, Marqueste T, Gardiner PF. Frequency-current relationships of rat hindlimb alpha-motoneurons. *J Physiol* 573:663-677. (2006)

C -D.

- Cajal S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. *Madrid*, 978 pp. (1952)
- Cameron WE, He F, Kalipatnapu P, Jodkowski JS, Guthrie RD. Morphometric analysis of phrenic motoneurons in the cat during postnatal development. *J Comp Neurol* 314:763-776. (1991a)
- Cameron WE, Jodkowski JS, Fang H, Guthrie RD. Electrophysiological properties of developing phrenic motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* 65:671-679. (1991b)
- Canton T, Pratt J, Stutzmann JM, Imperato A, Boireau A. Glutamate uptake is decreased tardively in the spinal cord of FALS mice. *Neuroreport* 9:775-778. (1998)
- Carlin KP, Liu J, Jordan LM. Postnatal changes in the inactivation properties of voltage-gated sodium channels contribute to the mature firing pattern of spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 99:2864-2876. (2008)

- Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Cameron WE, Torres B, Nunez-Abades PA. Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Res Brain Res Rev* 49:377-387. (2005)
- Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Nunez-Abades P, Torres B. Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience* 140:1223-1237. (2006)
- Cattani AA, Bonfardin VD, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Generation of slow network oscillations in the developing rat hippocampus after blockade of glutamate uptake. *J Neurophysiol* 98:2324-2336. (2007)
- Cazalets JR, Borde M, Clarac F. Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* 15:4943-4951. (1995)
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* 19:10813-10828. (1999)
- Charcot JM. Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière chez une femme hystérique, atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 24-35. (1865)
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128:472-476. (2005)
- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6:349-362. (1995)
- Chung J, Yang H, de Beus MD, Ryu CY, Cho K, Colon W. Cu/Zn superoxide dismutase can form pore-like structures. *Biochem Biophys Res Commun* 312:873-876. (2003)
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117. (2003)
- Cleveland DW, Liu J. Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat Med* 6:1320-1321. (2000)
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819. (2001)
- Collard JF, Cote F, Julien JP. Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 375:61-64. (1995)

- Corcia P, Jafari-Schluep HF, Lardillier D, Mazyad H, Giraud P, Clavelou P, Pouget J, Camu W. A clustering of conjugal amyotrophic lateral sclerosis in southeastern France. *Arch Neurol* 60:553-557. (2003)
- Corrado L, D'Alfonso S, Bergamaschi L, Testa L, Leone M, Nasuelli N, Momigliano-Richiardi P, Mazzini L. SOD1 gene mutations in Italian patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Neuromuscul Disord* 16:800-804. (2006)
- Cote F, Collard JF, Julien JP. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73:35-46. (1993)
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341:265-268. (1993)
- Couratier P, Sindou P, Esclaire F, Louvel E, Hugon J. Neuroprotective effects of riluzole in ALS CSF toxicity. *Neuroreport* 5:1012-1014. (1994)
- Cox PA, Sacks OW. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58:956-959. (2002)
- Cruz DC, Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT, Jr. Physical trauma and family history of neurodegenerative diseases in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Neuroepidemiology* 18:101-110. (1999)
- Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145:1271-1279. (1994)
- Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676:25-40. (1995)
- Dal Canto MC, Gurney ME. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 93:537-550. (1997)
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105. (2001)
- Dekkers J, Becker DL, Cook JE, Navarrete R. Early postnatal changes in the somatodendritic morphology of ankle flexor motoneurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6:87-97. (1994)
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P. NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586:1059-1075. (2008)

- Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 24:3289-3294. (2004)
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051. (1993)
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614. (2007)
- Dierssen M, Fotaki V, Martinez de Lagran M, Gratacos M, Arbones M, Fillat C, Estivill X. Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacol Biochem Behav* 73:19-25. (2002)
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* 168:193-199. (2005)
- Dunlop J, Beal McIlvain H, She Y, Howland DS. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23:1688-1696. (2003)
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Pradat PF, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS, Meininger V, Loeffler JP. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10:358-365. (2002)
- Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11159-11164. (2004)
- Dziewulska D, Jamrozik Z, Podlecka A, Rafalowska J. Do astrocytes participate in rat spinal cord myelination? *Folia Neuropathol* 37:81-86. (1999)

E - H.

- Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, Reiter C, Zhuang Y, Richardson GJ, Tarpey MM, Barbeito L, Beckman JS. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286:2498-2500. (1999)
- Ezzi SA, Urushitani M, Julien JP. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem* 102:170-178. (2007)

- Fanara P, Banerjee J, Hueck RV, Harper MR, Awada M, Turner H, Husted KH, Brandt R, Hellerstein MK. Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 282:23465-23472. (2007)
- Ferri A, Nencini M, Casciati A, Cozzolino M, Angelini DF, Longone P, Spalloni A, Rotilio G, Carri MT. Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells. *FASEB J* 18:1261-1263. (2004)
- Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 13:234-241. (1965)
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20:2534-2542. (2000)
- Fukada K, Nagano S, Satoh M, Tohyama C, Nakanishi T, Shimizu A, Yanagihara T, Sakoda S. Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur J Neurosci* 14:2032-2036. (2001)
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M. NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci* 21:1432-1436. (2005)
- Fulton BP, Walton K. Electrophysiological properties of neonatal rat motoneurons studied in vitro. *J Physiol* 370:651-678. (1986)
- Gao BX, Ziskind-Conhaim L. Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 80:3047-3061. (1998)
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20:660-665. (2000)
- Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, Oudart H, Loeffler JP. The metabolic hypothesis in amyotrophic lateral sclerosis: insights from mutant Cu/Zn-superoxide dismutase mice. *Biomed Pharmacother* 59:190-196. (2005)
- Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Fergani A, Rene F, Meininger V, Loeffler JP, Dupuis L. Amyotrophic lateral sclerosis: all roads lead to Rome. *J Neurochem* 101:1153-1160. (2007)
- Gordon IT, Dunbar MJ, Vanneste KJ, Whelan PJ. Interaction between developing spinal locomotor networks in the neonatal mouse. *J Neurophysiol* 100:117-128. (2008)
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774-8786. (2006)

- Greer JJ, Funk GD. Perinatal development of respiratory motoneurons. *Respir Physiol Neurobiol* 149:43-61. (2005)
- Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:956-972. (2006)
- Gruzman A, Wood WL, Alpert E, Prasad MD, Miller RG, Rothstein JD, Bowser R, Hamilton R, Wood TD, Cleveland DW, Lingappa VR, Liu J. Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12524-12529. (2007)
- Gurney ME. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci* 152 Suppl 1:S67-73. (1997)
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775. (1994)
- Haenggeli C, Kato AC. Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* 335:39-43. (2002)
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300:808-812. (2003)
- Haley RW. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 61:750-756. (2003)
- Hamson DK, Hu JH, Krieger C, Watson NV. Lumbar motoneuron fate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 13:2291-2294. (2002)
- Hanson MG, Landmesser LT. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23:587-600. (2003)
- Harras MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, Engelhardt JF. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118:659-670. (2008)
- He Y, Francis F, Myers KA, Yu W, Black MM, Baas PW. Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *J Cell Biol* 168:697-703. (2005)

- Heckman CJ, Hyingstrom AS, Johnson MD. Active properties of motoneurone dendrites: diffuse descending neuromodulation, focused local inhibition. *J Physiol* 586:1225-1231. (2008a)
- Heckman CJ, Johnson M, Mottram C, Schuster J. Persistent inward currents in spinal motoneurons and their influence on human motoneuron firing patterns. *Neuroscientist* 14:264-275. (2008b)
- Heckmann CJ, Gorassini MA, Bennett DJ. Persistent inward currents in motoneuron dendrites: implications for motor output. *Muscle Nerve* 31:135-156. (2005)
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28:154-164. (2007)
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 586:3337-3351. (2008)
- Hinckley CA, Hartley R, Wu L, Todd A, Ziskind-Conhaim L. Locomotor-like rhythms in a genetically distinct cluster of interneurons in the mammalian spinal cord. *J Neurophysiol* 93:1439-1449. Epub 2004 Oct 1420. (2005)
- Horch HW, Katz LC. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5:1177-1184. (2002)
- Horcholle-Bossavit G, Jami L, Thiesson D, Zytnicki D. Postnatal development of peroneal motoneurons in the kitten. *Brain Res Dev Brain Res* 54:205-215. (1990)
- Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y, Mitsumoto H, Pascuzzi R, Spencer PS, Tim R, Howard D, Smith TC, Ryan MA, Coffman CJ, Kasarskis EJ. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 61:742-749. (2003)
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609. (2002)
- Huang LC, Thorne PR, Housley GD, Montgomery JM. Spatiotemporal definition of neurite outgrowth, refinement and retraction in the developing mouse cochlea. *Development* 134:2925-2933. (2007)
- Hyingstrom AS, Johnson MD, Miller JF, Heckman CJ. Intrinsic electrical properties of spinal motoneurons vary with joint angle. *Nat Neurosci* 10:363-369. (2007)

I - K.

- Ilieva HS, Yamanaka K, Malkmus S, Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, Cleveland DW. Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12599-12604. (2008)
- Ishihara A, Taguchi S. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. *Jpn J Physiol* 41:251-258. (1991)
- Jaarsma D. Swelling and vacuolisation of mitochondria in transgenic SOD1-ALS mice: a consequence of supranormal SOD1 expression? *Mitochondrion* 6:48-49; author reply 50-41. (2006)
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7:623-643. (2000)
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28:2075-2088. (2008)
- Jackson M, Al-Chalabi A, Enayat ZE, Chioza B, Leigh PN, Morrison KE. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation. *Ann Neurol* 42:803-807. (1997)
- Jan YN, Jan LY. The control of dendrite development. *Neuron* 40:229-242. (2003)
- Jehle T, Bauer J, Blauth E, Hummel A, Darstein M, Freiman TM, Feuerstein TJ. Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 130:1227-1234. (2000)
- Jeong GB, Werner M, Gazula VR, Itoh T, Roberts M, David S, Pfister B, Cohen A, Neve RL, Hollmann M, Kalb R. Bi-directional control of motor neuron dendrite remodeling by the calcium permeability of AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci* 32:299-314. (2006)
- Jiang Z, Carlin KP, Brownstone RM. An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Res* 816:493-499. (1999a)
- Jiang Z, Rempel J, Li J, Sawchuk MA, Carlin KP, Brownstone RM. Development of L-type calcium channels and a nifedipine-sensitive motor activity in the postnatal mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 11:3481-3487. (1999b)

- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12571-12576. (2000)
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler JP. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7:1162-1167. (2006)
- Jonsson PA, Graffmo KS, Brannstrom T, Nilsson P, Andersen PM, Marklund SL. Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1126-1136. (2006)
- Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T, Pearson KG. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res Rev* 57:183-191. (2008)
- Julien JP. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581-591. (2001)
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Rouleau GA. Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Ann Neurol* 62:553-559. (2007)
- Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* 23:1311-1315. (2002)
- Kalb RG. Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120:3063-3071. (1994)
- Kalb RG, Lidow MS, Halsted MJ, Hockfield S. N-methyl-D-aspartate receptors are transiently expressed in the developing spinal cord ventral horn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8502-8506. (1992)
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427:801. (2004)
- Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85:680-689. (2003)
- Kemnitz CP. Dopaminergic modulation of spinal neurons and synaptic potentials in the lamprey spinal cord. *J Neurophysiol* 77:289-298. (1997)
- Kernell D, Zwaagstra B. Dendrites of cat's spinal motoneurons: relationship between stem diameter and predicted input conductance. *J Physiol* 413:255-269. (1989)
- Kiehn O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306. (2006)

- Kiehn O, Quinlan KA, Restrepo CE, Lundfald L, Borgius L, Talpalar AE, Endo T. Excitatory components of the mammalian locomotor CPG. *Brain Res Rev* 57:56-63. (2008)
- Kiehn O, Tresch MC. Gap junctions and motor behavior. *Trends Neurosci* 25:108-115. (2002)
- Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol* 169:561-567. (2005)
- Kong J, Xu Z. Peripheral axotomy slows motoneuron degeneration in a transgenic mouse line expressing mutant SOD1 G93A. *J Comp Neurol* 412:373-380. (1999)
- Kremer E, Lev-Tov A. Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol.* 77:1155. (1997)
- Kullander K, Butt SJ, Le Bret JM, Lundfald L, Restrepo CE, Rydstrom A, Klein R, Kiehn O. Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* 299:1889-1892. (2003)
- Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaja V, Muller G, Hartmann B, Tschauer K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, Turski L. Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5826-5831. (2005)
- Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet* 15:91-94. (1997)
- Kuo JJ, Lee RH, Zhang L, Heckman CJ. Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *J Physiol* 574:819-834. (2006)
- Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bar PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese AB. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* 91:571-575. (2004)
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843-854. (2005)
- Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci* 11:51-54. (1988)
- Kust BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 177:419-427. (2002)

L – O.

- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34:715-727. (2002)
- Le Roy I, Carlier M, Roubertoux PL. Sensory and motor development in mice: genes, environment and their interactions. *Behav Brain Res* 125:57-64. (2001)
- Le Roy I, Perez-Diaz F, Cherfouh A, Roubertoux PL. Preweanling sensorial and motor development in laboratory mice: quantitative trait loci mapping. *Dev Psychobiol* 34:139-158. (1999)
- Le Roy I, Roubertoux PL, Jamot L, Maarouf F, Tordjman S, Mortaud S, Blanchard C, Martin B, Guillot PV, Duquenne V. Neuronal and behavioral differences between *Mus musculus domesticus* (C57BL/6JBy) and *Mus musculus castaneus* (CAST/Ei). *Behav Brain Res* 95:135-142. (1998)
- Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS. NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J Neurosci* 25:2304-2311. (2005)
- Lee RH, Heckman CJ. Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *J Neurophysiol* 85:472-475. (2001)
- Leigh PN, Swash M. motor neuron disease, biology and management. *Springer-Verlag Ltd*: 468 pp. (1995)
- Lev-Tov A, Delvolve I. Pattern generation in non-limb moving segments of the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull* 53:671-675. (2000)
- Li Y, Bennett DJ. Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 90:857-869. (2003)
- Li Y, Brewer D, Burke RE, Ascoli GA. Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J Comp Neurol* 483:304-317. (2005)
- Li Y, Burke RE. Short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord: effects of calcium and temperature. *J Neurophysiol* 85:2047-2062. (2001)
- Libersat F, Duch C. Mechanisms of dendritic maturation. *Mol Neurobiol* 29:303-320. (2004)
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602. (1998)

- Lin MC, Kagan BL. Electrophysiologic properties of channels induced by Abeta25-35 in planar lipid bilayers. *Peptides* 23:1215-1228. (2002)
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825-4832. (2002)
- Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y, van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol* 55:201-206. (1998)
- Majoor-Krakauer D, Mulder PG, Rowland LP, Ottman R. A link between ALS and short residence on Guam. *Neurology* 64:1819-1820. (2005)
- McDermott CJ, Shaw PJ. Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* 336:658-662. (2008)
- McEwen ML, Van Hartesveldt C, Stehouwer DJ. A kinematic comparison of L-DOPA-induced air-stepping and swimming in developing rats. *Dev Psychobiol* 30:313-327. (1997)
- McGeer PL, Schwab C, McGeer EG, Haddock RL, Steele JC. Familial nature and continuing morbidity of the amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. *Neurology* 49:400-409. (1997)
- McHanwell S, Biscoe TJ. The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293:477-508. (1981)
- McLarnon JG. Potassium currents in motoneurons. *Prog Neurobiol* 47:513-531. (1995)
- McMullen NT, Glaser EM, Tagamets M. Morphometry of spine-free nonpyramidal neurons in rabbit auditory cortex. *J Comp Neurol* 222:383-395. (1984)
- Mears SC, Frank E. Formation of specific monosynaptic connections between muscle spindle afferents and motoneurons in the mouse. *J Neurosci* 17:3128-3135. (1997)
- Mentis GZ, Diaz E, Moran LB, Navarrete R. Early alterations in the electrophysiological properties of rat spinal motoneurons following neonatal axotomy. *J Physiol* 582:1141-1161. (2007)
- Miles GB, Dai Y, Brownstone RM. Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566:519-532. (2005)
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19546-19551. (2006)
- Mirnic K, Koerber HR. Properties of individual embryonic primary afferents and their spinal projections in the rat. *J Neurophysiol* 78:1590-1600. (1997)

- Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC. Selective loss of alpha motoneurons innervating the medial gastrocnemius muscle in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 150:329-336. (1998)
- Moritani M, Kida H, Nagase Y, Fukami H, Honma S, Takemura M, Masuda Y, Bae YC, Shigenaga Y, Yoshida A. Quantitative analysis of the dendritic architectures of single jaw-closing and jaw-opening motoneurons in cats. *Exp Brain Res* 150:265-275. (2003)
- Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5472-5477. (1996)
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Jr., Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 21:9246-9254. (2001)
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615-622. (2007)
- Nakata H, Nakamura S. Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Lett* 581:2047-2054. (2007)
- Navarrette R, Vrbova G. Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: their role in the development of the motor unit. *Prog Neurobiol* 41:93-124. (1993)
- Nieto-Gonzalez JL, Carrascal L, Nunez-Abades P, Torres B. Phasic and tonic firing properties in rat oculomotor nucleus motoneurons, studied in vitro. *Eur J Neurosci* 25:2682-2696. (2007)
- Nunez-Abades PA, Cameron WE. Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: relative changes in diameter and surface area of somata and dendrites. *J Comp Neurol* 353:129-142. (1995)
- Nunez-Abades PA, He F, Barrionuevo G, Cameron WE. Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: changes in length, branching pattern, and spatial distribution of dendrites. *J Comp Neurol* 339:401-420. (1994)
- Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 227:609-611. (1970)

P.

- Pearlstein E, Mabrouk FB, Pflieger JF, Vinay L. Serotonin refines the locomotor-related alternations in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 21:1338-1346. (2005)
- Picquet F, Stevens L, Butler-Browne GS, Mounier Y. Contractile properties and myosin heavy chain composition of newborn rat soleus muscles at different stages of postnatal development. *J Muscle Res Cell Motil* 18:71-79. (1997)
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C. Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351:153-156. (2003a)
- Pieri M, Gaetti C, Spalloni A, Cavalcanti S, Mercuri N, Bernardi G, Longone P, Zona C. alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate receptors in spinal cord motor neurons are altered in transgenic mice overexpressing human Cu,Zn superoxide dismutase (Gly93-->Ala) mutation. *Neuroscience* 122:47-58. (2003b)
- Plaitakis A. Altered glutamatergic mechanisms and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: possible role of glycine. *Adv Neurol* 56:319-326. (1991)
- Plaitakis A, Caroscio JT. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 22:575-579. (1987)
- Pouget J. [Electroneuromyographic criteria of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 162 Spec No 2:4S34-34S42. (2006)
- Pouget J, Trefouret S, Attarian S. Transcranial magnetic stimulation (TMS): compared sensitivity of different motor response parameters in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1 Suppl 2:S45-49. (2000)
- Powers RK, Binder MD. Persistent sodium and calcium currents in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 89:615-624. (2003)
- Pradat PF, Bruneteau G. [Classical and atypical clinical features in amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 162 Spec No 2:4S17-14S24. (2006a)
- Pradat PF, Bruneteau G. [Clinical characteristics of amyotrophic lateral sclerosis subsets]. *Rev Neurol (Paris)* 162 Spec No 2:4S29-24S33. (2006b)
- Pradat PF, Bruneteau G, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, Jokic N, Salachas F, Le Forestier N, Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Hauw JJ, Tranchant C, Loeffler JP, Meininger V. Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* 62:15-20. (2007)

- Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-3374. (2001)
- Prithviraj R, Inglis FM. Expression of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR3B regulates dendrite morphogenesis in spinal motor neurons. *Neuroscience* 155:145-153. (2008)
- Prithviraj R, Kelly KM, Espinoza-Lewis R, Hexom T, Clark AB, Inglis FM. Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol* 68:247-264. (2008)
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408-419. (2006)
- Puttaparthi K, Wojcik C, Rajendran B, DeMartino GN, Elliott JL. Aggregate formation in the spinal cord of mutant SOD1 transgenic mice is reversible and mediated by proteasomes. *J Neurochem* 87:851-860. (2003)

R - S.

- Rachele MG, Mascia V, Tacconi P, Dessi N, Marrosu F, Giagheddu M. Conjugal amyotrophic lateral sclerosis: a report on a couple from Sardinia, Italy. *Ital J Neurol Sci* 19:97-100. (1998)
- Rakhit R, Crow JP, Lepock JR, Kondejewski LH, Cashman NR, Chakrabartty A. Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279:15499-15504. (2004)
- Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi XF, Crow JP, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277:47551-47556. (2002)
- Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabartty A. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* 13:754-759. (2007)
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-1083. (2002)
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD. Motor neurons in

- Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47. (1996)
- Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G, Anfinsen S. Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol* 131:239-250. (1995)
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:689-693. (1995)
- Rivera-Arconada I, Lopez-Garcia JA. Effects of M-current modulators on the excitability of immature rat spinal sensory and motor neurones. *Eur J Neurosci* 22:3091-3098. (2005)
- Roelofs-Iverson RA, Mulder DW, Elveback LR, Kurland LT, Molgaard CA. ALS and heavy metals: a pilot case-control study. *Neurology* 34:393-395. (1984)
- Rose MR. Gulf War service is an uncertain trigger for ALS. *Neurology* 61:730-731. (2003)
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62. (1993)
- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6591-6595. (1993)
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-1468. (1992)
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77. (2005)
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25. (1990)
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84. (1995)
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Cherif C, Marican C, Arrechi P, Godin F, Jamon M, Verrier B, Cohen-Salmon C. Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 35:65-69. (2003)

- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688-1700. (2001)
- Roy J, Minotti S, Dong L, Figlewicz DA, Durham HD. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 18:9673-9684. (1998)
- Sah P. Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19:150-154. (1996)
- Sanes DH, Chokshi P. Glycinergic transmission influences the development of dendrite shape. *Neuroreport* 3:323-326. (1992)
- Sanes DH, Hafidi A. Glycinergic transmission regulates dendrite size in organotypic culture. *J Neurobiol* 31:503-511. (1996)
- Sasaki S, Ohsawa Y, Yamane K, Sakuma H, Shibata N, Nakano R, Kikugawa K, Mizutani T, Tsuji S, Iwata M. Familial amyotrophic lateral sclerosis with widespread vacuolation and hyaline inclusions. *Neurology* 51:871-873. (1998)
- Sasaki S, Warita H, Komori T, Murakami T, Abe K, Iwata M. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res* 1083:196-203. (2006)
- Scarmeas N, Shih T, Stern Y, Ottman R, Rowland LP. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* 59:773-775. (2002)
- Schmied A, Pouget J, Vedel JP. Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 110:960-974. (1999)
- Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:118-124. (2004)
- Seebach BS, Mendell LM. Maturation in properties of motoneurons and their segmental input in the neonatal rat. *J Neurophysiol* 76:3875-3885. (1996)
- Seebach BS, Ziskind-Conhaim L. Formation of transient inappropriate sensorimotor synapses in developing rat spinal cords. *J Neurosci* 14:4520-4528. (1994)
- Serradj N, Jamon M. Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j. *Behav Brain Res* 177:80-89. (2007)
- Sharifullina E, Nistri A. Glutamate uptake block triggers deadly rhythmic bursting of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Physiol* 572:407-423. (2006)
- Shaw BF, Valentine JS. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 32:78-85. (2007)

- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Upton-Rice M, Brown RH, Jr. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53:1239-1246. (1999)
- Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* 18:492-498. (1996)
- Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, Nakajima T. DL-threo-beta-benzoyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 53:195-201. (1998)
- Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406. (1953)
- Simon M, Destombes J, Horcholle-Bossavit G, Thiesson D. Postnatal development of alpha- and gamma-peroneal motoneurons in kittens: an ultrastructural study. *Neurosci Res* 25:77-89. (1996)
- Simpson CL, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim Biophys Acta* 1762:973-985. (2006)
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19. (1991)
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237:517-522. (1987)
- Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ. Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Res Bull* 53:547-552. (2000)
- Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Atkin JD, Cheema SS, Hannan AJ. Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 28:717-723. (2008)
- Stegenga SL, Kalb RG. Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kainate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord. *Neuroscience* 105:499-507. (2001)
- Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 177:114-123. (2000)
- Swash M, Desai J. Motor neuron disease: classification and nomenclature. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:105-112. (2000)

T - V.

- Talley EM, Sadr NN, Bayliss DA. Postnatal development of serotonergic innervation, 5-HT_{1A} receptor expression, and 5-HT responses in rat motoneurons. *J Neurosci* 17:4473-4485. (1997)
- Tanaka T. Effects of litter size on behavioral development in mice. *Reprod Toxicol* 12:613-617. (1998)
- Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H, Takahashi R. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13:2183-2196. (2004)
- Tazerart S, Viemari JC, Darbon P, Vinay L, Brocard F. Contribution of persistent sodium current to locomotor pattern generation in neonatal rats. *J Neurophysiol* 98:613-628. (2007)
- Tazerart S, Vinay L, Brocard F. The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci* 28:8577-8589. (2008)
- Torikai H, Hayashi F, Tanaka K, Chiba T, Fukuda Y, Moriya H. Recruitment order and dendritic morphology of rat phrenic motoneurons. *J Comp Neurol* 366:231-243. (1996)
- Tremml P, Lipp HP, Muller U, Ricceri L, Wolfer DP. Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res* 95:65-76. (1998)
- Trotti D, Aoki M, Pasinelli P, Berger UV, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem* 276:576-582. (2001)
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:848. (1999)
- Tu PH, Raju P, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VM. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3155-3160. (1996)
- Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85:94-134. (2008)

- Ulfhake B, Cullheim S. Postnatal development of cat hind limb motoneurons. III: Changes in size of motoneurons supplying the triceps surae muscle. *J Comp Neurol* 278:103-120. (1988)
- Ulfhake B, Cullheim S, Franson P. Postnatal development of cat hind limb motoneurons. I: Changes in length, branching structure, and spatial distribution of dendrites of cat triceps surae motoneurons. *J Comp Neurol* 278:69-87. (1988)
- Ulfhake B, Kellerth JO. Does alpha-motoneurone size correlate with motor unit type in cat triceps surae? *Brain Res* 251:201-209. (1982)
- Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3617-3622. (2003)
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K, Timmerman V, Herijgers P, Callewaert G, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14825-14830. (2007)
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1068-1082. (2006)
- Vanner SJ, Rose PK. Dendritic distribution of motoneurons innervating the three heads of the trapezius muscle in the cat. *J Comp Neurol* 226:96-110. (1984)
- Venerosi A, Valanzano A, Alleva E, Calamandrei G. Prenatal exposure to anti-HIV drugs: neurobehavioral effects of zidovudine (AZT) + lamivudine (3TC) treatment in mice. *Teratology* 63:26-37. (2001)
- Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, Ferrero I, Mazzini L, Madon E, Fagioli F. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 31:395-405. (2008)
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 69:2150-2163. (1993)
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience* 59:131-148. (1994)
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Repetitive firing properties of developing rat brainstem motoneurons. *J Physiol* 486 (Pt 3):745-761. (1995)
- Vinay L, Brocard F, Clarac F. Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 12:4562-4566. (2000a)

- Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel JC, Pearlstein E, Pflieger JF. Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res Brain Res Rev* 40:118-129. (2002)
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53:635-647. (2000b)
- Vrbova G, Navarrete R, Lowrie M. Matching of muscle properties and motoneurone firing patterns during early stages of development. *J Exp Biol* 115:113-123. (1985)
- Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131:1540-1550. (2008)

W - Z.

- Wakayama I, Nerurkar VR, Strong MJ, Garruto RM. Comparative study of chronic aluminum-induced neurofilamentous aggregates with intracytoplasmic inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 92:545-554. (1996)
- Wallen P, Buchanan JT, Grillner S, Hill RH, Christenson J, Hokfelt T. Effects of 5-hydroxytryptamine on the afterhyperpolarization, spike frequency regulation, and oscillatory membrane properties in lamprey spinal cord neurons. *J Neurophysiol* 61:759-768. (1989)
- Walton KD, Navarrete R. Postnatal changes in motoneurone electrotonic coupling studied in the in vitro rat lumbar spinal cord. *J Physiol* 433:283-305. (1991)
- Wang HS, McKinnon D. Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurones: control of firing properties. *J Physiol* 485 (Pt 2):319-335. (1995)
- Wang J, Slunt H, Gonzales V, Fromholt D, Coonfield M, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet* 12:2753-2764. (2003)
- Wang J, Xu G, Borchelt DR. High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol Dis* 9:139-148. (2002)
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8:933-941. (2001)
- Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 57:163-174. (1990)

- Westerga J, Gramsbergen A. Structural changes of the soleus and the tibialis anterior motoneuron pool during development in the rat. *J Comp Neurol* 319:406-416. (1992)
- Whelan P, Bonnot A, O'Donovan MJ. Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J Neurophysiol* 84:2821-2833. (2000)
- Whelan PJ. Developmental aspects of spinal locomotor function: insights from using the in vitro mouse spinal cord preparation. *J Physiol* 553:695-706. (2003)
- Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271:515-518. (1996)
- Williamson TL, Bruijn LI, Zhu Q, Anderson KL, Anderson SD, Julien JP, Cleveland DW. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9631-9636. (1998)
- Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2:50-56. (1999)
- Wilson JM, Hartley R, Maxwell DJ, Todd AJ, Lieberam I, Kaltschmidt JA, Yoshida Y, Jessell TM, Brownstone RM. Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein. *J Neurosci* 25:5710-5719. (2005)
- Wong PC, Borchelt DR. Motor neuron disease caused by mutations in superoxide dismutase 1. *Curr Opin Neurol* 8:294-301. (1995)
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105-1116. (1995)
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32:43-50. (2005)
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253. (2008)
- Zang DW, Cheema SS. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 332:99-102. (2002)

- Zengel JE, Reid SA, Sybert GW, Munson JB. Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* 53:1323-1344. (1985)
- Zetterström P, Stewart H, Bergemalm D, Jonsson P, Graffmo K, Andersen P, Brännström T, Oliveberg M, Marklund S. Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14157-14162. (2007)
- Zetterstrom P, Stewart HG, Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Oliveberg M, Marklund SL. Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14157-14162. (2007)
- Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 139:1307-1315. (1997)
- Zhang F, Strom AL, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *J Biol Chem* 282:16691-16699. (2007)
- Zhao P, Ignacio S, Beattie EC, Abood ME. Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 27:572-579. (2008)
- Zhong G, Masino MA, Harris-Warrick RM. Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. *J Neurosci* 27:4507-4518. (2007)
- Zhou C, Zhao CP, Zhang C, Wu GY, Xiong F. A method comparison in monitoring disease progression of G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler*:1-7. (2007)
- Ziskind-Conhaim L. Electrical properties of motoneurons in the spinal cord of rat embryos. *Dev Biol* 128:21-29. (1988)
- Zoccolella S, Masi G, Mezzapesa D, Carnicella F, Iliceto G, Lamberti P, Serlenga L. Motoneuron disease after electric injury: a case report. *Neurol Sci* 29:47-49. (2008)

FIGURES

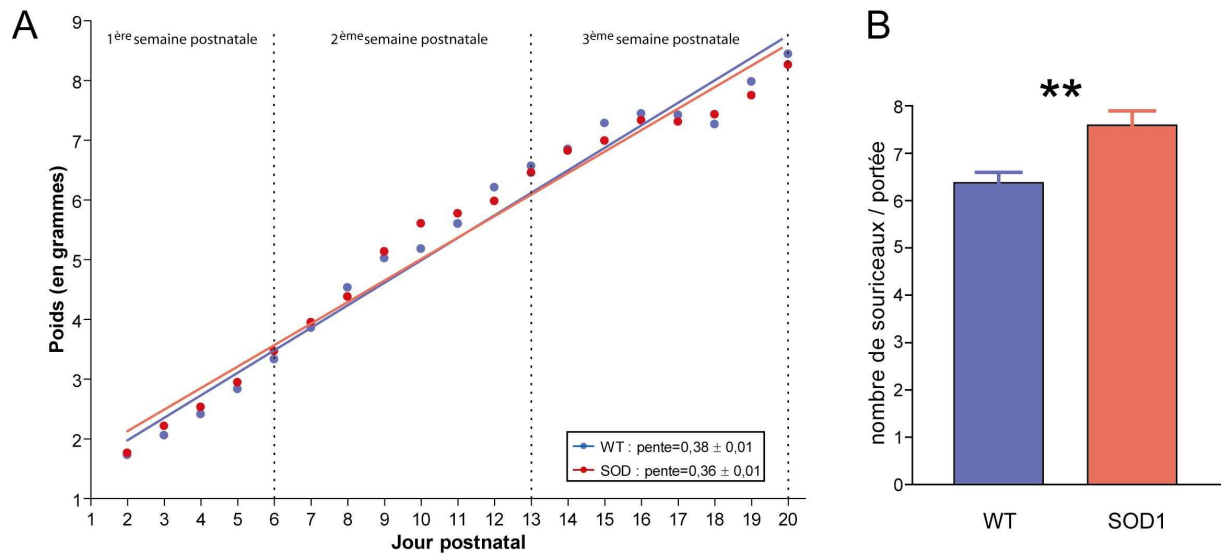


Figure 1 A – Courbe de poids des souriceaux de la lignée sauvage C57Bl /6J (WT) et de la lignée SOD1-G85R de P2 à P20. Chaque cercle représente le poids moyen des souriceaux dans chacune des lignées. Les pentes des régressions linéaires sont équivalentes. La prise de poids pendant la période postnatale étudiée est identique entre les deux lignées. B – Graphique représentant le nombre moyen de souriceaux par portée à la naissance. La différence entre les deux lignées est significative avec un nombre de souriceaux par portée plus important chez les femelles SOD1-G85R.

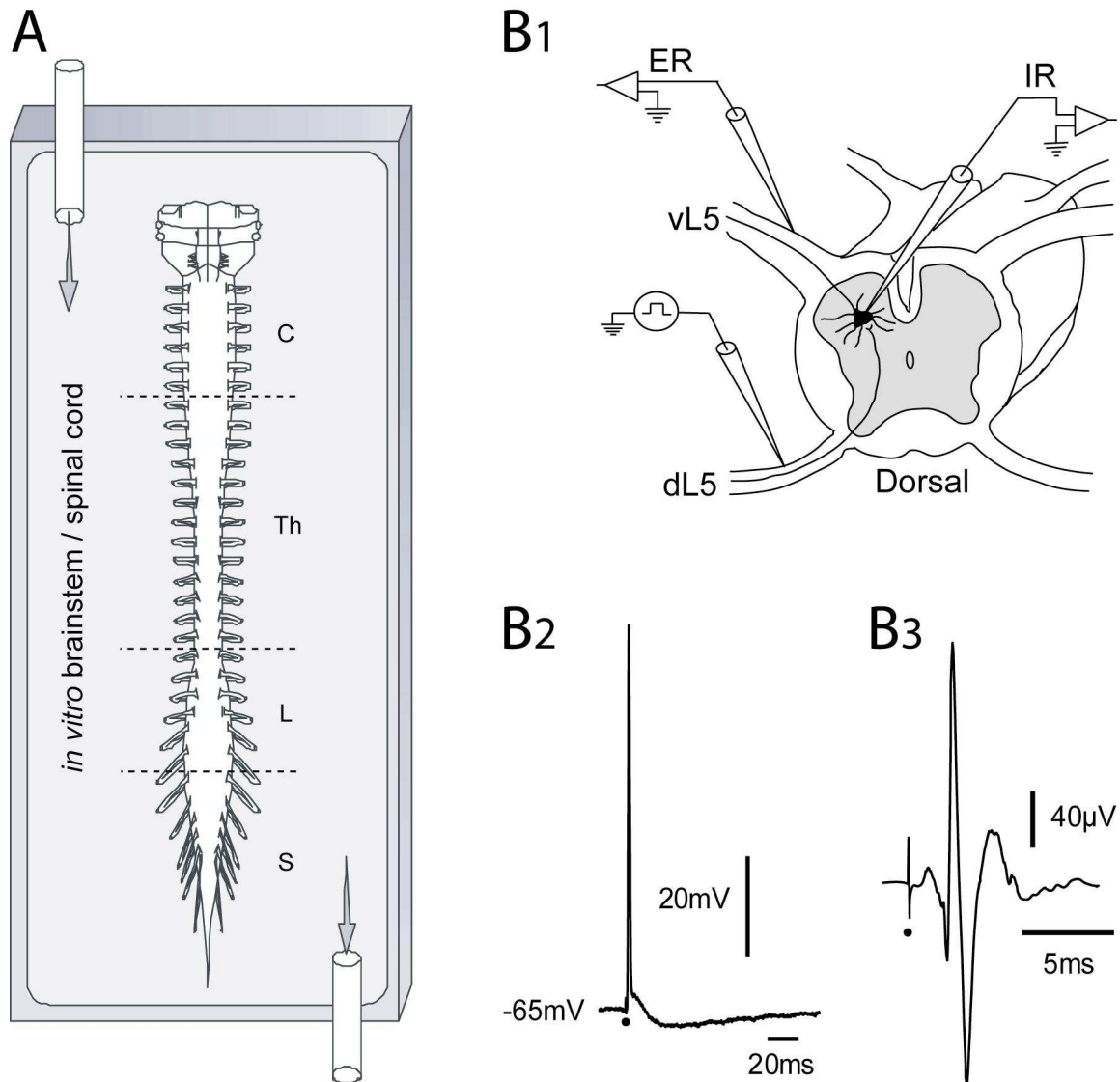


Figure 2 – Représentation schématique de la préparation *in vitro* avec le montage expérimental pour les enregistrements électrophysiologiques. A – Schéma de la préparation *in vitro* de moelle épinière / tronc cérébral isolée et de la chambre d'enregistrement constamment perfusée avec du liquide physiologique. Cette préparation est utilisée pour les enregistrements électrophysiologiques, les injections intracellulaires de neurobiotine et les marquages rétrogrades des pools moteurs par la rhodamine-dextran. B1 – Schéma représentant une portion de moelle épinière coupée transversalement avec la face ventrale vers le haut. La micropipette de verre est insérée dans un motoneurone identifié par son potentiel d'action antidromique (B2) suite à la stimulation de la racine ventrale du segment L5. Des électrodes en acier sont placées au contact des racines soit pour stimuler soit pour enregistrer « en passant » l'activité nerveuse (B3). Les cercles noirs en B2 et B3 représentent l'artefact de stimulation de la racine dorsale en B3 et de la racine ventrale en B2. Abréviations : C=cervical, Th=thoracique, L=lombaire, S=sacré, ER=enregistrement extracellulaire, IR= enregistrement intracellulaire, vL5=racine ventrale du segment L5, dL5= racine dorsale du segment L5.

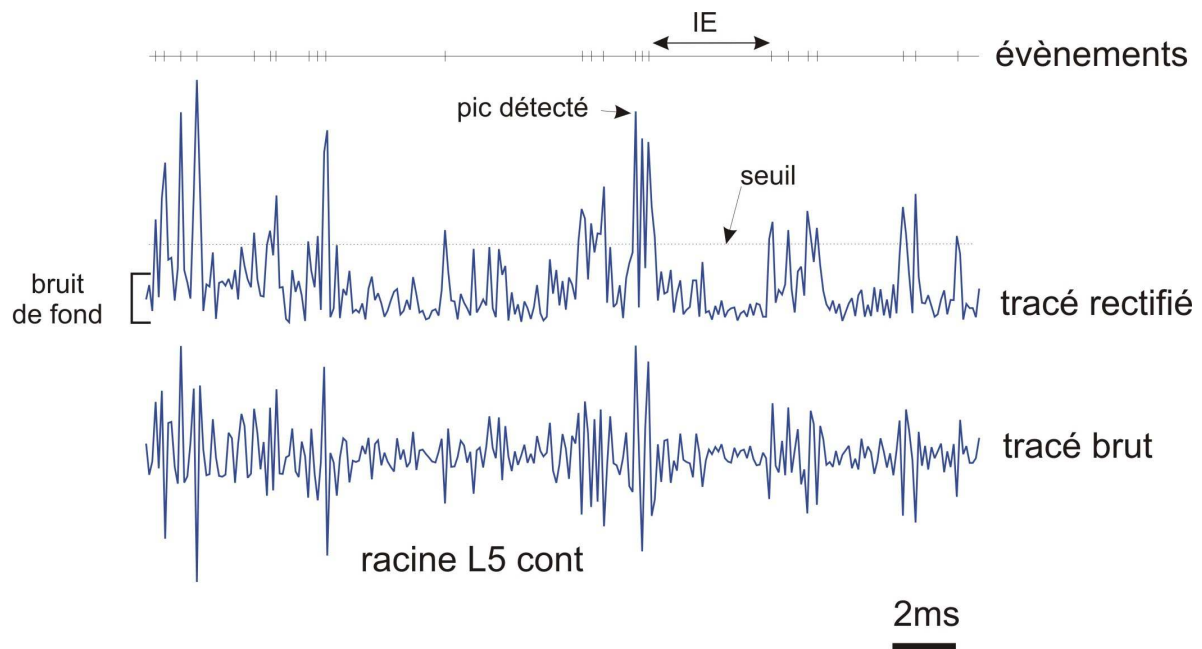


Figure 3 – Méthode d'analyse de l'activité spontanée enregistrée sur une racine ventrale. Le tracé brut enregistré en extracellulaire sur la racine ventrale est rectifié et les potentiels d'action (événements) sont détectés après seuillage. Cette activité spontanée reflète le niveau d'activité des pools de motoneurons spinaux dont les axones projettent dans la racine ventrale. IE=intervalle inter événement.

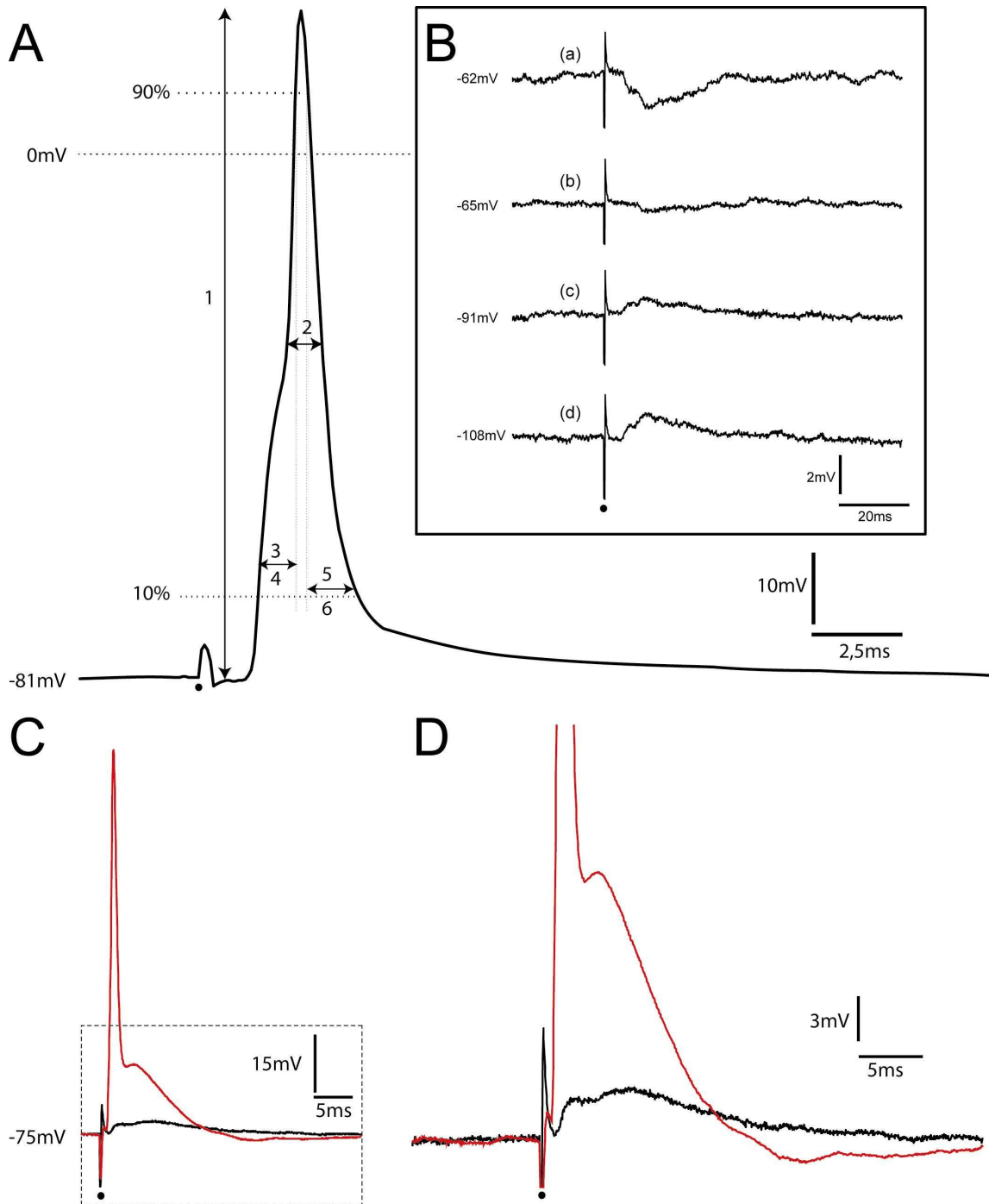


Figure 4 : Potentiel d'action antidromique. A - Exemple d'un potentiel d'action antidromique enregistré dans un motoneurone WT à P9 suite à la stimulation de la racine ventrale (RV) L5. Cette figure illustre la manière dont les caractéristiques principales du PA ont été mesurées. (1) amplitude, (2) demi-durée, (3 et 4) temps et vitesse de montée, (5 et 6) temps et vitesse de repolarisation. Sur le front de montée du PA, l'épaule bien visible correspond à la dissociation IS-SD. B – exemple de réponses enregistrées dans un motoneurones WT à P8 suite à la stimulation à faible intensité de la RV. Ces potentiels sont dépolarisants ou hyperpolarisants selon le potentiel de membrane. L'intensité du courant injecté par la microélectrode est de 1,3 nA en (a), de 0,5 nA en (b), de -0,7 nA en (c) et de -1,2 nA en (d). Ces potentiels post-synaptiques sont probablement dus à l'activation de cellules de Renshaw par des collatérales d'axones. Pour chaque intensité la moyenne de 3 traces est représentée. C - Réponse d'un motoneurone SOD1 à P3 suite à la stimulation de la RV. Avec une intensité de stimulation à 8,4 μ A, on déclenche seulement un potentiel post-synaptique dépolarisant (trace noire). Pour déclencher un PA antidromique, il faut augmenter l'intensité de stimulation à 10 μ A. Pour chaque intensité la moyenne de 3 traces est représentée. D – Agrandissement de la zone encadrée en C. On voit clairement que la post-dépolarisation consécutive au PA et le potentiel dépolarisant durent plusieurs millisecondes après la stimulation. Pour chaque enregistrement, le cercle noir représente l'artefact de stimulation de la RV.

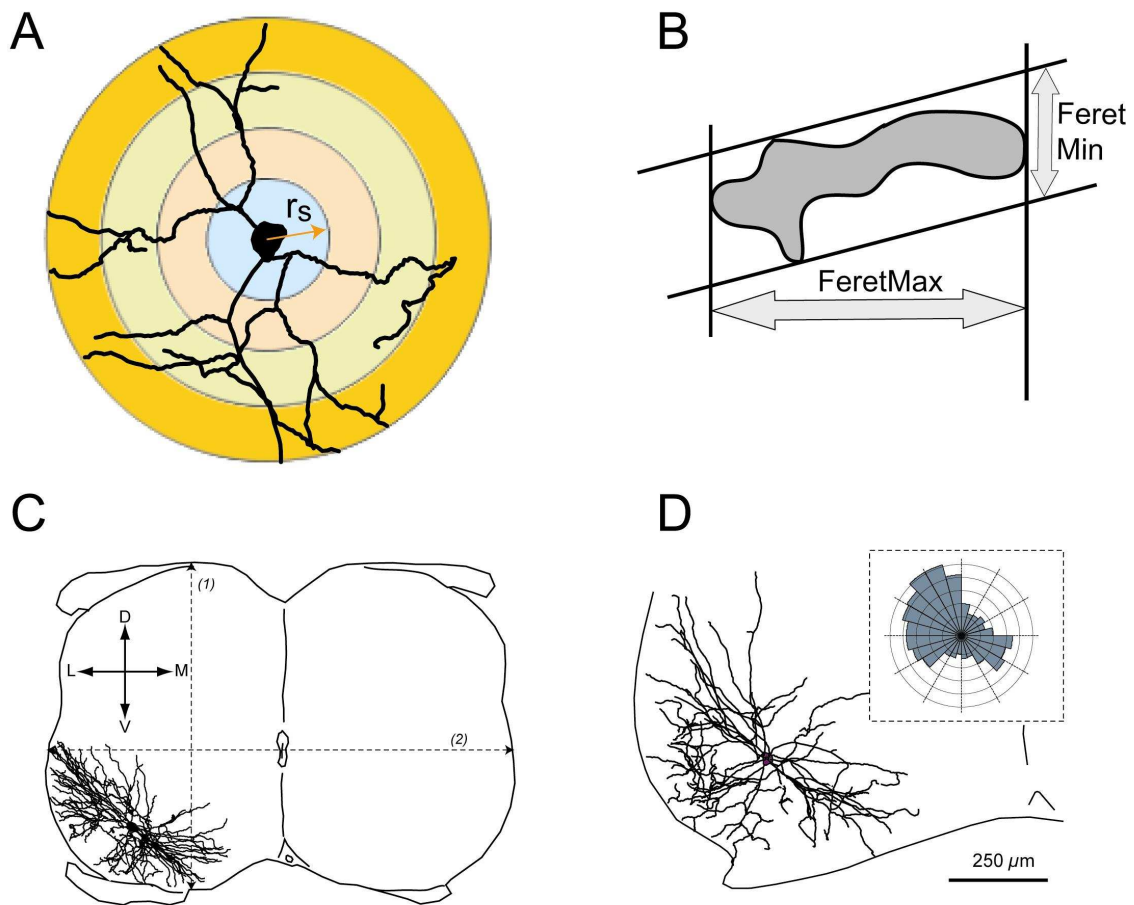


Figure 5 – Analyse des distributions radiales des dendrites, de la pousse dendritique et des mesures du contour somatique et de la moelle. A – le corps cellulaire d'un neurone schématisé avec trois départs dendritiques est positionné au centre d'un cercle. Ce cercle est partagé en plusieurs zones concentriques successives dont la première a un rayon (r_s). La valeur de (r_s) est définie par l'expérimentateur. Les autres zones présentent toutes une largeur équivalente à (r_s). Pour la construction des diagrammes de Sholl, nous avons travaillé sur des sections avec $r_s=25 \mu\text{m}$. Les éléments du neurone (points de branchement et longueur dendritique totale) sont comptabilisés à l'intérieur des différentes zones ainsi définies et les valeurs sont reportées graphiquement en fonction de la distance radiale au soma. B – schéma illustrant la façon dont sont définies la plus petite et la plus grande largeur (FeretMin et FeretMax) du contour somatique. Ces 2 schémas explicatifs sont adaptés du guide de l'utilisateur de NeuroLucida (version 7, MBF Bioscience Inc., Williston, VT). C – Représentation schématisée 2D d'un motoneurone SOD1 à P8 injecté avec la neurobiotine et complètement reconstruit en 3D grâce au système NeuroLucida. La longueur dorso-ventrale de la moelle (1) est mesurée parallèlement à la ligne médiane dans l'hémi-moelle contenant le corps cellulaire du motoneurone. La largeur de la moelle (2) est mesurée perpendiculairement à la ligne médiane avec une droite passant par le canal de l'épendyme. D – Représentation schématisée dans le plan transversal d'un motoneurone WT à P8. Les directions de la pousse dendritique sont données par l'histogramme polaire des arborisations représenté dans l'encart en pointillé.

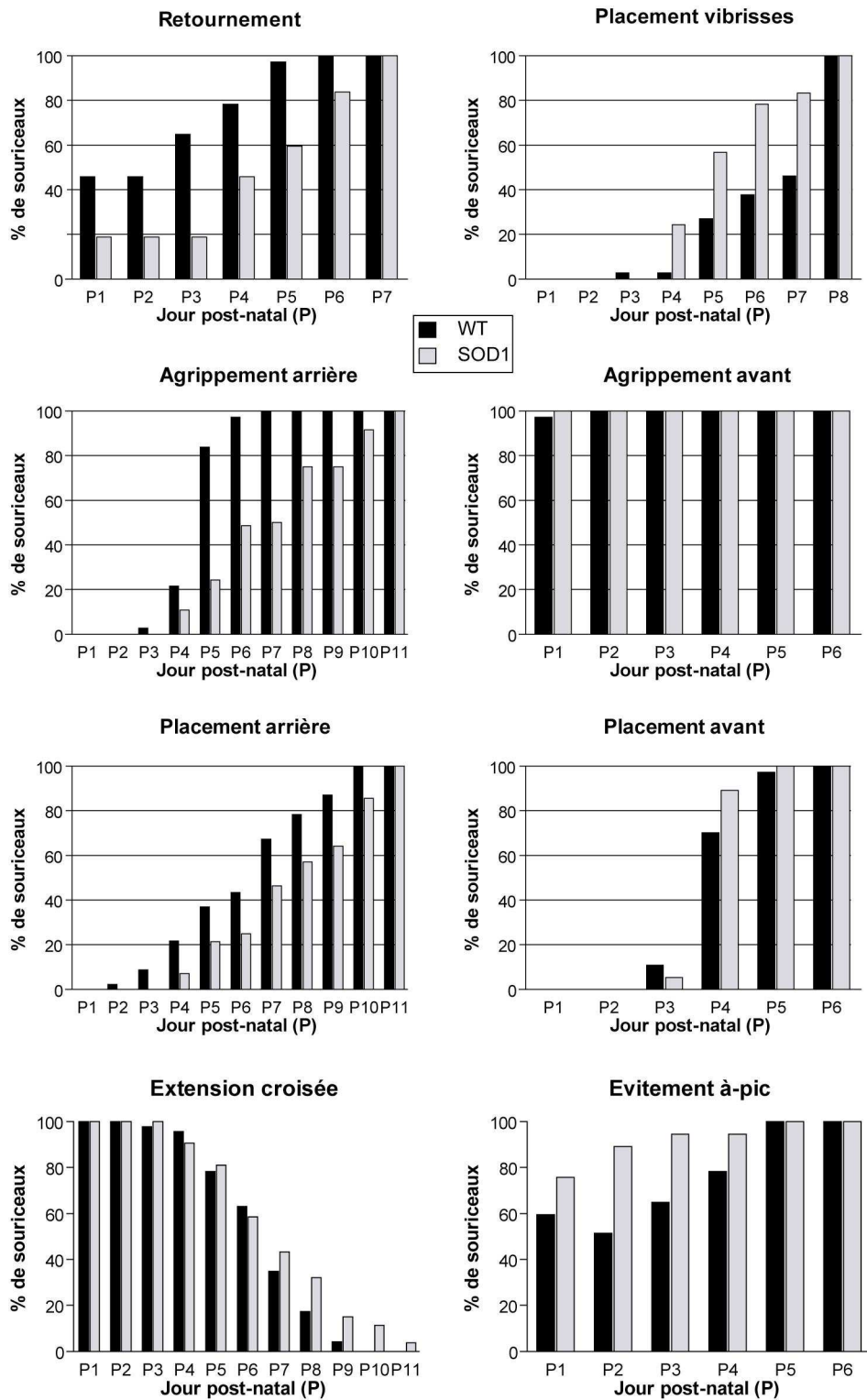


Figure 6 : Apparition des réponses sensori-motrices – différences entre les souris WT et SOD1. Pour les huit tests réalisés, les proportions sont représentées en pourcentage afin de faciliter la lecture des graphiques. Les valeurs des tests statistiques sont données dans la table 1.

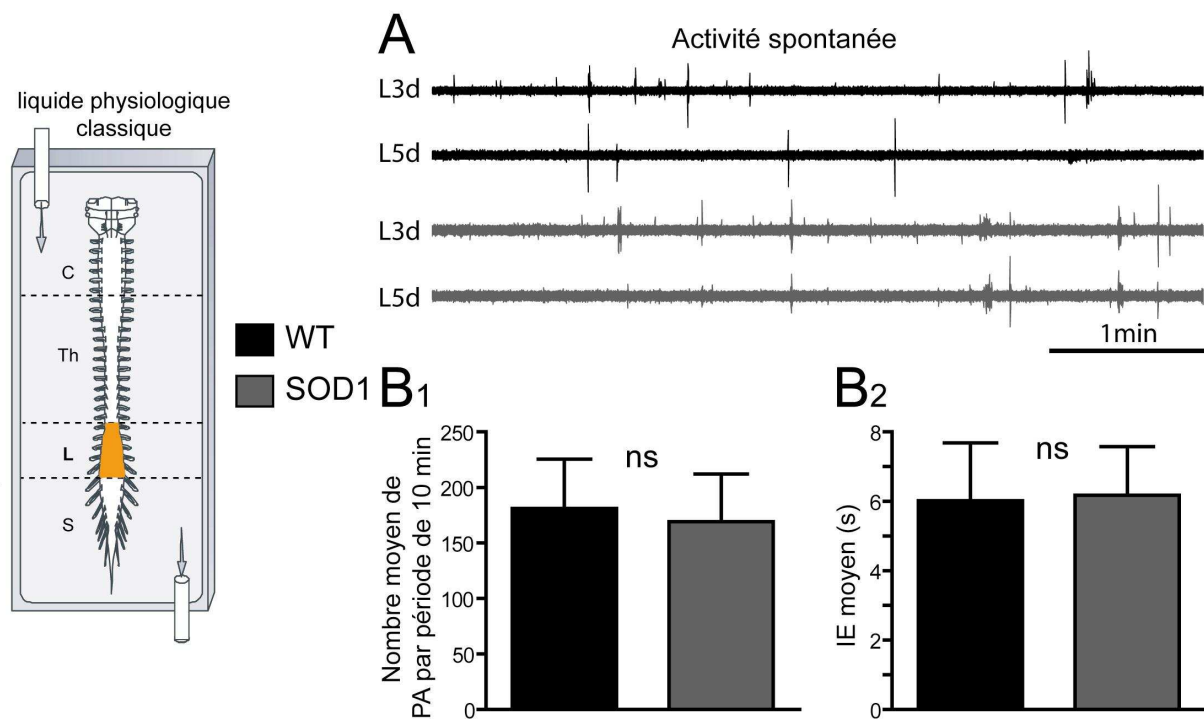


Figure 7 : Activité spontanée des segments lombaires des préparations WT et SOD1. A - Activité spontanée enregistrée sur les racines ventrales L3 et L5 ipsilatérales d'une préparation WT (en haut) et SOD1 (en bas) à P5. B1 - Nombre moyen de potentiels d'action enregistrés sur des périodes de dix minutes au niveau des racines L3 et L5 des préparations WT (n=10) et SOD1 (n=11). La différence n'est pas significative (P=0,84). B2 - Intervalle inter-événements (IE) moyen pour les deux populations. La différence n'est pas significative (P=0,92).

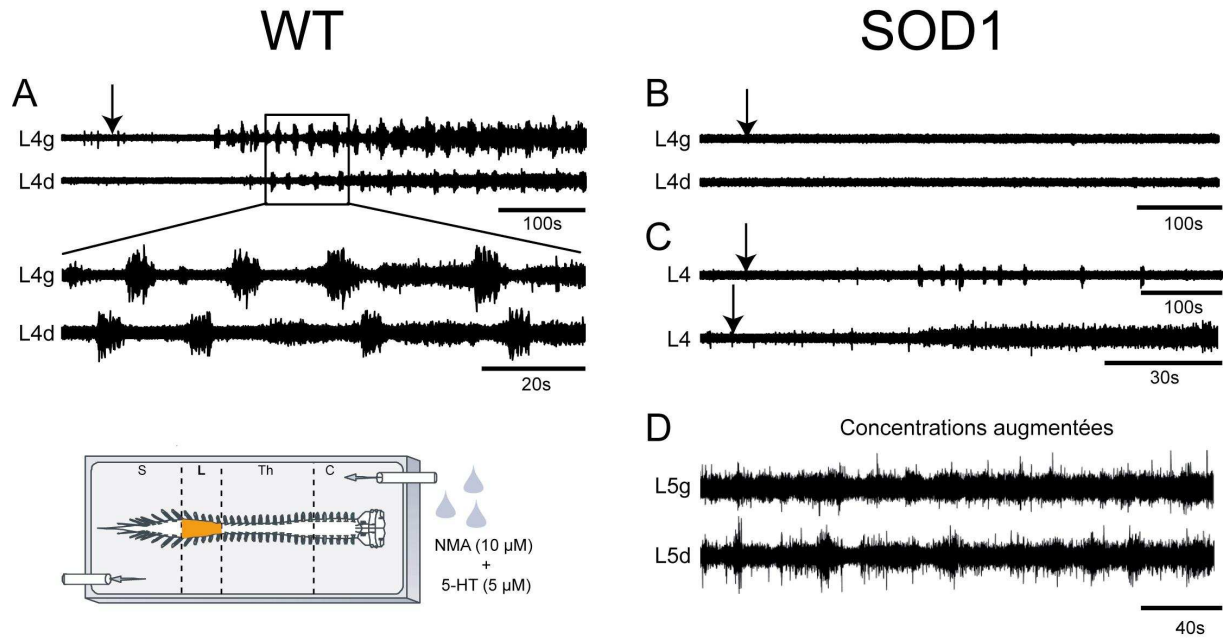


Figure 8 : Défaut d'activation des réseaux lombaires des souris SOD1. A - L'application de NMA (10 μ M), 5-HT (5 μ M) induit des activités rythmiques alternées enregistrées sur les racines ventrales L4 contralatérales d'une préparation WT à P3. B - Les mêmes racines enregistrées de façon simultanée sur une préparation SOD1 à P4 ne répondent pas à l'application pharmacologique et l'activité enregistrée n'augmente pas pendant l'application. C - Décharges en bouffées transitoires (trace du haut) et activité tonique soutenue (trace du bas) enregistrées sur des préparations SOD1 respectivement à P4 et P3 pendant une application de NMA (10 μ M), 5-HT (5 μ M). D - Activité irrégulière en bouffées de potentiels d'action enregistrée sur une préparation SOD1 à P3 lors d'une application de NMA (20 μ M), 5-HT (5 μ M), alors qu'aucune activité n'était observée pour cette préparation avec le NMA (10 μ M), 5-HT (5 μ M). Pour tous les tracés, les flèches représentent le début de l'application des substances pharmacologiques.

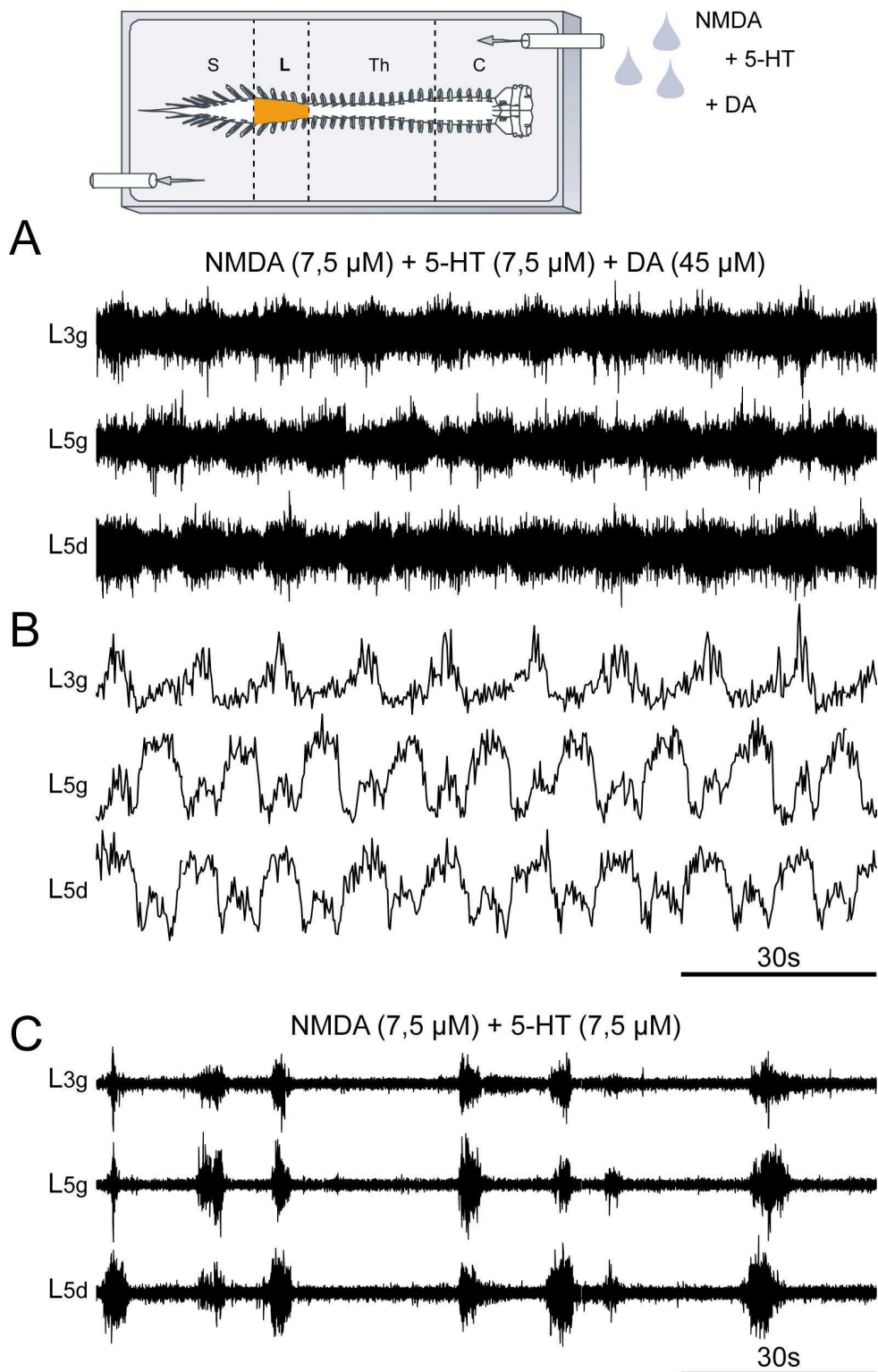


Figure 9 : La dopamine (DA) ajoutée à la 5-HT et au NMDA génère des rythmes alternés au niveau lombaire des préparations SOD1. A – Activité rythmique alternée enregistrée sur trois racines des segments lombaires dans une préparation SOD1 à P4 pendant l'application de NMDA (7,5 μ M), 5-HT (7,5 μ M) et dopamine (DA-45 μ M). B – Alternances entre racines opposées et adjacentes après rectification et intégration des tracés. C – Bouffées rythmiques en phase sur les racines lombaires lors de l'application de NMDA (7,5 μ M), 5-HT (7,5 μ M) pour la même préparation SOD1.

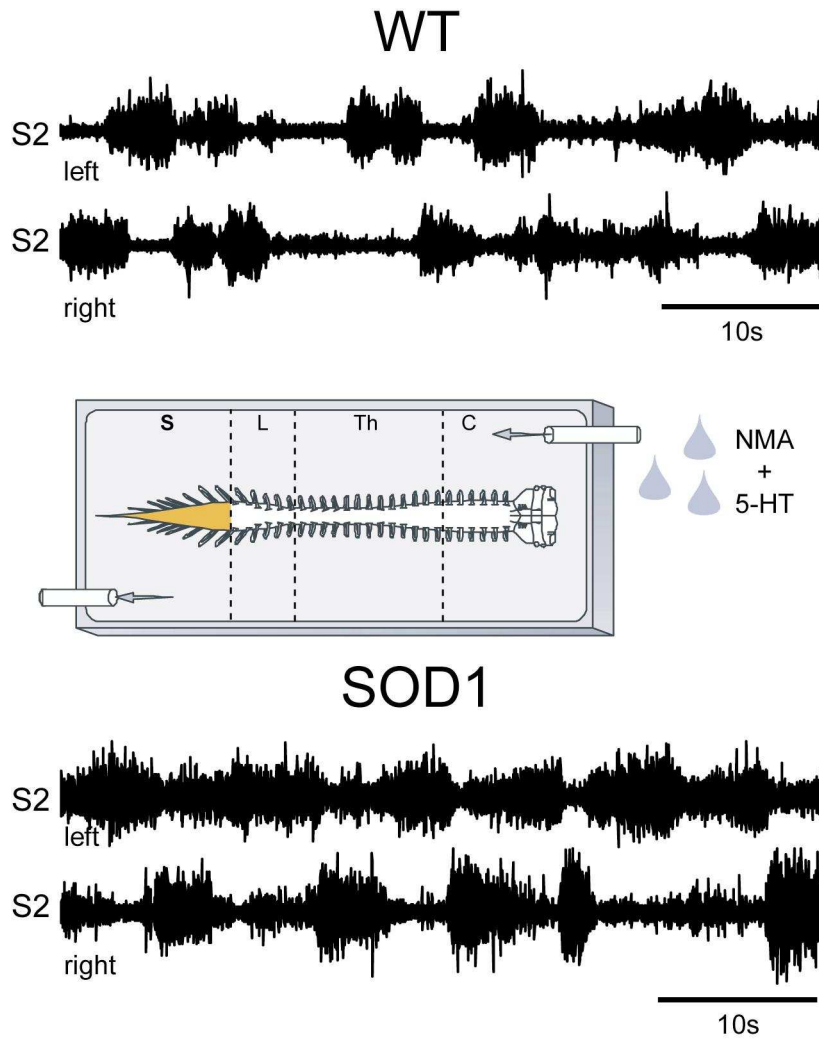


Figure 10 : Activités rythmiques alternées des segments sacrés des préparations WT et SOD1 déclenchées par le NMA et la 5-HT. L'application de NMA (10 μ M), 5-HT (5 μ M) induit des activités rythmiques alternées entre les racines ventrales S2 contralatérales d'une préparation WT à P6 (tracés du haut) et d'une préparation SOD1 à P5 (tracés du bas).

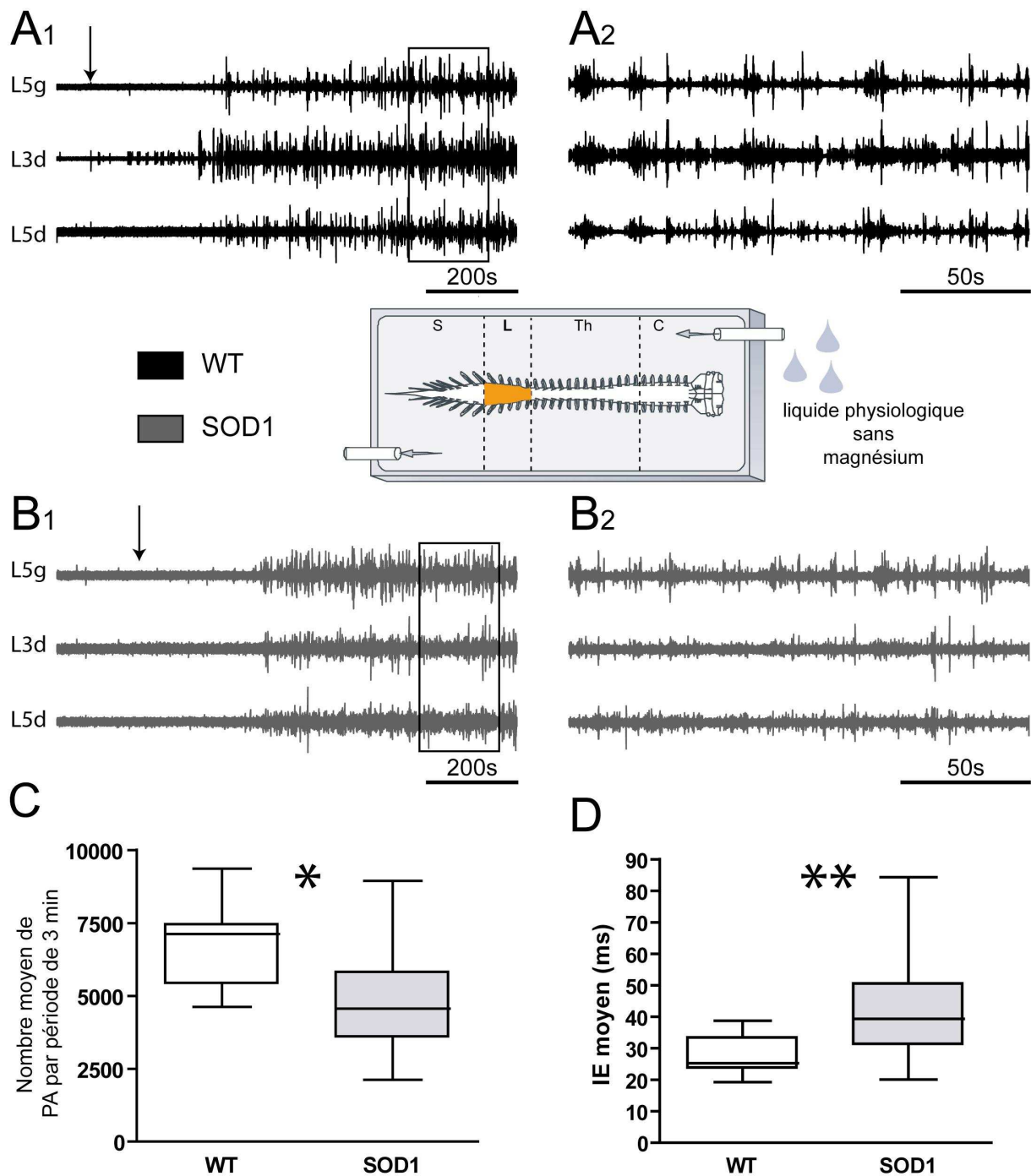


Figure 11 : Activité spontanée des segments lombaires dans le milieu sans magnésium. A1, B1 - Activité spontanée des racines ventrales L3 et L5 d'une préparation WT à P3 (A) et SOD1 à P5 (B). Les flèches représentent le début de la perfusion du milieu sans magnésium et les parties délimitées par les rectangles noirs sont représentées en A2 et B2 avec une échelle de temps plus petite. La levée du bloc magnésium des récepteurs NMDA se traduit par une forte activité « spontanée » des préparations WT et SOD1. C-D - Diagramme des distributions du nombre de potentiels d'action (C) et des intervalles inter-événements (IE) moyens (D) des préparations WT (n=13) et SOD1 (n=13). Pour chaque diagramme, la boîte est délimitée par le premier et le troisième quartile et traversée par la valeur de la médiane. Les deux barres horizontales représentent les valeurs extrêmes de chaque distribution. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; test non paramétrique U de Mann-Whitney).

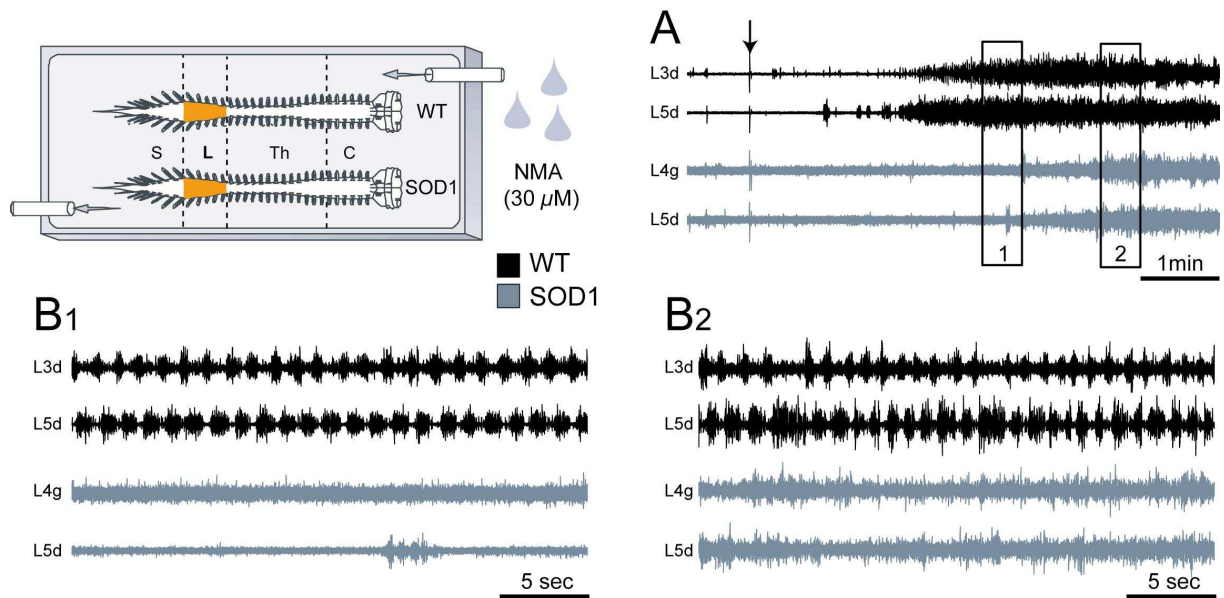


Figure 12 ; Absence de rythmes alternés au niveau des segments lombaires des préparations SOD1 lors d'application de NMA à 30 μ M, contrairement aux préparations WT.

A –Enregistrements simultanés des racines lombaires d'une préparation WT (tracés du haut) à P3 et d'une préparation SOD1 (tracés du bas) à P4 pendant une application de NMA (30 μ M). La flèche représente le début de l'application. Les zones délimitées par les rectangles noirs sont représentées en B1 et B2 avec une échelle de temps plus faible. B1-B2 – Les racines lombaires de la préparation WT présentent une activité en bouffées de PA alternées entre les racines lombaires L3 et L5 ipsilatérales alors que, pour la préparation SOD1, après l'enregistrement de quelques bouffées de PA (B1), l'application de NMA (30 μ M) induit seulement une activité tonique avec quelques bouffées d'activité sporadiques (B2).

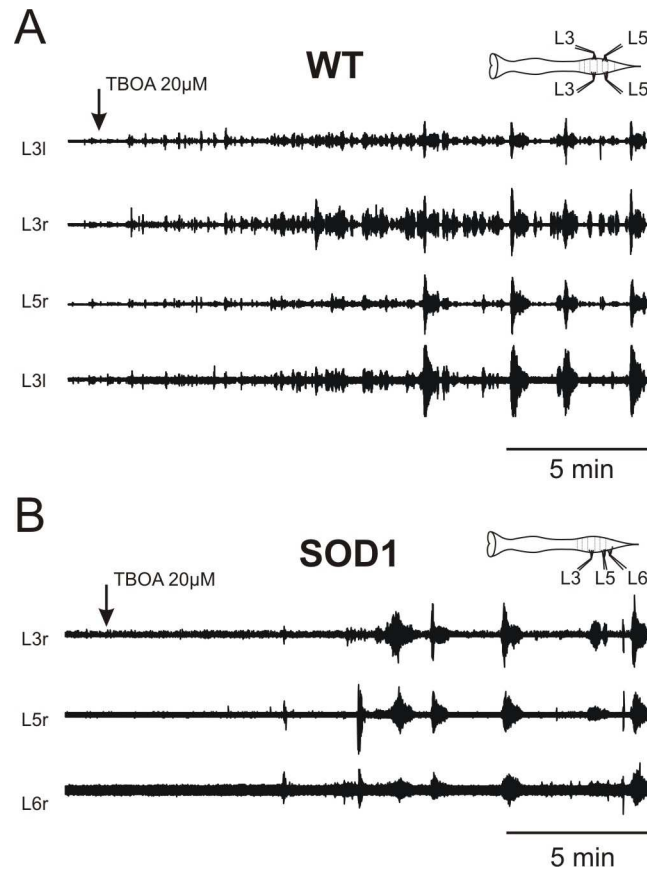


Figure 13 : Synchronisation des décharges motrices induites par le DL-TBOA (20 μ M). Augmentation de l'activité motrice enregistrée sur les racines ventrales des préparations WT (A) et SOD1 (B) à P3 pendant une application de TBOA 20 μ M. Dans les deux types de préparation, des bouffées de longue durée, synchrones sur les différentes racines ventrales, sont enregistrées plusieurs minutes après le début de l'application.

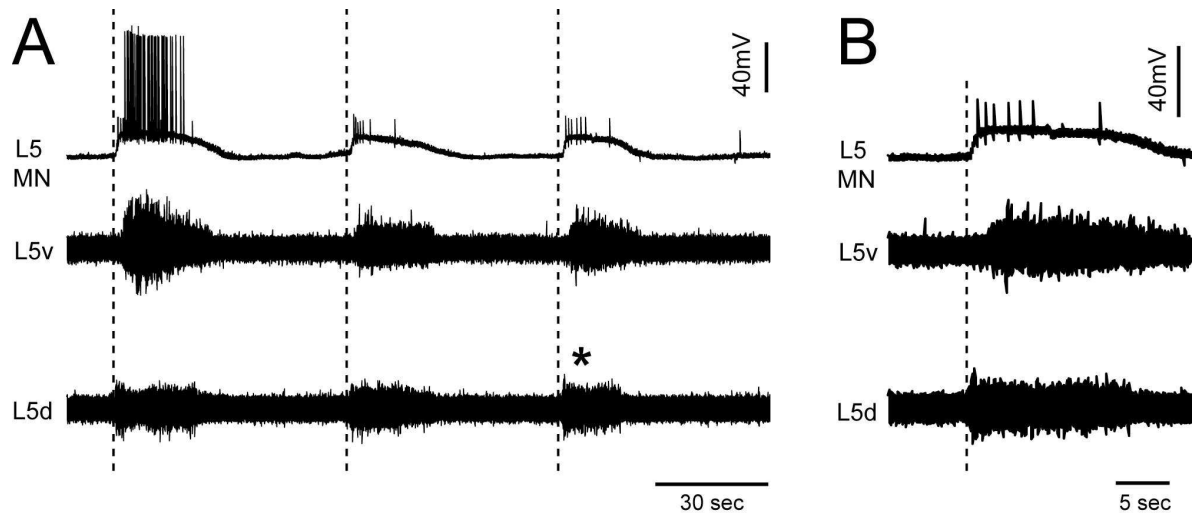


Figure 14 : Le début des dépolarisations des motoneurones sont synchrones avec les décharges enregistrées sur les racines dorsales pendant l'application de DL-TBOA ($20 \mu\text{M}$). A - Activités nerveuses enregistrées dans un motoneurone, la racine ventrale et la racine dorsale du segment L5 dans une préparation SOD1 à P5. Les lignes pointillées représentent le début des dépolarisations rythmiques de large amplitude et de longue durée enregistrées dans le motoneurone. Ces dépolarisations sont synchrones avec les bouffées de potentiels d'action enregistrées sur la racine dorsale. Les bouffées de la racine ventrale apparaissent environ une seconde après le début des dépolarisations intracellulaires. La partie du tracé marquée par une étoile (trace du bas) est représentée en (B) avec une échelle de temps plus petite. La synchronisation de la dépolarisation intracellulaire avec le début de la bouffée sur la racine dorsale ainsi que le décalage de la réponse de la racine ventrale sont plus facilement visibles.

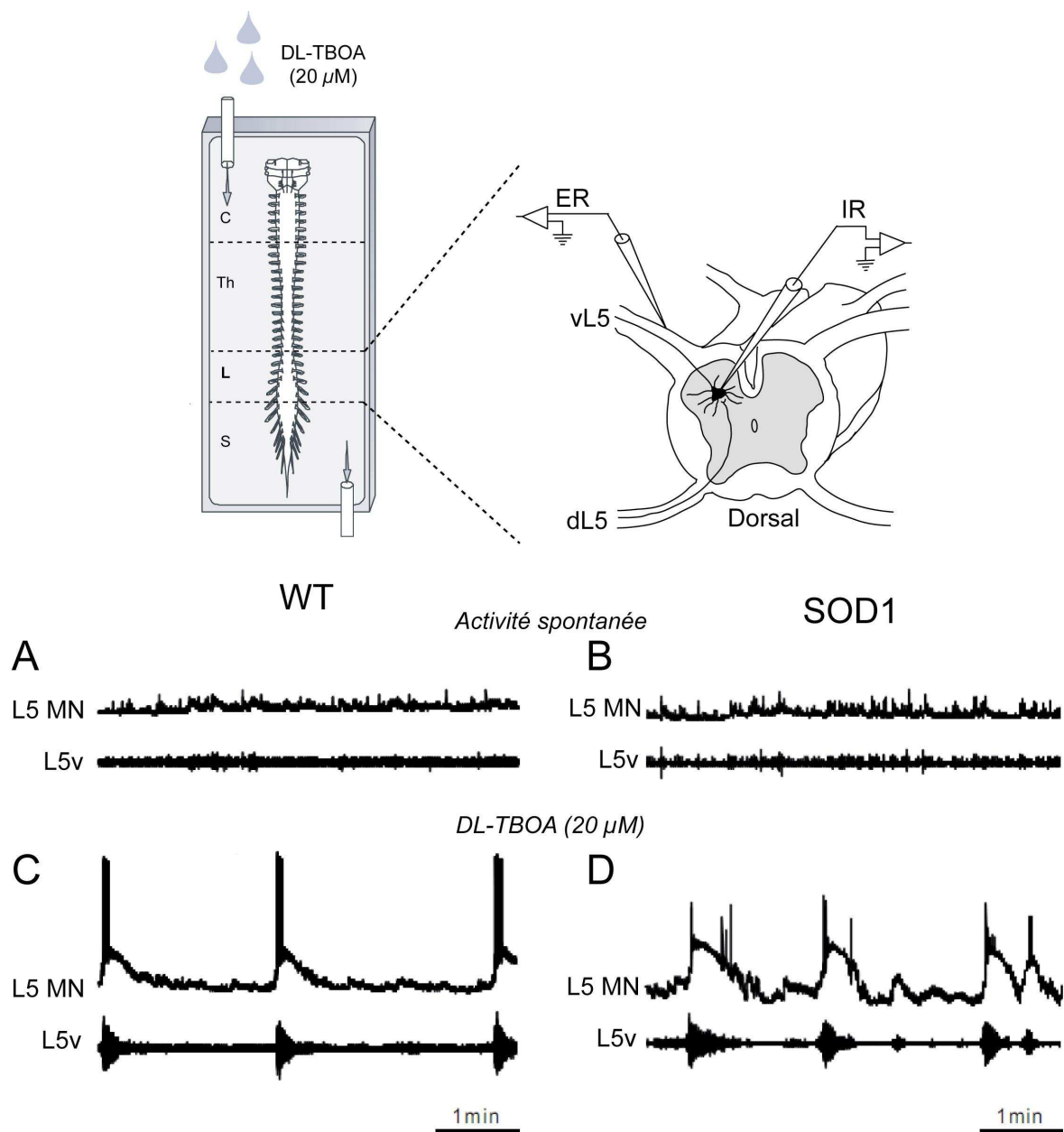


Figure 15 : Le TBOA (20 μM) génère des dépolarisations de longue durée dans les motoneurones lombaires WT et SOD1.

Activité spontanée d'un motoneurone lombaire du segment L5 enregistrée simultanément avec la racine ventrale ipsilatérale dans une préparation WT à P6 (A) et dans une préparation SOD1 à P4 (B). Dépolarisations lentes de large amplitude enregistrées en intracellulaire de manière concomitante avec les décharges de la racine ventrale 10 à 15 minutes après le début de l'application de TBOA (20 μM) pour la préparation WT (C) et la préparation SOD1 (D).

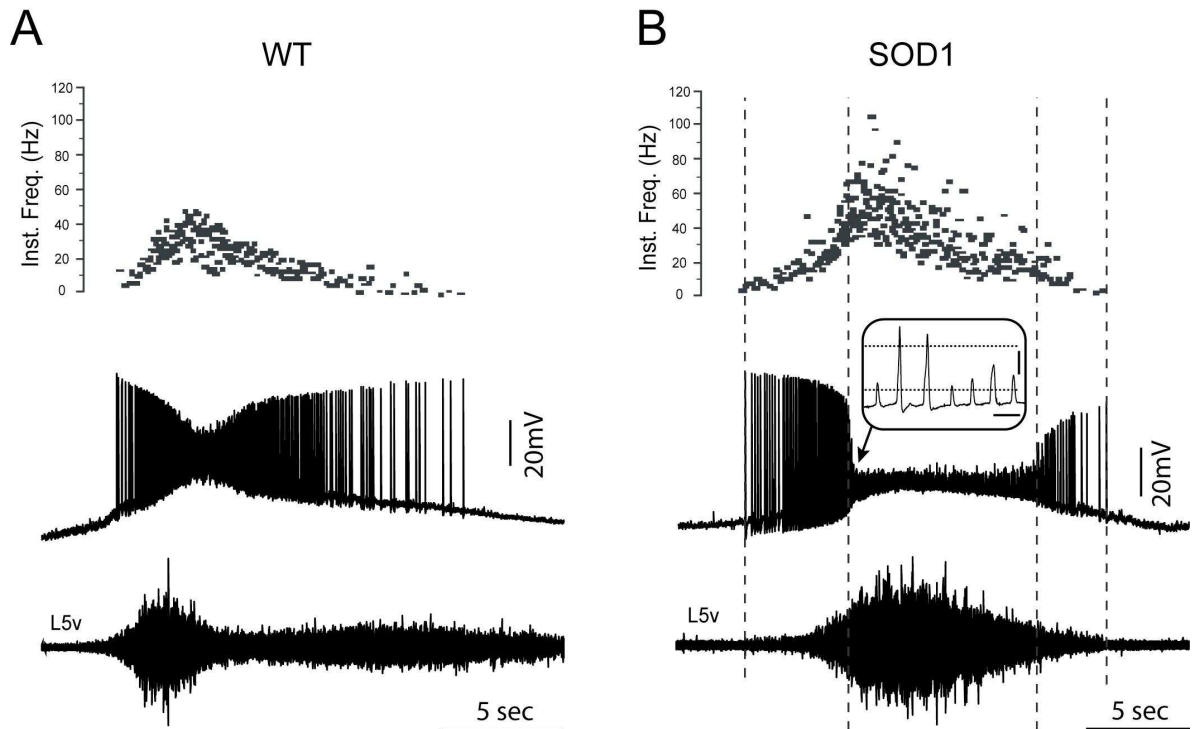


Figure 16 : Comparaison des dépolarisations enregistrées dans les motoneurones WT et SOD1 lors d'application de TBOA. Dépolarisations d'un motoneurone L5 (tracés du haut) et augmentation de l'activité enregistrée sur la racine ventrale (tracés du bas) dans une préparation WT (A) et une préparation SOD1 (B). Les fréquences instantanées sont illustrées au dessus des enregistrements intracellulaires avec la même échelle de temps. Dans l'exemple du motoneurone WT, la fréquence instantanée maximale atteint 50 Hz et l'amplitude du PA varie avec la fréquence de décharge. Elle est progressivement réduite quand la fréquence augmente avant de revenir à la valeur initiale sur la fin de la bouffée quand la fréquence de décharge diminue. Pour le motoneurone SOD1, la fréquence instantanée maximale atteint des valeurs plus importantes (90 à 110 HZ) et on peut observer la disparition de la composante SD quand la fréquence atteint des valeurs avoisinant 60 Hz (voir partie encadrée). Calibration de la partie encadrée en B : 10 mV et 25 ms. WT à P5 et SOD1 à P3.

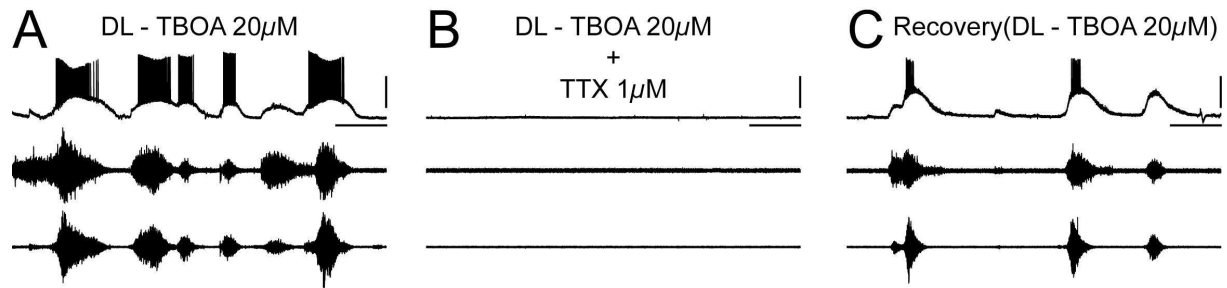


Figure 17 : La tétrodotoxine bloque totalement les oscillations induites par le TBOA (20 μ M).

A-C. Enregistrements intracellulaires d'un motoneurone L5 (tracés du haut) et enregistrements extracellulaires des racines ventrales ipsilatérales L5 et L6 (autres tracés) obtenus sur une préparation WT à P5. Les activités induites par l'application de TBOA à 20 μ M et enregistrées sur le motoneurone L5 et les deux racines ventrales (A) sont complètement bloquées quelques minutes après l'ajout de la tétrodotoxine (TTX, 1 μ M) au milieu de perfusion (B). Un retour partiel des activités s'observe 2 à 3 heures après le rinçage de la TTX et la simple perfusion de TBOA (C). Calibrations des tracés intracellulaires : 30ms et 30mV.

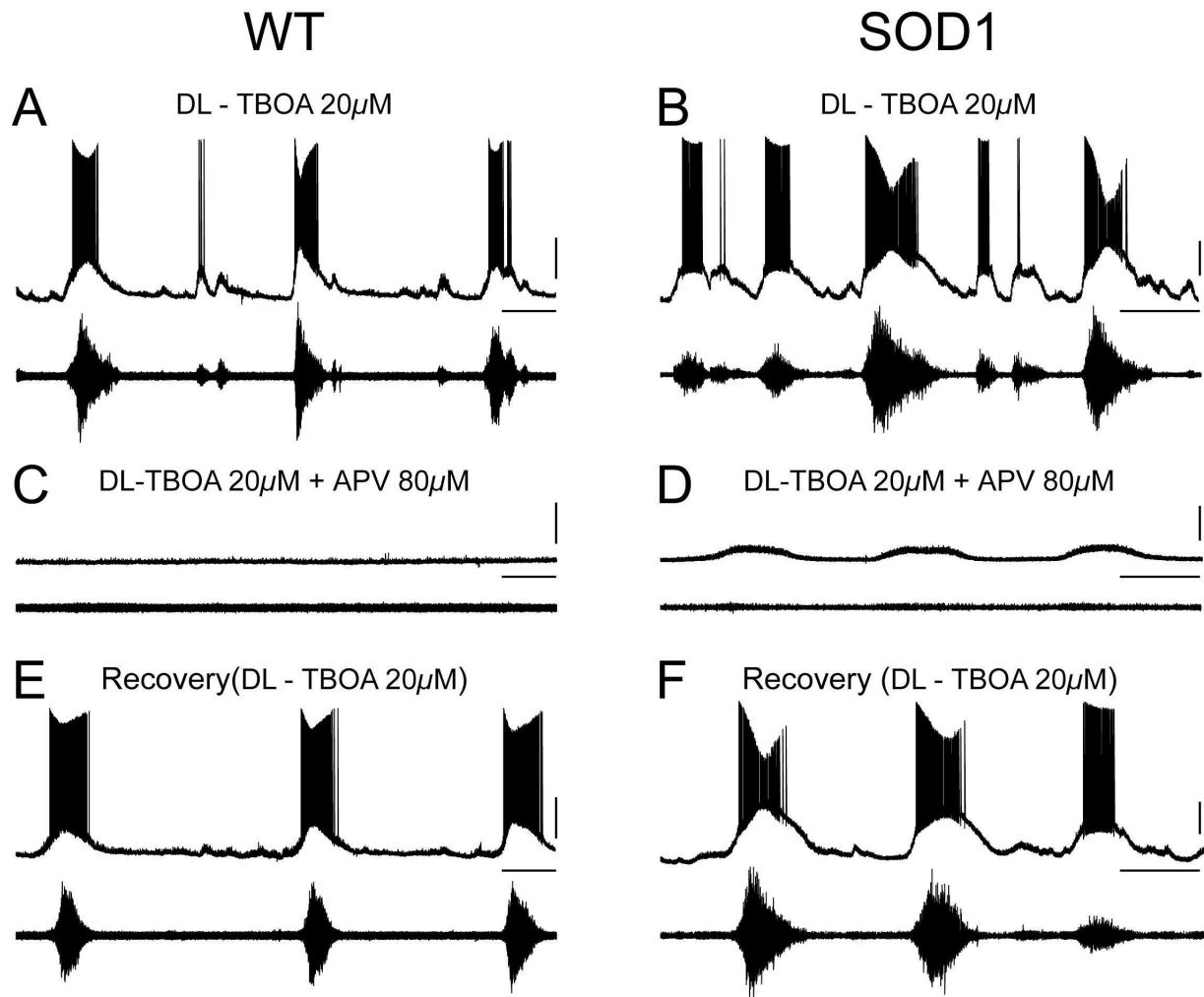


Figure 18 : Des dépolarisations persistent dans les motoneurones SOD1 lors de l'application d'APV en présence de TBOA. A - F. Enregistrements intracellulaires d'un motoneurone L5 (tracés du haut) et enregistrements extracellulaires de la racine ventrale ipsilatérale L5 (tracés du bas) obtenus sur une préparation WT à P4 (A, C, E) et une préparation SOD1 à P5 (B, D, F). A - B. L'application de TBOA (20 μM) entraîne des décharges sur le motoneurone et la racine ventrale L5 dans la préparation WT (A) et SOD1 (B). C - D. Le blocage total des récepteurs NMDA par l'ajout du D-APV (80 μM) supprime totalement l'activité pour la préparation WT (C) alors que des dépolarisations rythmiques persistent dans le motoneurone SOD1 (D). E - F. Retour des activités induites par la perfusion de TBOA pour la préparation WT (E) et SOD1 (F). Calibrations : 20mV, 30 secondes.

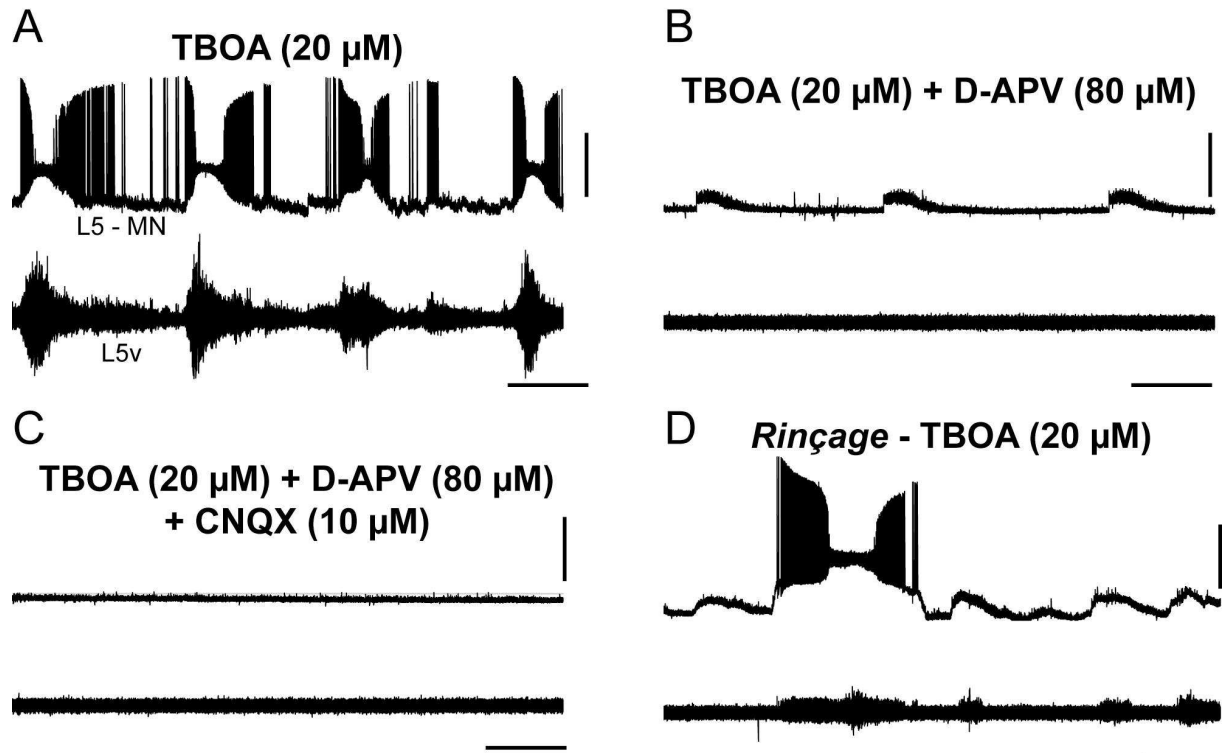


Figure 19 : Pour les motoneurones SOD1, le CNQX est nécessaire pour bloquer les oscillations induites par l'application de TBOA. A–D. Enregistrements intracellulaires d'un motoneurone L5 (tracés du haut) et enregistrements extracellulaires de la racine ventrale ipsilatérale L5 (tracés du bas) obtenus sur une préparation SOD1 à P5. A – L'application de TBOA (20 μ M) entraîne des décharges sur le motoneurone et la racine ventrale L5. B – Des dépolarisations rythmiques persistent quand le D-APV (80 μ M) est ajouté au milieu de perfusion. C – Pour bloquer complètement ces oscillations persistantes l'ajout de CNQX (10 μ M) est nécessaire. D – Retour partiel des réponses induites par l'application de TBOA seul. Calibrations pour A, B, C et E ; 40 mV et 30 secondes.

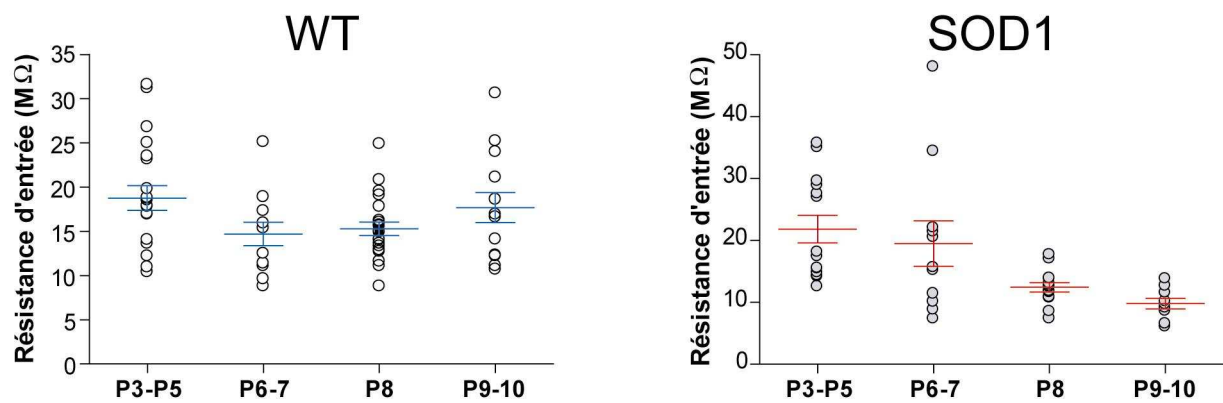


Figure 20 : Evolution de la résistance d'entrée des motoneurones WT et SOD1 entre P3-P10. Pour les deux graphes, la moyenne (\pm s.e.m.) est représentée à chaque tranche d'âge. Les cercles représentent les valeurs individuelles de R_{in} de tous les motoneurones. Il convient de noter la diminution continue de R_{in} pour les motoneurones SOD1 contrairement aux motoneurones WT. La pente de la régression linéaire est négative et significativement différente de zéro ($P < 0,0001$ *** ; pente = $-2,44 \pm 0,51$ $M\Omega$ / jour ; $r = -0,58$).

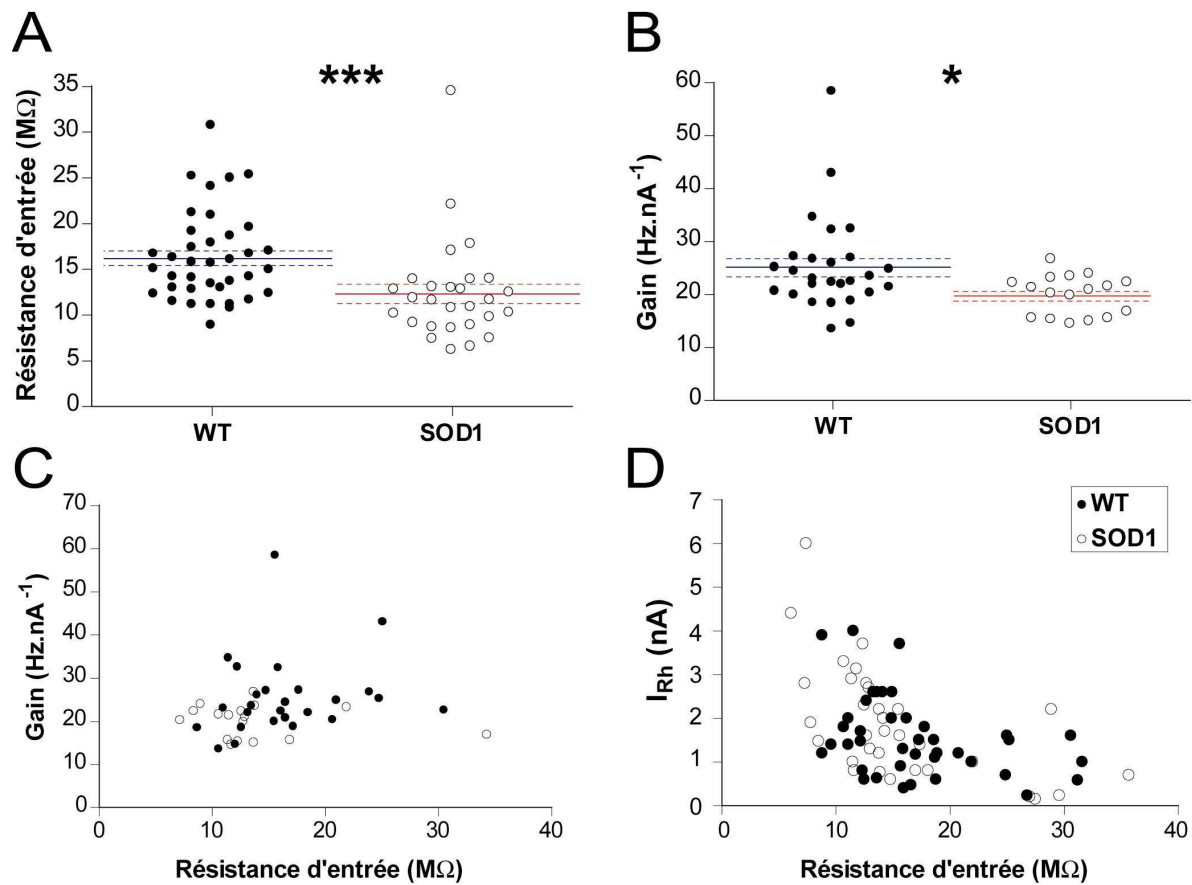


Figure 21 : La résistance d'entrée (R_{in}) et le gain des motoneurones SOD1 sont plus faibles en 2^{ème} semaine postnatale par rapport aux motoneurones WT. Graphiques montrant les valeurs de R_{in} (A) et de gain (B) pour les motoneurones WT et SOD1 à P7-P10. Pour chaque graphe, les cercles représentent les valeurs individuelles de chaque motoneurone et pour chaque population, le trait plein représente la moyenne et les traits pointillés le s.e.m. C- Graphiques représentant le gain en fonction de la résistance d'entrée des motoneurones. Les cercles noirs symbolisent les valeurs individuelles des motoneurones WT et les blancs des motoneurones SOD1. Ces paramètres ne sont pas corrélés dans aucune des deux lignées (test non paramétrique de Spearman ; $P=0,17$ pour les WT et $P=0,86$ pour les SOD1). D - Graphiques représentant le courant de rhéobase en fonction de la résistance d'entrée des motoneurones. Les cercles noirs symbolisent les valeurs individuelles des motoneurones WT et les blancs des motoneurones SOD1. Ces paramètres sont corrélés pour les motoneurones des deux lignées (test non paramétrique de Spearman ; $P=0,008^{**}$ pour les WT, $r=-0,42$; $P<0,001^{***}$ pour les SOD1 ; $r=-0,67$).

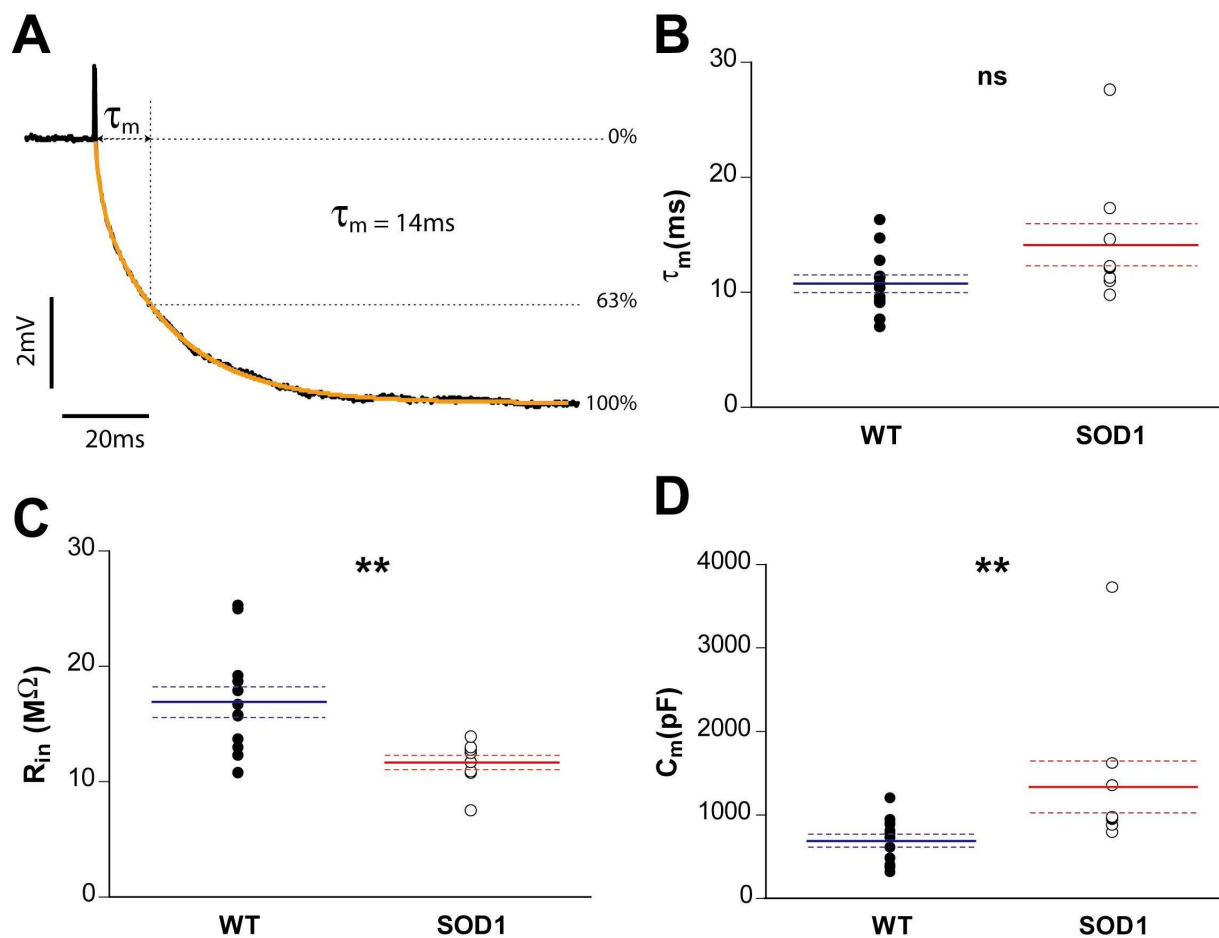


Figure 22 : Comparaison des caractéristiques biophysiques membranaires des motoneurones WT et SOD1 en 2^{ème} semaine postnatale. A – Variation de voltage enregistrée dans un motoneurone SOD1 à P8 soumis à un créneau de courant négatif de 0,5nA. La réponse du motoneurone suit un décours exponentiel. Pour ce motoneurone la constante de temps (τ_m) est de 14 ms et correspond au temps que le potentiel de membrane met pour atteindre 63% de la déflexion de voltage. B – Valeurs des (τ_m) pour les motoneurones WT et SOD1. C – Valeurs des résistances d’entrée des MNs pour lesquels les mesures de (τ_m) ont été réalisées. D – Valeurs des capacités membranaires calculées à partir des valeurs expérimentales de R_{in} et de (τ_m). Pour les graphes B, C et D, les cercles noirs symbolisent les valeurs individuelles des motoneurones WT et les blancs des motoneurones SOD1. Les traits pleins représentent la moyenne et les traits pointillés les s.e.m. de chaque lignée. (ns=non significatif ; ** $P < 0,01$. test non paramétrique de Mann Whitney).

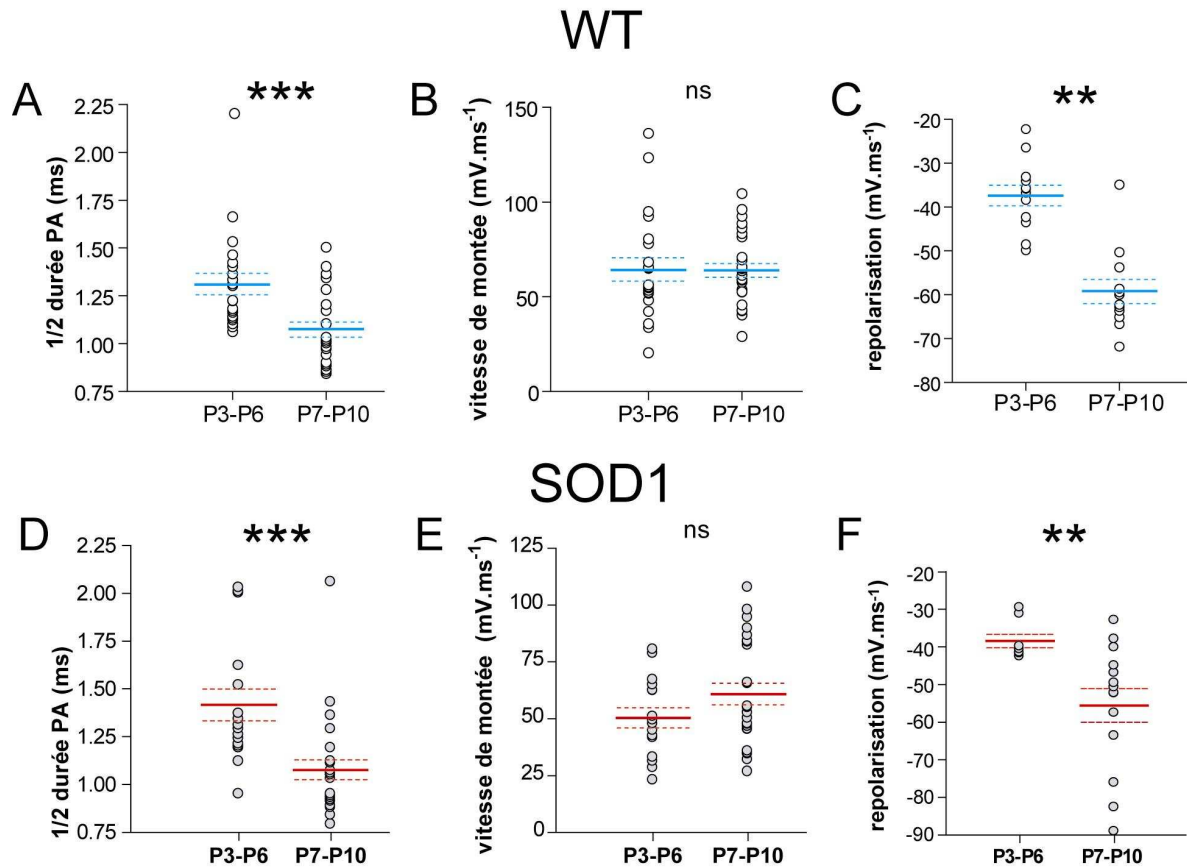


Figure 23 : Evolution des caractéristiques du potentiel d'action antidromique des motoneurones WT et SOD1 entre la 1^{ère} semaine et la 2^{ème} semaine postnatale. Pour les motoneurones WT (A-C) et les motoneurones SOD1 (D-F), les données sont comparées entre les deux groupes d'âge. A et D - évolution de la demi-durée. B et E - évolution de la vitesse de dépolarisation. C et F - évolution de la vitesse de repolarisation. Pour chaque graphe, les cercles représentent les valeurs individuelles de chaque motoneurone. A chaque tranche d'âge le trait plein représente la moyenne et les traits pointillés le s.e.m. (ns=non significatif ; ** P<0,01 ; *** P<0,001. Test non paramétrique de Mann Whitney).

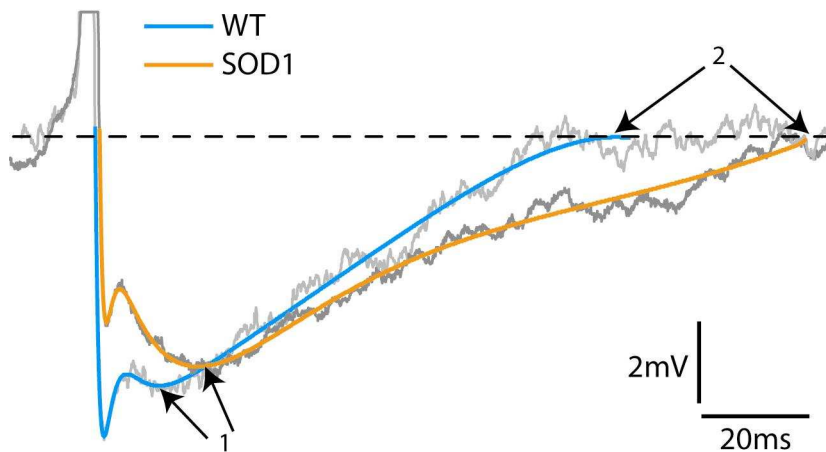


Figure 24 : l'AHP des motoneurones WT et SOD1 est différente en 1^{ère} semaine postnatale. Cette figure illustre l'AHP de motoneurones WT (bleu) et SOD1 (orange) à P4. Ces deux exemples sont les plus représentatifs dans cette tranche d'âge en termes de durée, d'amplitude ainsi que du moment où le maximum d'amplitude de l' AHP est atteint. Le temps du maximum d'amplitude (1) et la durée de l'AHP (2) sont montrés par les flèches pour les deux motoneurones. A P3-P6, ces deux caractéristiques sont statistiquement différentes entre les motoneurones des deux lignées (table 4).

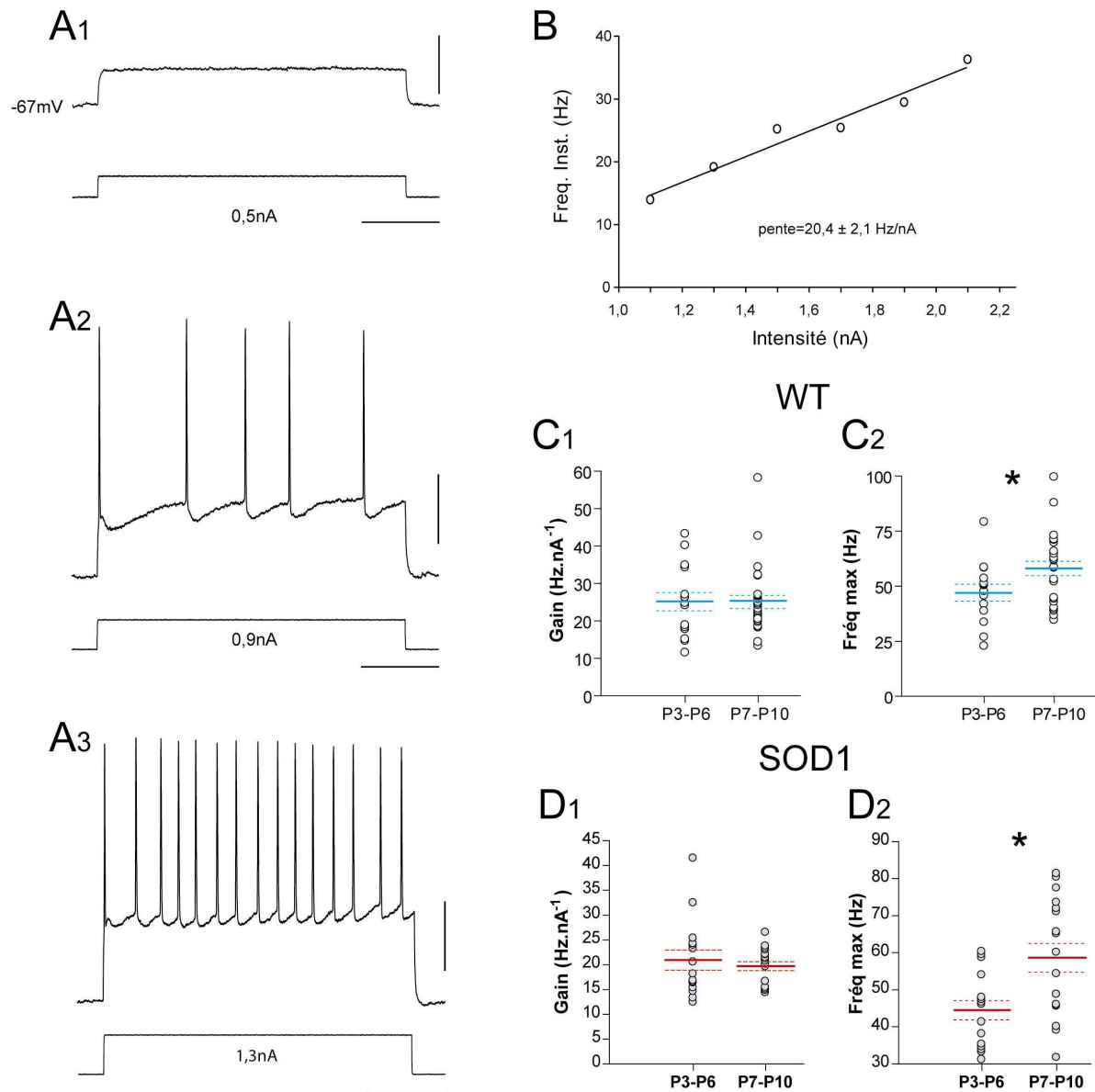


Figure 25 : Evolution du gain et de la fréquence de décharge des motoneurones WT et SOD1 entre la 1^{ère} semaine et la 2^{ème} semaine postnatale. A1-A3. Exemple de réponses enregistrées dans un motoneurone WT à P8 lors d'injections de créneaux de courant d'intensité croissante. Même échelle pour les 3 graphes : 20 mV et 200 ms. B – Relation intensité de courant – fréquence de décharge mesurée sur les 500 dernières millisecondes du créneau de courant pour le motoneurone illustré en A. La pente de la régression linéaire donne le gain du motoneurone. C – D. Evolution du gain (C1) et de la fréquence maximale de décharge (C2) pour les motoneurones WT et SOD1 (D1 et D2) entre la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine postnatale. Pour (C) et (D), les cercles représentent les valeurs individuelles de chaque motoneurone. A chaque tranche d'âge le trait plein représente la moyenne et les traits pointillés le s.e.m. (ns=non significatif ; * P<0,05 ; test non paramétrique de Mann Whitney).

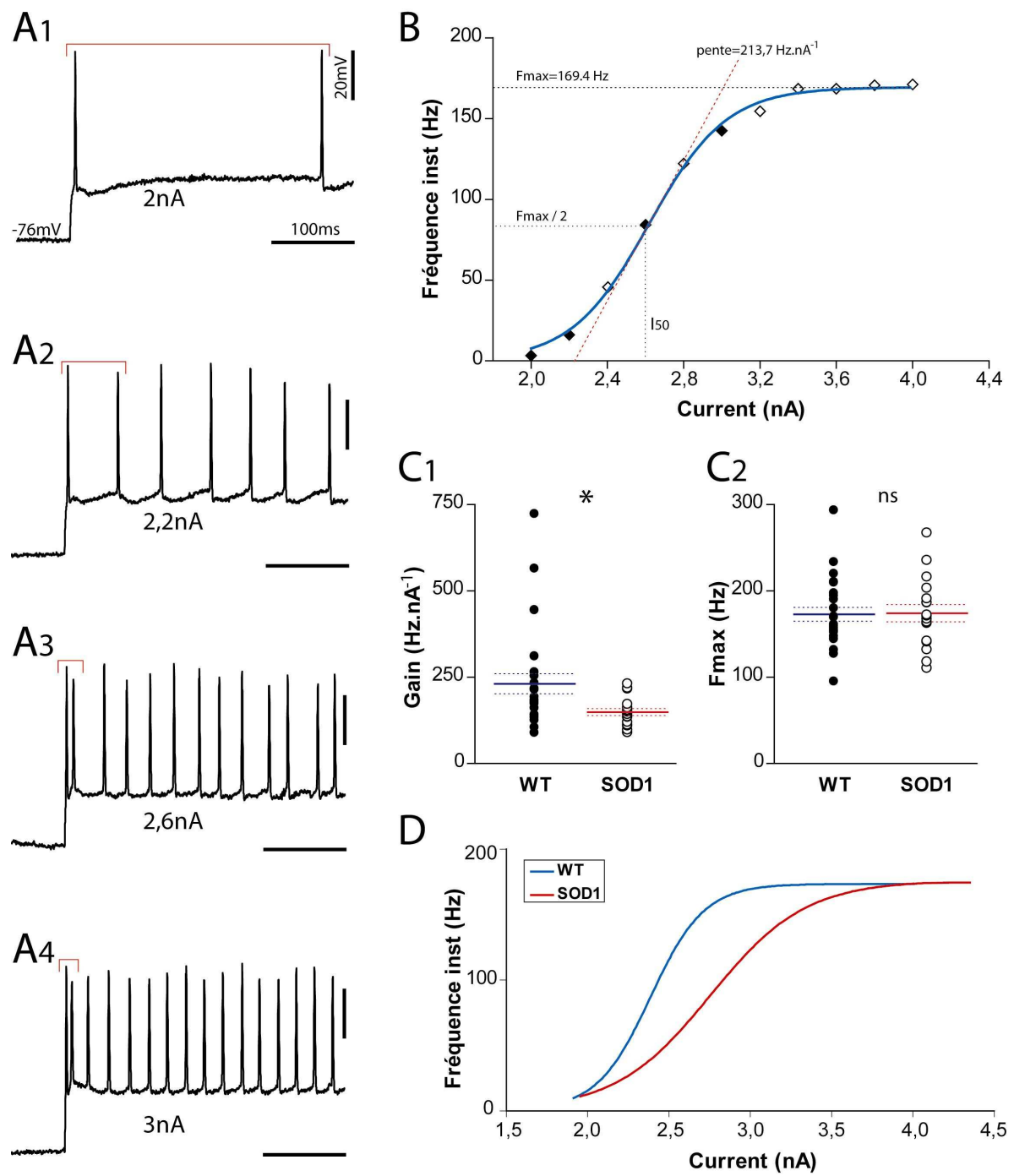


Figure 26 : Relations I-F établies à partir de la fréquence instantanée des deux premiers potentiels d'action des motoneurones WT et SOD1 en 2^{ème} semaine postnatale.

A1-A4. Exemple de réponses enregistrées dans un motoneurone WT à P8 suite à l'injection de créneaux de courant d'intensité croissante. Calibrations : 20 mV et 100 ms pour les 4 graphes. Pour chaque intensité de courant, seule la fréquence instantanée entre les 2 premiers PA est prise en compte pour construire la courbe I-F. Les fluctuations sur l'amplitude des PA sont dues au mode d'enregistrement en DCC. B – Relation I-F pour le motoneurone illustré en A. Cette relation vérifie une courbe sigmoïde. La pente mesurée lors de l'accélération de la fréquence représente le gain du motoneurone. Les losanges noirs représentent les valeurs mesurées sur les tracés de A1 à A4. C - comparaison du gain (C1) et de la fréquence maximale de décharge (C2) pour les motoneurones WT et SOD1 à P7-P10. Les cercles représentent les valeurs individuelles de chaque motoneurone. Les traits pleins représentent la moyenne et les traits pointillés les s.e.m. (ns=non significatif ; * $P < 0,05$; test non paramétrique de Mann Whitney). D – Relations I-F théoriques générées avec les valeurs moyennes de chaque lignée pour le gain, la fréquence maximale de décharge et le I_{50} (intensité à laquelle le motoneurone décharge à une fréquence égale à la moitié de la fréquence maximale).

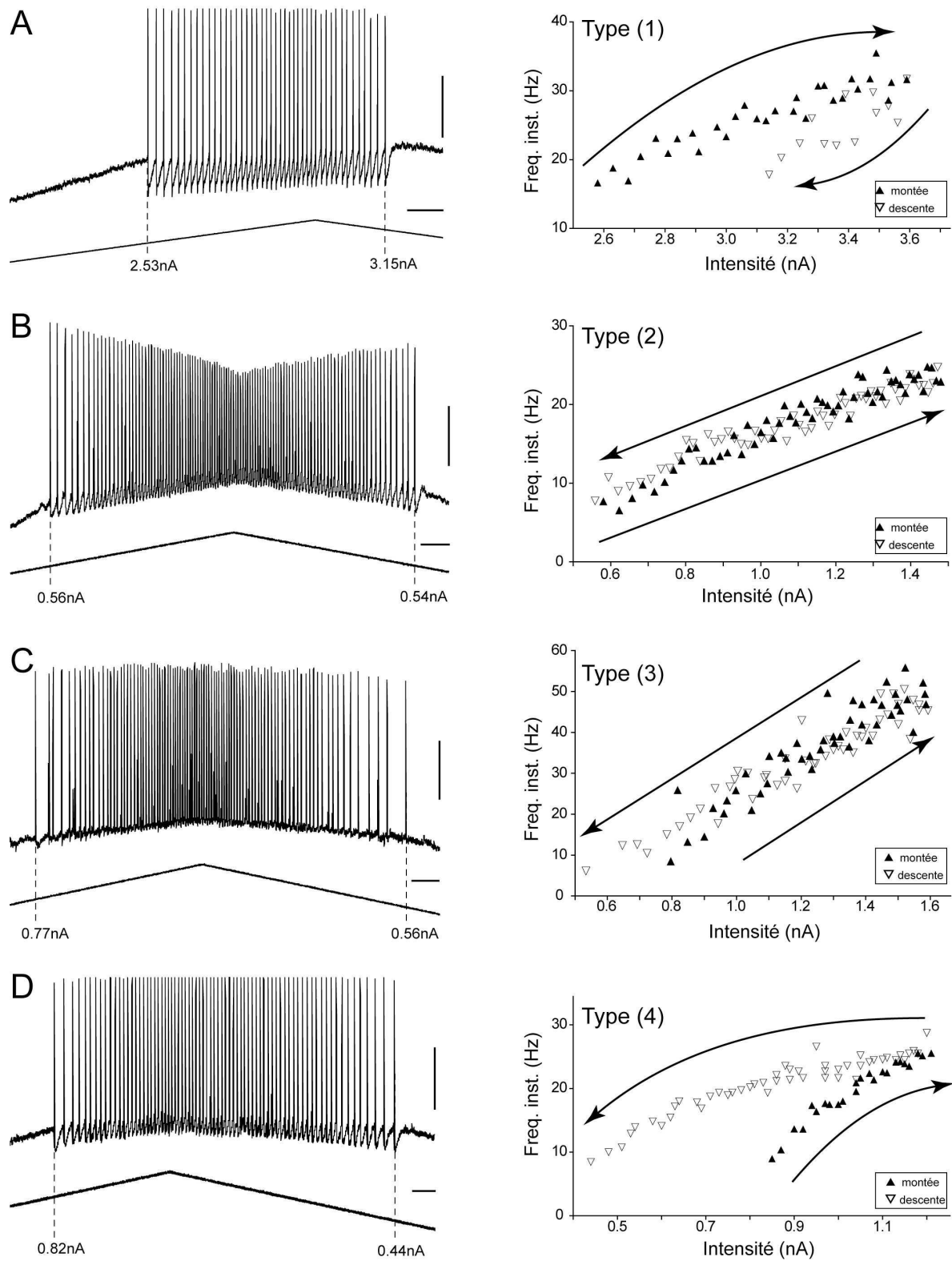


Figure 27 : Les protocoles de stimulation en rampe induisent 4 types de décharge pour les motoneurones WT et SOD1.

A –D. Réponses de 4 motoneurones à l'injection de courants triangulaires. Les intensités de courant lors du premier et du dernier PA ($I_{\text{début}}$ et I_{fin}) sont données sous les lignes pointillées. Pour chaque type de réponse, la fréquence instantanée est représentée en fonction de l'intensité du courant injecté. A – hystérésis de type « clock-wise » enregistrée dans un motoneurone à P9. Noter l'adaptation et l'arrêt de la décharge lors de la phase descendante pour une intensité de courant élevée. Calibrations : 250 ms et 20mV. B- Réponse linéaire enregistrée dans un motoneurone à P7. Les fréquences de décharge sont équivalentes lors des rampes montante et descendante. Calibrations : 500ms et 20mV. C- Réponse linéaire avec une décharge prolongée lors de la repolarisation enregistrée dans un motoneurone à P7. Les fréquences de décharge sont équivalentes lors des rampes montante et descendante. Calibrations : 250ms et 20mV. D – hystérésis de type « counter clock-wise » enregistrée dans un motoneurone à P9. Pour des intensités de courant équivalentes, la fréquence de décharge est supérieure lors de la phase descendante. Calibrations : 250ms et 20mV. Pour les représentations en A et D, les PA sont tronqués.

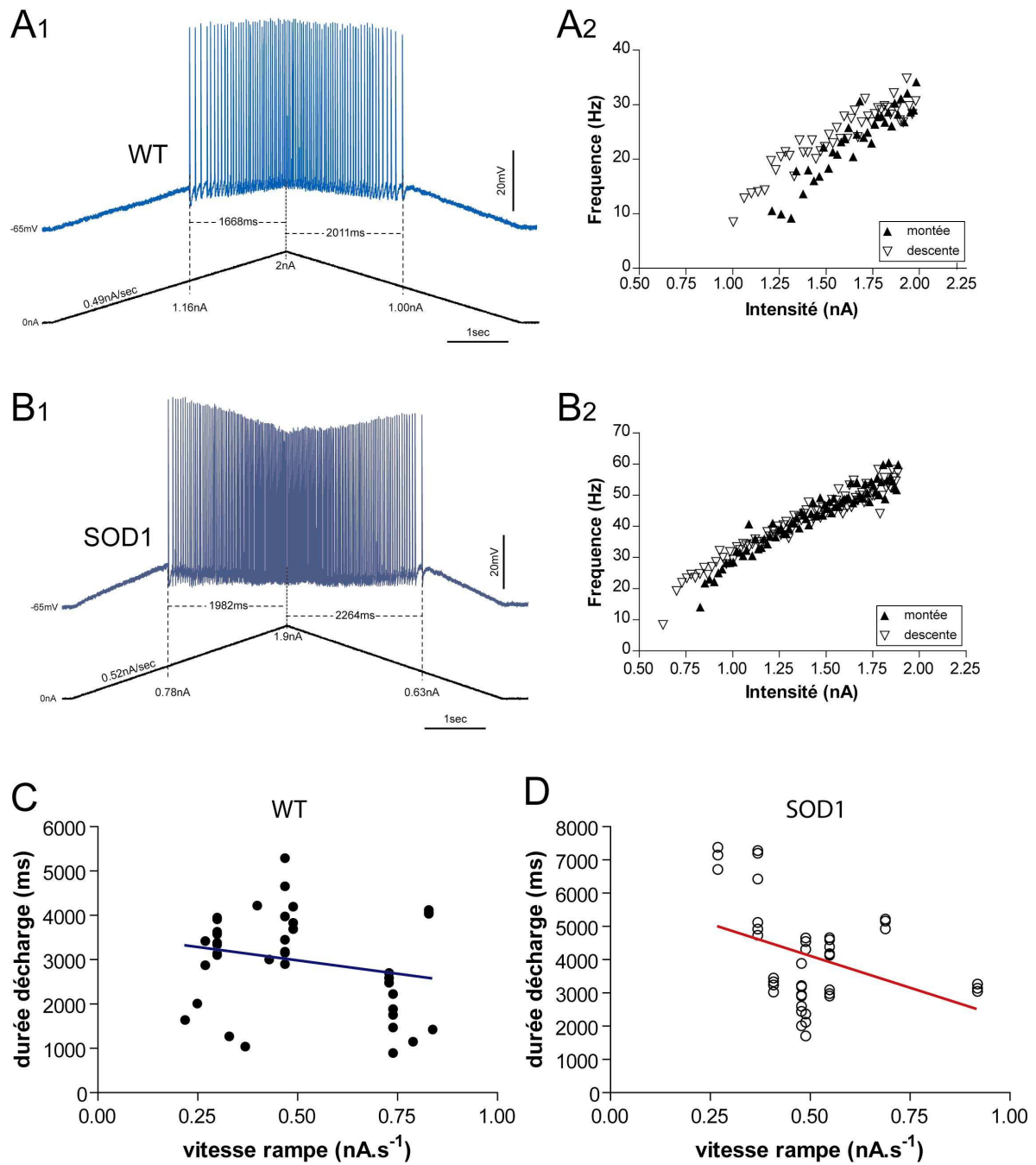
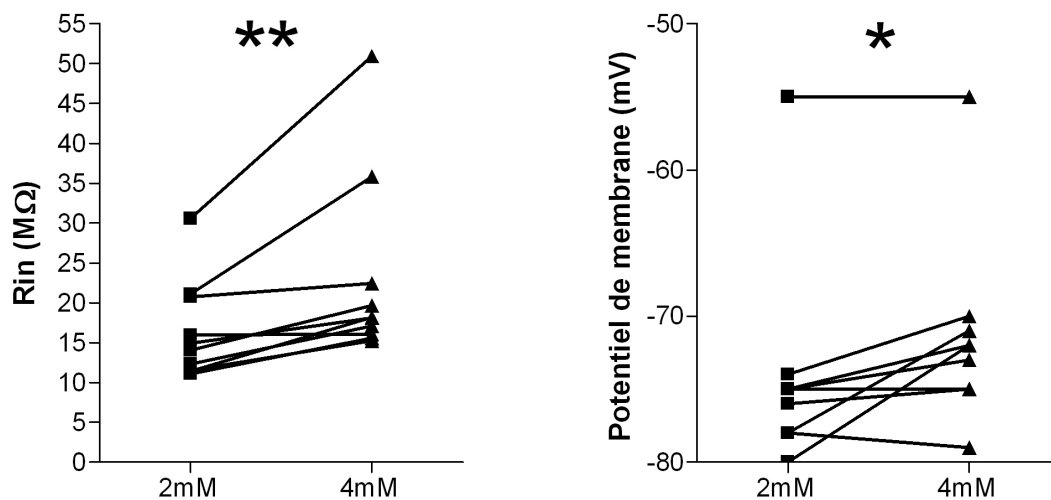


Figure 28 : A P7-P10, les protocoles de stimulation en rampe de vitesse lente induisent des décharges plus longues pour les motoneurons SOD1.

Réponses enregistrées pour un motoneurone WT à P8 (A) et un motoneurone SOD1 à P7 (B) soumis à une rampe de vitesse comparable. Les vitesses des rampes sont indiquées sur la partie montante. Les valeurs des intensités de courant lors du 1^{er} et du dernier PA sont données sous les lignes en pointillé. Le motoneurone SOD1 décharge plus longtemps lors des phases ascendante et descendante de la rampe (valeurs données sous le train de potentiels d'action). Les graphes en A2 et B2 illustrent la fréquence instantanée en fonction de l'intensité du courant injecté. La fréquence de décharge atteinte au sommet de la rampe est supérieure pour le motoneurone SOD1. C et D représentent respectivement pour les motoneurones WT et SOD1 les durées de décharge en fonction de la vitesse de la rampe. Alors que ces paramètres ne sont pas corrélés pour les motoneurones WT ($P=0,17$; $r=-0,22$; test de Pearson), la corrélation est significative pour les motoneurones SOD1 ($P=0,01$ * ; $r=-0,39$; test de Pearson). Pour chaque graphe, les cercles représentent les valeurs individuelles des motoneurones soumis à un protocole de stimulation en rampe.



MOTONEURONES WT	(2mM)	—————▶	(4mM)	
Potentiel de repos (mV)	$-72,8 \pm 2,5$	————▶	$-71,3 \pm 2,2$	*
Résistance d'entrée (MΩ)	$16,4 \pm 2$	————▶	$22,9 \pm 3,7$	**
<i>Cellules (n)</i>	<i>(10)</i>		<i>(10)</i>	

Figure 29 –Modification du potentiel de repos et de la résistance d'entrée des motoneurones par le calcium extracellulaire. Valeurs individuelles des dix motoneurones WT enregistrés dans un milieu avec une concentration extracellulaire de calcium passée de 2 mM à 4 mM. Pour la R_{in} l'augmentation est effective pour tous les motoneurones alors que le changement de calcium ne modifie pas le potentiel de membrane pour un motoneurone et hyperpolarise un second. Les huit restants sont tous dépolarisés lors de l'augmentation de la concentration de calcium. Les données sont comparées avec un *t*-test pour séries appariées.

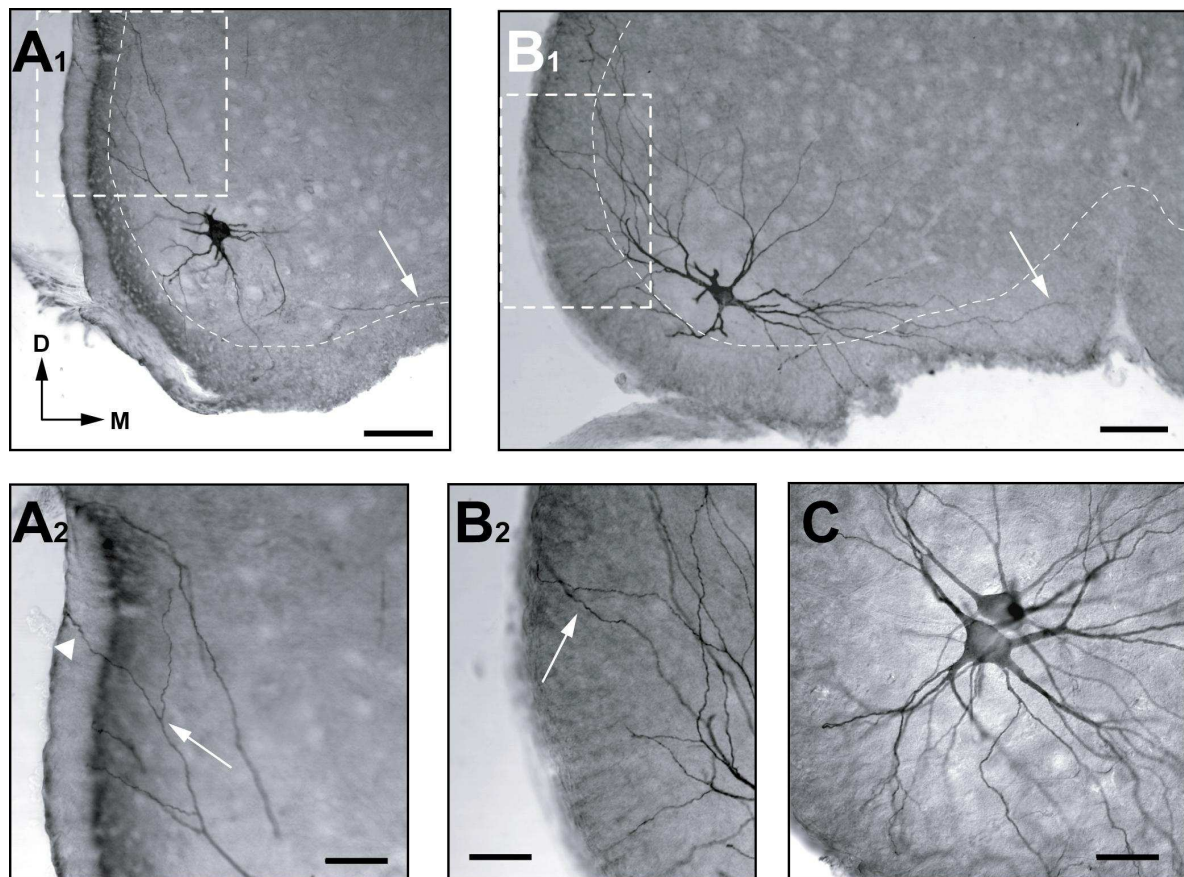


Figure 30 – Images digitales de motoneurones WT et SOD1 après injection intracellulaire de neurobiotine. A1-B1 – Images d’un motoneurone de chaque lignée (WT: A1 et SOD1: B1) représenté avec la même échelle à partir des sections transversales contenant le soma (section de 75 μ m d’épaisseur). Ces motoneurones représentent pour chaque lignée le motoneurone avec le plus grand nombre de points de branchement (Mn8 et Mn14 dans les tables). Beaucoup de segments dendritiques projetant dans l’épaisseur de la coupe sont coupés proche du soma et ne sont pas visibles dans les sections transversales illustrées. Les flèches blanches pointent des segments dendritiques qui projettent en direction de la ligne médiane. Les zones encadrées par les pointillés blancs montrent des dendrites proches du bord latéral des coupes et sont illustrées à plus fort grossissement en A2 et B2. La limite entre la substance blanche et la substance grise est symbolisée par la fine ligne pointillée. Calibrations : 100 μ m pour les deux illustrations. D = dorsal et M = médian. A2 - B2 – zones encadrées de A1 et B1 illustrées à plus fort grossissement. Les flèches blanches pointent des segments dendritiques qui projettent à proximité du bord latéral de la coupe et qui pénètrent la substance blanche. La pointe en A2 montre un segment dendritique visualisé dans l’épaisseur de la coupe. Calibrations : 50 μ m pour les deux illustrations. C – Exemple de marquage multiple faisant suite à un seul protocole d’injection intracellulaire de neurobiotine, WT à P9. Calibration : 25 μ m.

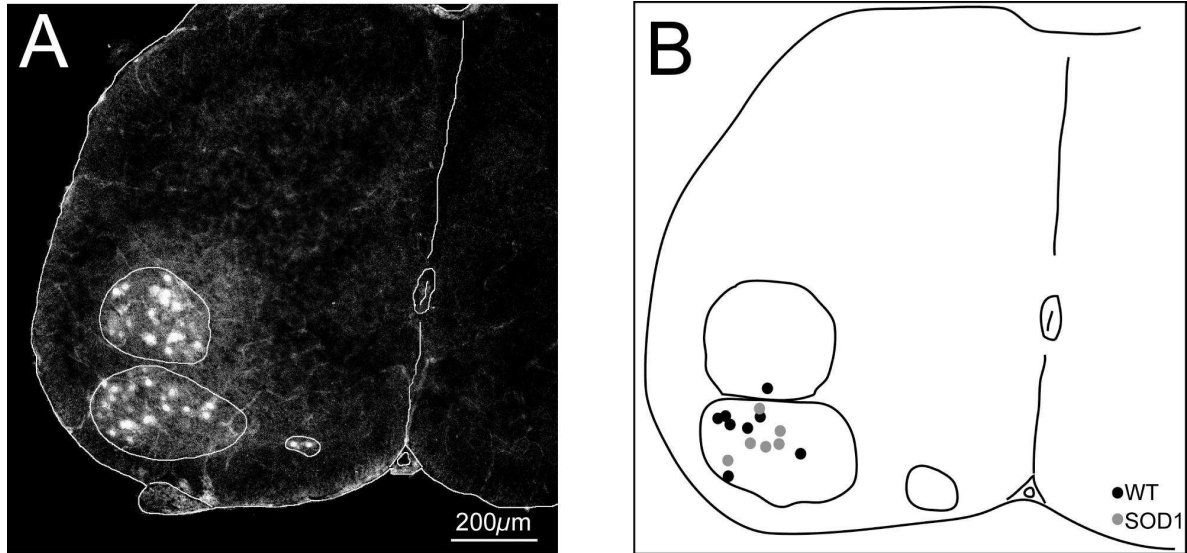


Figure 31 – Localisation au sein du segment L5 des motoneurones reconstruits en 3D. A – Caractérisation de trois pools de motoneurones au sein du segment L5 après marquage rétrograde à la rhodamine-dextran. Noter que le pool le plus médian est beaucoup plus petit que les deux autres et contient beaucoup moins de motoneurones. Cette image est obtenue à partir d'un marquage rétrograde de la racine L5 d'une préparation WT (Obj: 10x. Longueur d'onde du laser pour exciter la rhodamine = 543nm, section optique de 18 μm, microscope confocal, Olympus FV500). B – Représentation schématique d'une section de moelle dans le plan transversal illustrant la localisation au sein du segment L5 des 14 corps cellulaires des motoneurones reconstruits en 3D à P8-P9. Tous les motoneurones sont localisés dans la même région bien qu'un motoneurone WT a été enregistré un peu plus dorsalement à la limite du pool ventro-latéral.

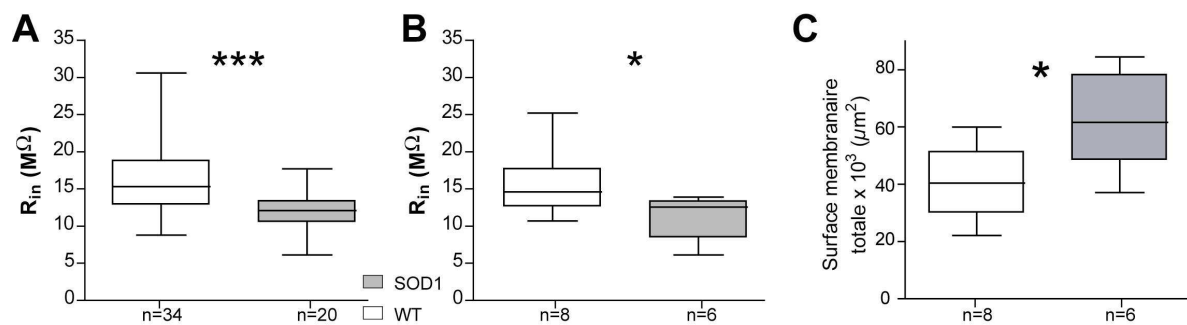


Figure 32 – Diagrammes de distribution des résistances d’entrée et des surfaces membranaires totales des motoneurones à P8-P9. Pour chaque diagramme, la boîte est délimitée par le premier et le troisième quartile et traversée par la valeur de la médiane. Les deux barres horizontales représentent les valeurs extrêmes de chaque distribution. A – Diagrammes de distribution des résistances d’entrée de tous les motoneurones WT et SOD1 enregistrés à P8-P9. La différence est hautement significative ($P=0,0004$ ***). B – Diagrammes de distribution des résistances d’entrée des motoneurones WT et SOD1 reconstruits en 3D à P8-P9. La différence est significative ($P=0,04$ *). Cette figure illustre le fait que pour chaque lignée l’échantillon des motoneurones reconstruits est représentatif de la population entière de motoneurones en terme de résistance d’entrée. C – Diagrammes de distribution des surfaces membranaires totales (soma + dendrites) des motoneurones WT et SOD1 reconstruits en 3D à P8-P9. La différence est significative ($P=0,01$ *).

(* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; test non paramétrique exact de permutation).

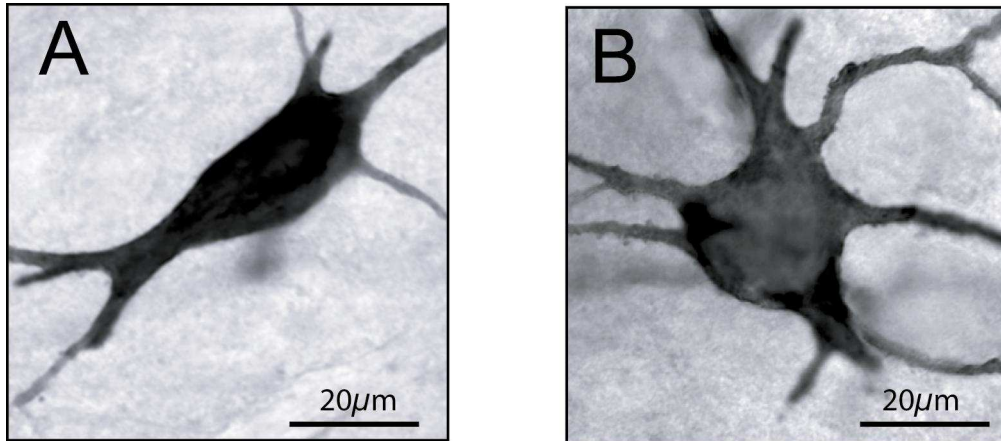


Figure 33 – Morphologie des corps cellulaires des motoneurones. Cette figure présente deux extrêmes en terme de forme du corps cellulaire. Le motoneurone illustré en A (Mn8) présente un soma fusiforme très allongé. D’ailleurs les valeurs de $Frt_{\min} = 28 \mu\text{m}$ et $Frt_{\max} = 40,3 \mu\text{m}$ sont très éloignées. Cet exemple pose le problème de la difficulté de la délimitation entre le corps cellulaire et la base d’une dendrite. Au contraire le motoneurone illustré en B (Mn6) a un soma multipolaire avec une forme plutôt arrondie et les valeurs de $Frt_{\min} = 31,3 \mu\text{m}$ et $Frt_{\max} = 35,8 \mu\text{m}$ sont comparables. Les deux formes de corps cellulaires sont retrouvées dans les motoneurones des deux lignées. Le fait que pour les motoneurones reconstruits les valeurs des Frt_{\min} et Frt_{\max} ne soient pas différentes suggère que la forme des motoneurones WT et SOD1 est comparable. Les corps cellulaires sont représentés à la même échelle. Images digitales obtenues à partir des sections transversales.

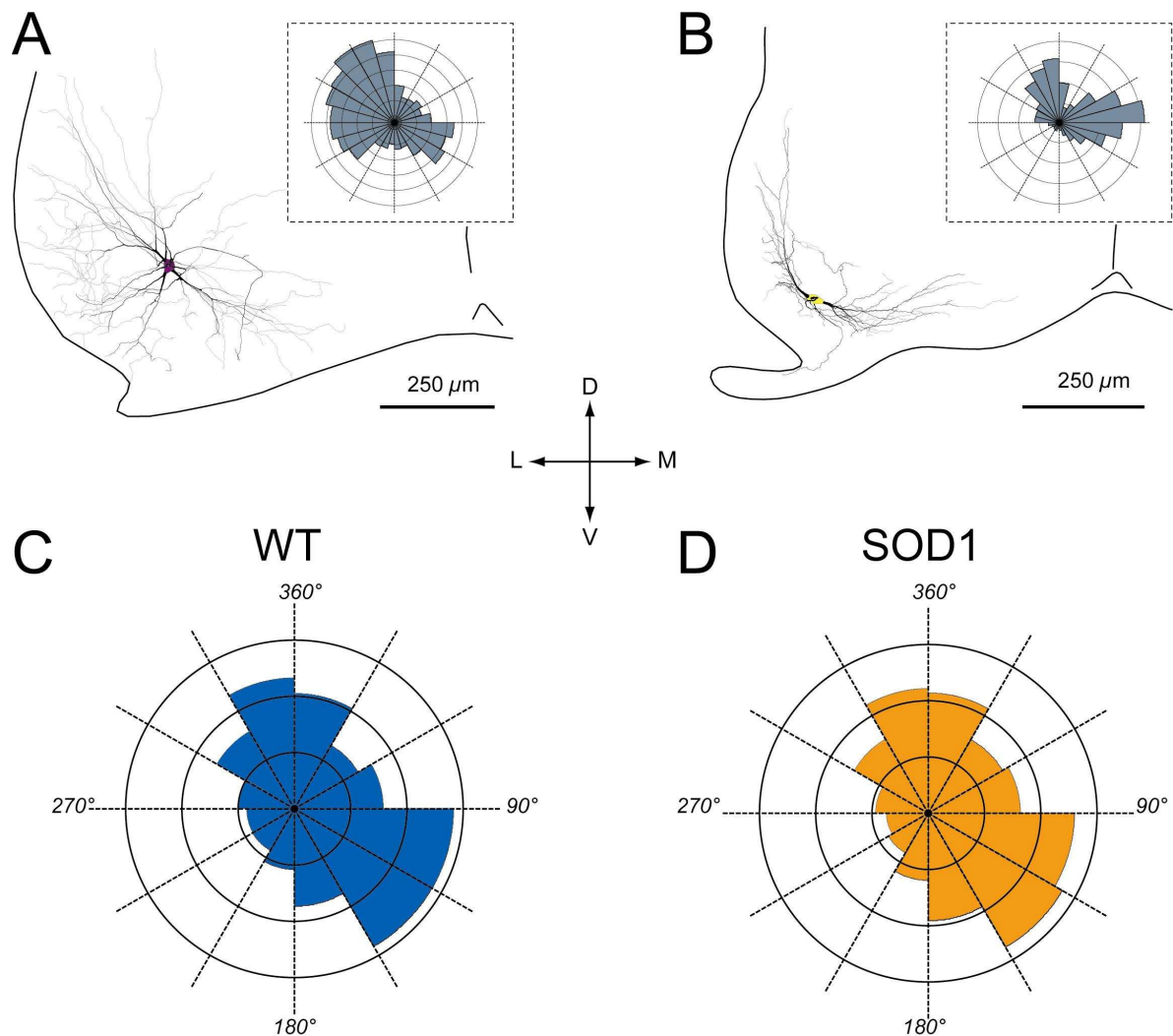


Figure 34 – Direction de la croissance dendritique des motoneurones. Les motoneurones illustrés en A (Mn5) et B (Mn2) ont été choisis car la position du corps cellulaire au niveau du pool moteur est centrale pour le motoneurone en A alors que le soma du motoneurone en B est positionné beaucoup plus latéralement. Cette différence influence la direction de la pousse dendritique comme le montrent les histogrammes polaires des arborisations dendritiques représentés dans les encarts en pointillés. C et D – Histogramme polaire “moyen” pour les motoneurones WT (C) et SOD1 (D) générés en prenant en compte les arborisations dendritiques de tous les motoneurones de chaque lignée. Chaque section de 30° représente la somme des longueurs de tous les segments dendritiques orientés dans cette direction exprimée en pourcentage de la longueur totale de tous les segments dendritiques des motoneurones (un cercle concentrique représente 5%). L’orientation de la pousse dendritique est comparable entre les 2 lignées et suggère que les motoneurones comparés sont fonctionnellement homogènes.

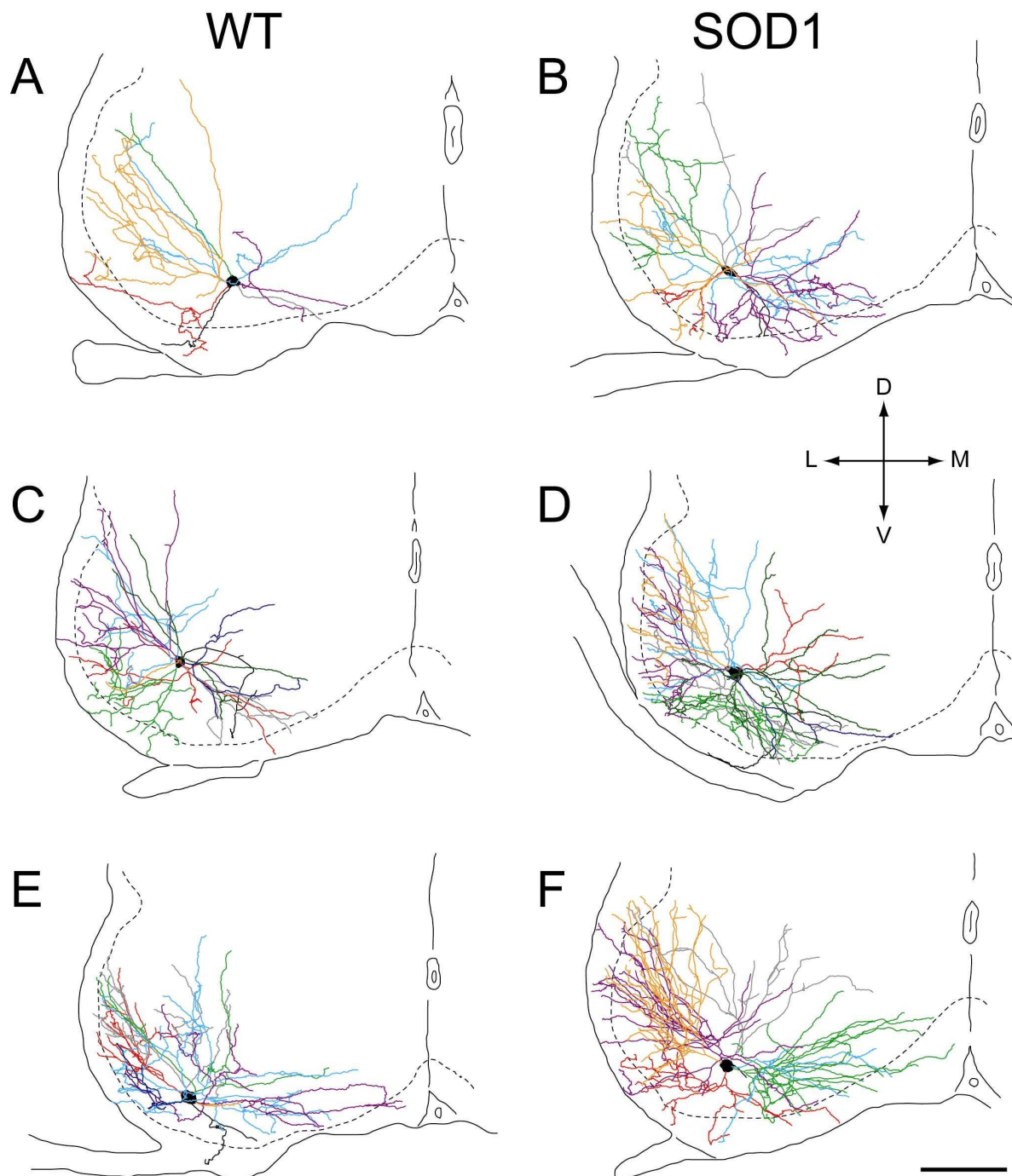


Figure 35 – Représentation schématique de six motoneurones reconstruits en 3D. Les reconstructions digitales complètes de motoneurones WT (A, C, E) et de motoneurones SOD1 (B, D, F) sont représentées dans le plan transversal. Pour la comparaison entre WT et SOD1, les motoneurones avec un nombre de points de branchement croissant sont illustrés dans cette figure. A et B représentent les deux motoneurones de chaque lignée avec le plus faible nombre de points de branchement, C et D ceux avec un nombre de points de branchement le plus proche des valeurs médianes, et E et F représentent les motoneurones avec le plus grand nombre de points de branchement. Dans tous les cas, les motoneurones SOD1 ont un nombre de points de branchement plus important (voir table 10) et ont donc des arborisations dendritiques plus complexes. Tous les motoneurones sont localisés dans la partie ventro-latérale de la corne ventrale. Chaque dendrite est représentée par une couleur différente et tous les motoneurones sont illustrés à la même échelle (200 μm). D = dorsal, V = ventral, L = latéral et M = médian. (A = Mn1, B = Mn9, C = Mn5, D = Mn11, E = Mn8 et F = Mn14 dans les tables).

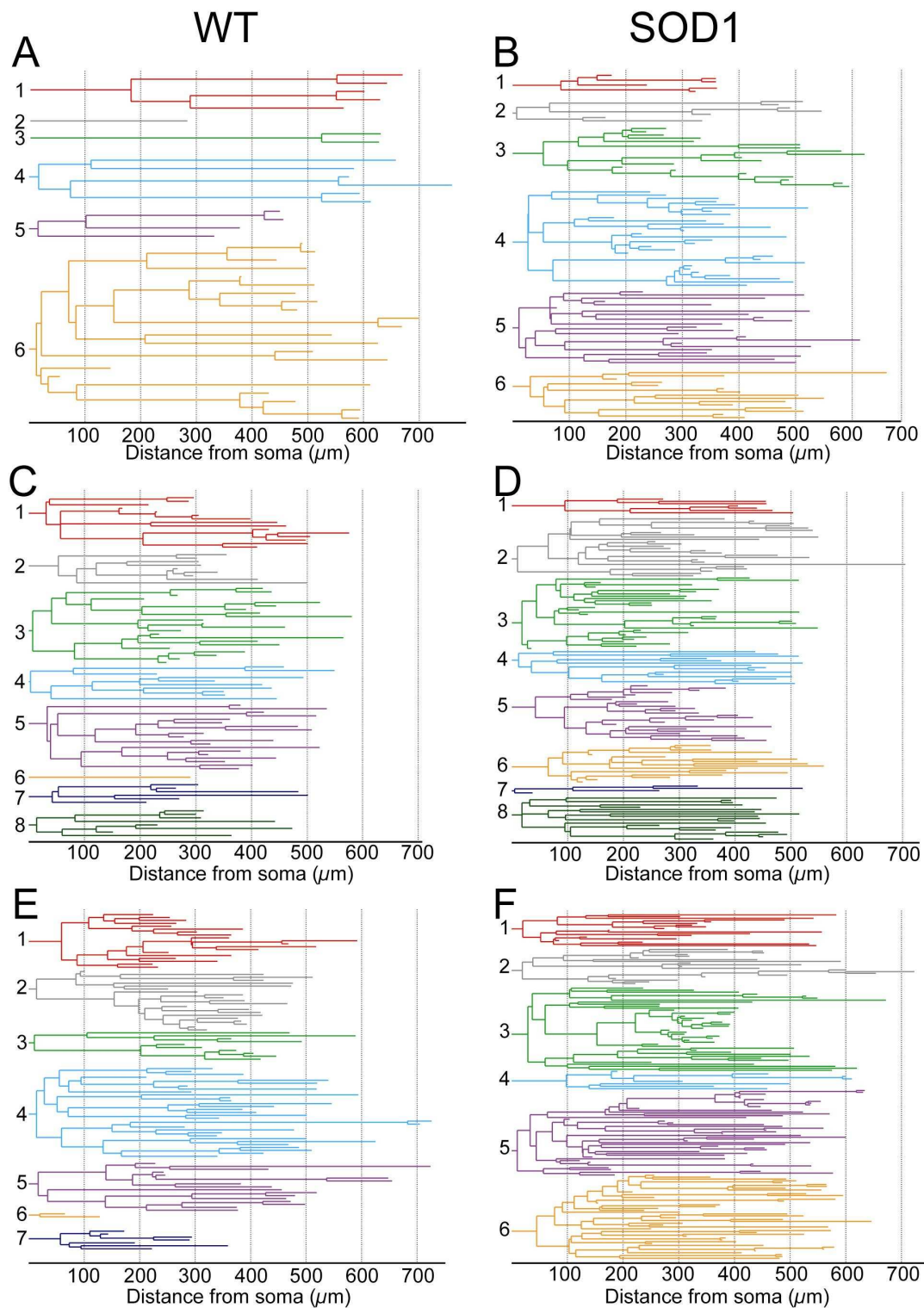


Figure 36 – Représentation schématique 2D des arborisations dendritiques des motoneurones (dendrogrammes). Les dendrogrammes présentés dans cette figure sont obtenus à partir des motoneurones illustrés dans la figure 35 et sont comparés deux à deux. Dans tous les cas, les dendrites extrêmement connectées sont plus nombreuses dans les motoneurones SOD1, bien que les longueurs des segments dendritiques du soma aux terminaisons pour chaque arborisation soient comparables. Comme dans la figure 35, chaque dendrite est représentée par une couleur différente et les longueurs dendritiques ont été portées en fonction de la distance au soma (en μm). Les dendrogrammes sont représentés à la même échelle.

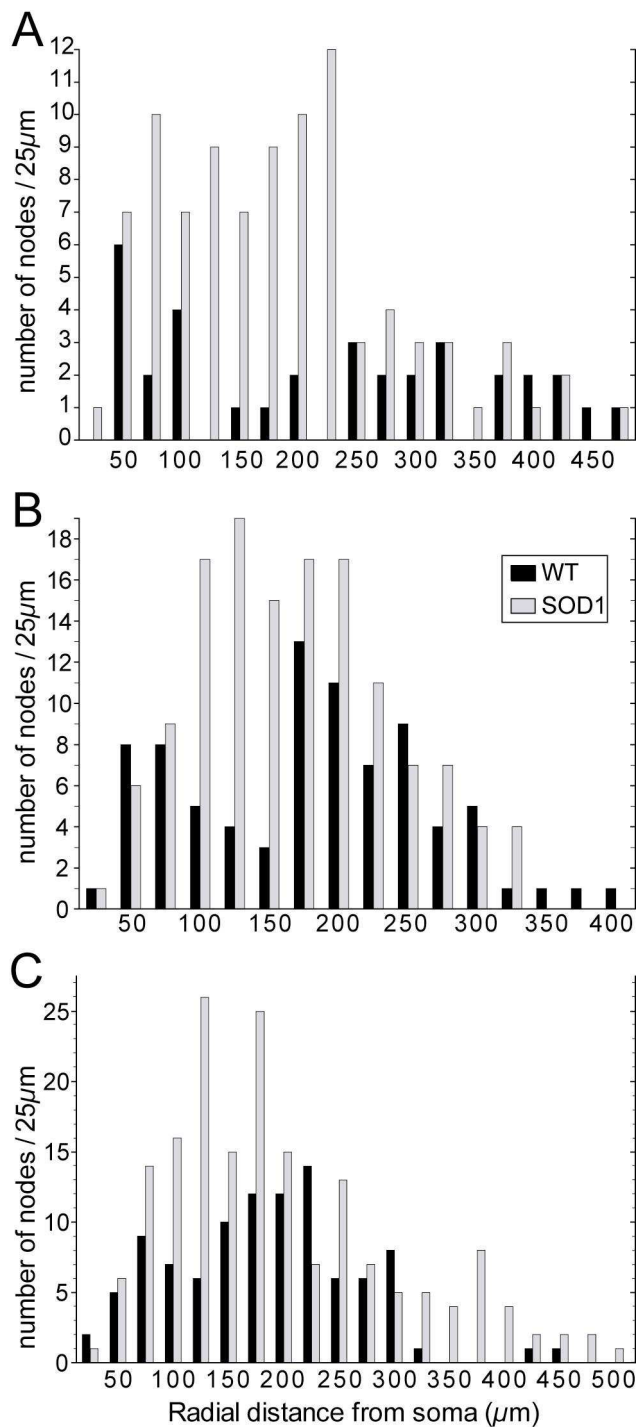
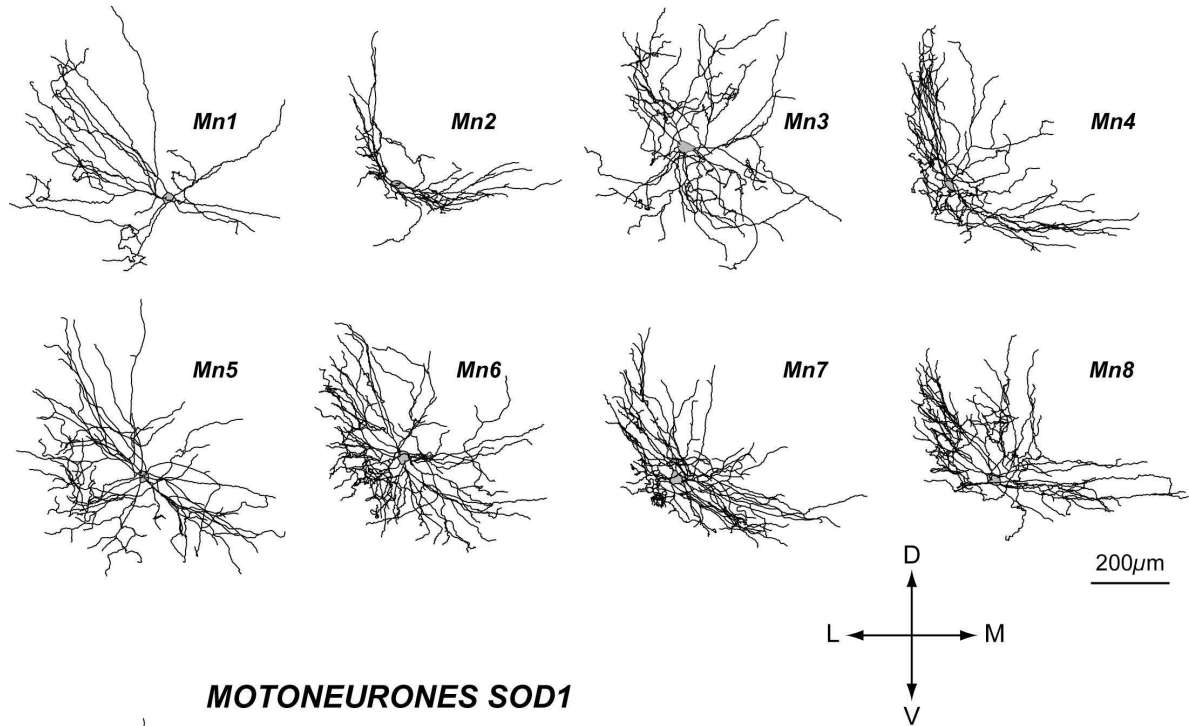


Figure 37 – Diagrammes de Sholl du nombre de points de branchement des arborisations dendritiques des six motoneurons illustrés précédemment. Pour des comparaisons entre les 2 lignées, les motoneurons sont représentés par paire sur un même graphique en fonction du nombre de points de branchement. (A) représente les valeurs pour les motoneurons avec le moins de points de branchement pour chaque lignée. (B) représente les valeurs pour les deux motoneurons les plus proches des valeurs médianes et (C) représente les valeurs pour les motoneurons les plus connectés de chaque lignée. Ces diagrammes illustrent en fonction de la distance euclidienne au soma le nombre de points de branchement des arborisations dendritiques afin de donner leurs localisations radiales. Des sections de 25µm ont été utilisées pour construire ces graphiques. Ces graphiques montrent la plus grande occurrence des points de branchement dans les motoneurons SOD1 avec les plus grandes différences observées entre 100 µm et 200 µm du soma.

MOTONEURONES WT



MOTONEURONES SOD1

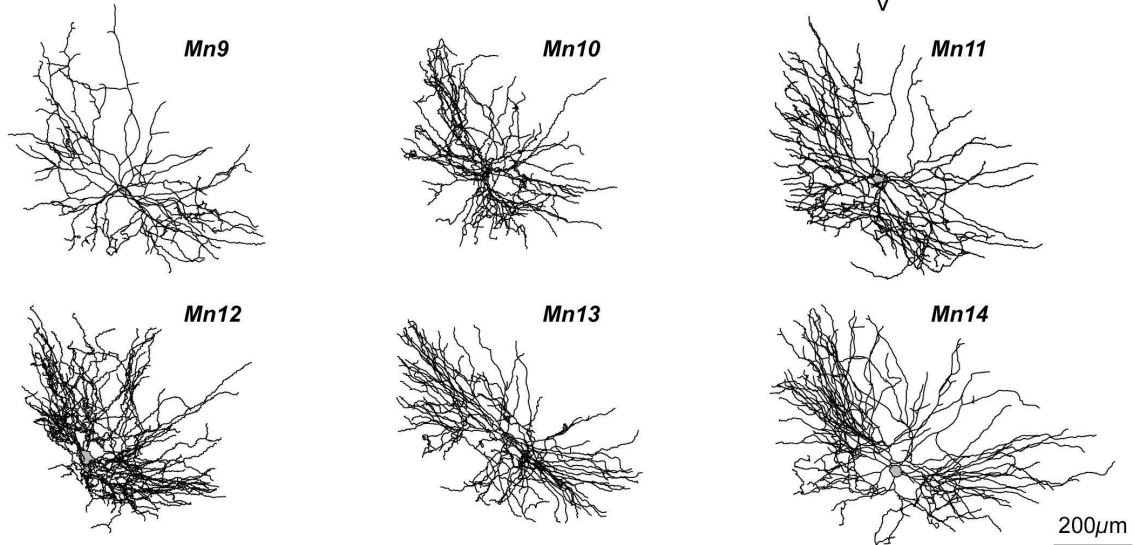


Figure 38 – Représentation schématique de tous les motoneurones reconstruits en 3D à P8-P9. Toutes les reconstructions digitales des motoneurones WT et SOD1 sont illustrées à la même échelle dans le plan transversal (calibration : 200 µm). D = dorsal, V = ventral, L = latéral et M = médian. Pour compléter la lecture des tables, les n° des motoneurones sont donnés dans cette figure.

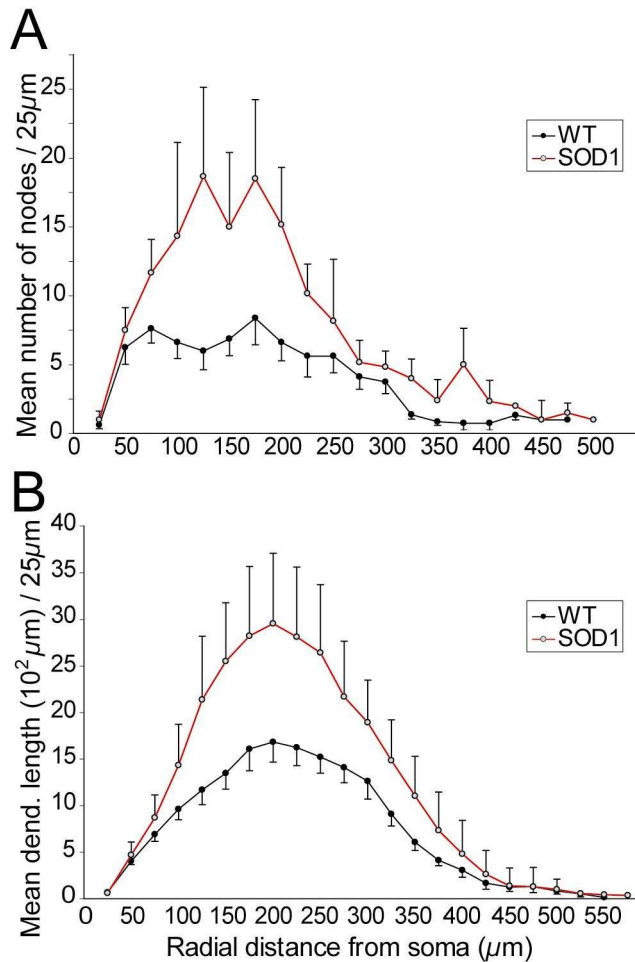


Figure 39 – Histogrammes représentant la distribution radiale du nombre de points de branchement (A) et des longueurs dendritiques (B) des motoneurons WT (n=8) et SOD1 (n=6). La moyenne du nombre de points de branchement et des longueurs dendritiques a été portée en fonction de la distance euclidienne au soma (section de 25 µm) afin de comparer les distributions radiales autour du soma dans les deux lignées. Les deux histogrammes montrent clairement la plus grande occurrence de points de branchement ainsi qu’une plus grande longueur dendritique des motoneurons SOD1 par rapport aux WT indépendamment de la région péri-somatique considérée. Les plus grandes différences sont observées pour les zones entre 100 µm et 200 µm autour du soma en (A) et autour de 200µm en (B). Les barres verticales représentent les s.d. pour chaque section de 25 µm.

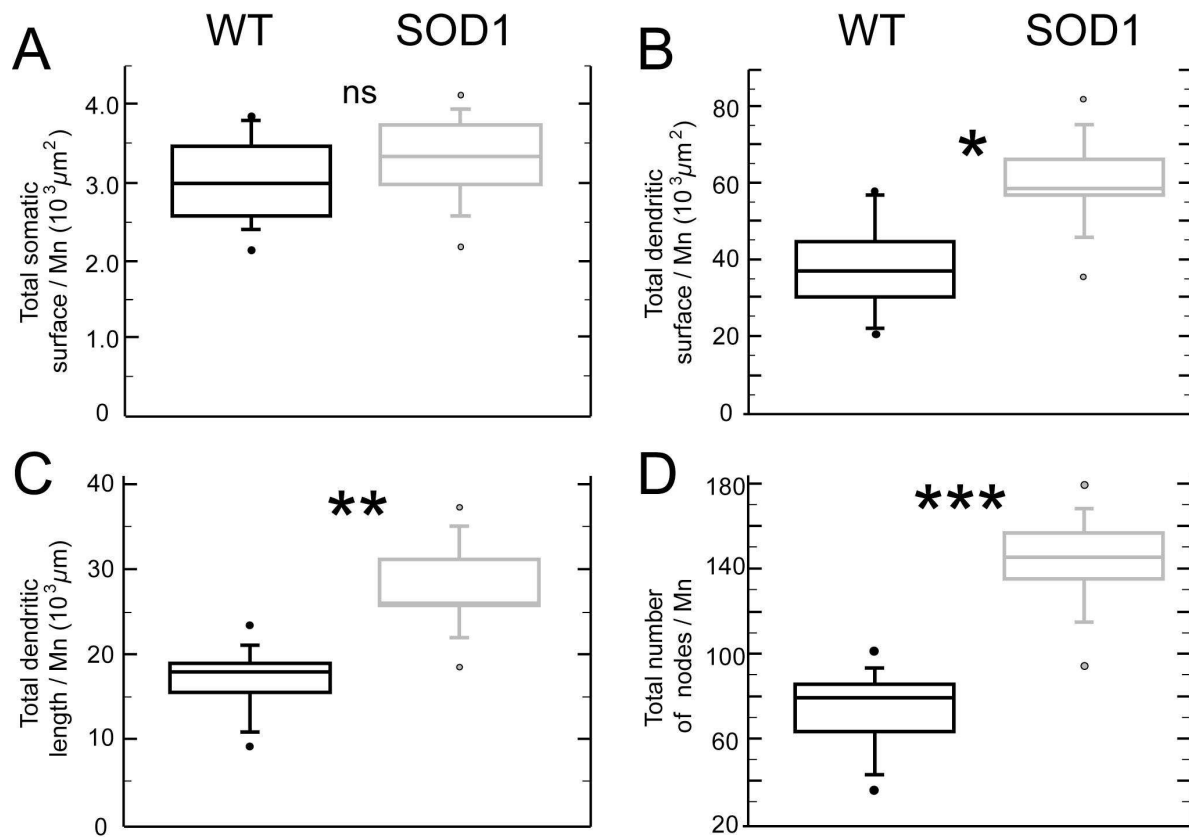


Figure 40 – Diagrammes de distribution des paramètres morphométriques des motoneurones WT et SOD1. Distribution des valeurs de surface somatique (A), surface dendritique totale (B), longueur dendritique totale (C) et du nombre total de points de branchement pour les motoneurones WT et SOD1. Chaque boîte est délimitée par le premier et le troisième quartile et traversée par la médiane. Les extrémités des barres sont les premier et neuvième déciles. Enfin les cercles sont les valeurs minimales et maximales de chaque échantillon. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; test non paramétrique exact de permutation).

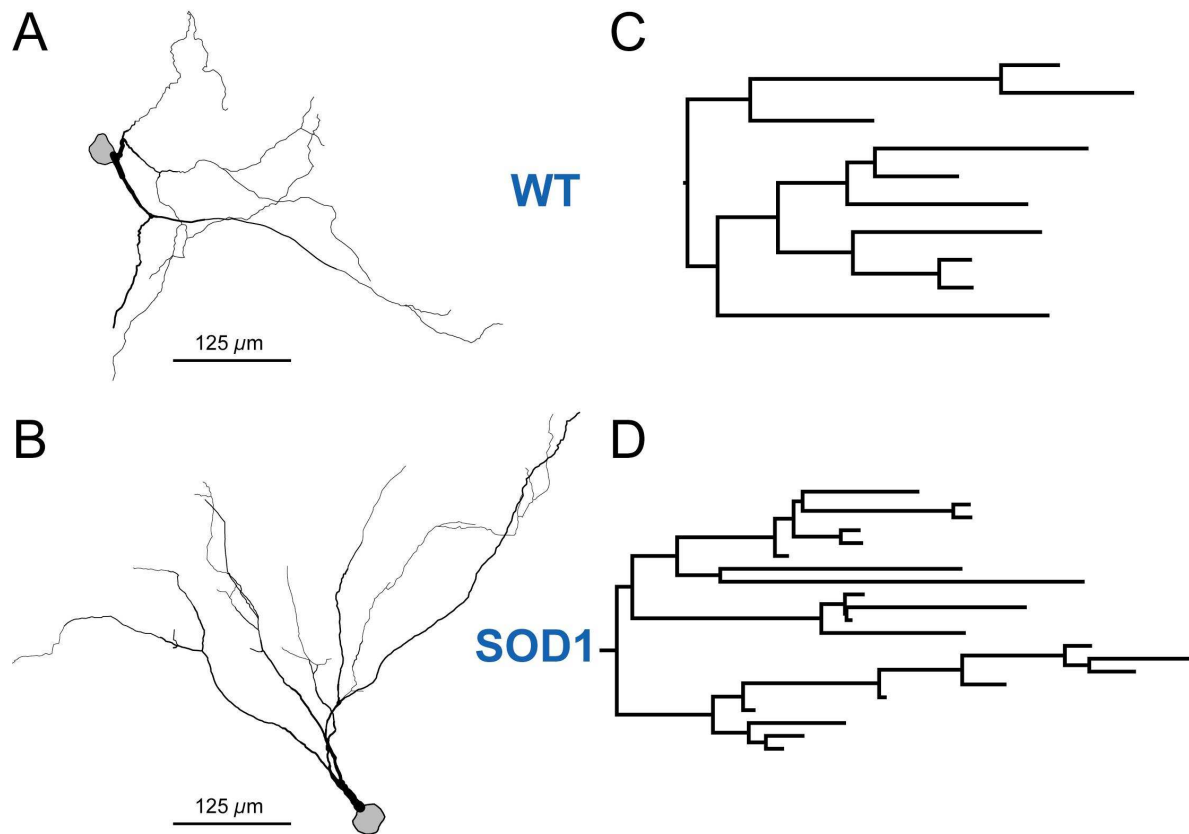


Figure 41 – Dendrites représentatives des motoneurones WT et SOD1. A et B – Les dendrites choisies pour illustrer les différences entre les motoneurones WT et SOD1 sont les plus représentatives de chaque population avec dans les deux cas un nombre de points de branchement et une longueur dendritique les plus proches des valeurs médianes de chaque lignée. Le dendrogramme en D illustre la tendance des dendrites SOD1 à multiplier le nombre de segments dendritiques. On peut noter le grand nombre de segments terminaux très courts par rapport au dendrogramme illustré en C.

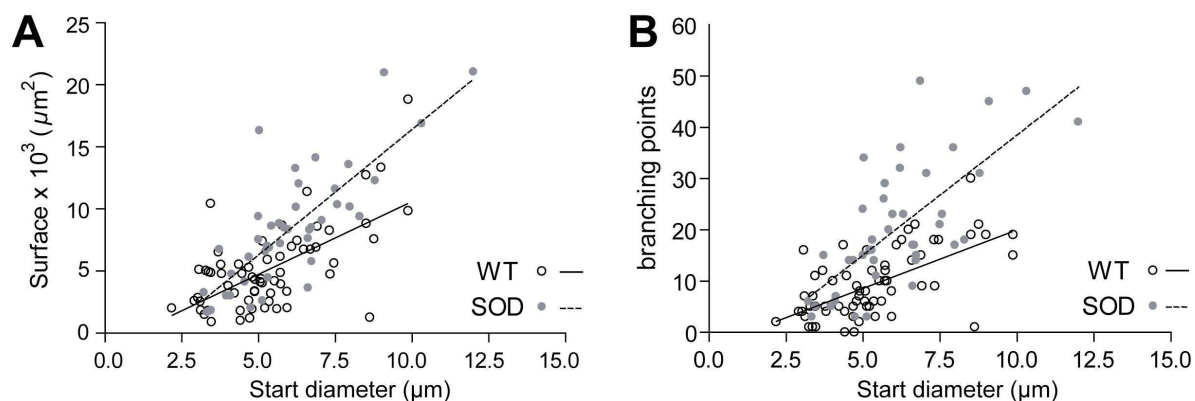


Figure 42 – Relation entre le diamètre de base des dendrites primaires et la surface ou la complexité des branches dendritiques. A et B – Graphiques de la surface dendritique (A) et du nombre de points de branchement (B) par dendrites représentés en fonction de leur diamètre de base. Pour chaque graphe les cercles représentent les valeurs individuelles pour une branche dendritique indépendamment du motoneurone dont elle provient. A – Pour la taille (surface membranaire), la relation est plus puissante pour les dendrites des motoneurones SOD1 (test de Pearson : WT, $P < 0,0001^{***}$, $r = 0,62$; SOD1 : $P < 0,0001^{***}$ $r = 0,79$). B – Pour la complexité (nombre de points de branchement), la relation est plus puissante pour les dendrites des motoneurones SOD1 (test de Pearson : WT, $P < 0,0001^{***}$, $r = 0,64$; SOD1 : $P < 0,0001^{***}$ $r = 0,71$). Pour A et B les pentes des régressions linéaires sont significativement différentes entre les dendrites des motoneurones WT et SOD1 et presque deux fois plus importantes chez les SOD1.

TABLES

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
<u>Retournement</u>	<i>WT</i>	45.9	45.9	64.9	78.4	97.3	100	100					
	<i>SOD1</i>	18.9	18.9	18.9	45.9	59.5	83.8	100					
	<i>P</i>	*	*	***	**	***	*						
<u>Evitement à-pic</u>	<i>WT</i>	59.5	51.4	64.9	78.4	100							
	<i>SOD1</i>	75.7	89.2	94.6	94.6	100							
	<i>P</i>	<i>ns</i>	***	**	<i>ns</i>								
<u>Agrippement avant</u>	<i>WT</i>	97.3	100										
	<i>SOD1</i>	100	100										
	<i>P</i>	<i>ns</i>											
<u>Placement avant</u>	<i>WT</i>	0	0	10.8	70.3	97.3	100						
	<i>SOD1</i>	0	0	5.4	89.2	100	100						
	<i>P</i>			<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>							
<u>Agrippement arrière</u>	<i>WT</i>	0	0	2.7	21.6	83.8	97.3	100	100	100	100	100	
	<i>SOD1</i>	0	0	0	10.8	24.3	48.6	50	75	75	91.7	100	
	<i>P</i>			<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	***	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		
<u>Placement arrière</u>	<i>WT</i>	0	2.2	8.7	21.7	37	43.5	67.4	78.3	87	100	100	
	<i>SOD1</i>	0	0	0	7.1	21.4	25	46.4	57.1	81.8	89.3	100	
	<i>P</i>		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	*		
<u>Placement vibrisses</u>	<i>WT</i>	0	0	2.7	2.7	27	37.8	46.2	100				
	<i>SOD1</i>	0	0	0	24.3	56.8	78.4	83.3	100				
	<i>P</i>			<i>ns</i>	**	**	***	<i>ns</i>					
<u>Extension croisée</u>	<i>WT</i>	100	100	97.8	95.7	78.3	63	34.8	17.4	4.3	0	0	0
	<i>SOD1</i>	100	100	100	90.6	81.1	58.5	43.4	32.1	15.1	11.3	3.8	0
	<i>P</i>			<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	

Table 1 : Résultats des tests sensori-moteurs pendant la période postnatale. Pour les huit tests réalisés, les pourcentages de souris présentant la bonne réponse sont donnés pour chaque test pendant la période postnatale étudiée. Cependant, les tests statistiques ont été réalisés sur les effectifs et non à partir des pourcentages. Test de Fischer exact : *ns*=non significatif ; $P < 0,05$ * ; $P < 0,01$ ** ; $P < 0,001$ ***.

MOTONEURONES WT	P3-P6	P7-P10	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-68,2 ± 0,9 (-68)	-70 ± 1,1 (-70)	<i>ns</i> (0,24)
Résistance d'entrée (MΩ)	17,8 ± 1,7 (17,8)	16,2 ± 0,8 (15,3)	<i>ns</i> (0,30)
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(38)	
PA _{seuil} (mV)	-48,9 ± 1,3 (-48,7)	-48,1 ± 1,2 (-47,7)	<i>ns</i> (0,60)
Courant de rhéobase (nA)	1,2 ± 0,2 (1,1)	1,8 ± 0,2 (1,7)	**
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(29)	
Gain (Hz/nA)	25,2 ± 2,5 (24,8)	25,1 ± 1,7 (22,8)	<i>ns</i> (0,94)
F _{max} (Hz)	47,1 ± 3,8 (49)	58,1 ± 3,2 (58,6)	*
I _{max} (nA)	2,83 ± 0,33 (2,85)	3,53 ± 0,21 (3,4)	<i>ns</i> (0,09)
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(27)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Latence (ms)	1,94 ± 0,22 (1,59)	1,23 ± 0,12 (1,01)	**
Amplitude (mV)	76,3 ± 1,4 (77,1)	82,8 ± 1,8 (82,3)	*
Demi-durée (ms)	1,31 ± 0,06 (1,22)	1,07 ± 0,04 (1,02)	***
Temps de montée (ms)	0,95 ± 0,07 (0,86)	0,91 ± 0,05 (0,80)	<i>ns</i> (0,88)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	64,5 ± 6,9 (55)	64 ± 3,6 (63,3)	<i>ns</i> (0,63)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	144,1 ± 7,7 (138)	166 ± 6,4 (170,2)	*
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	63,2 ± 2,9 (65,1)	82,1 ± 3,5 (81,2)	***
<i>Cellules (n)</i>	(21)	(27)	
Temps de repol. (ms)	1,70 ± 0,15 (1,65)	1,12 ± 0,10 (1,00)	***
Vitesse de repol. (mV/ms)	37,4 ± 2,34 (36,46)	59,27 ± 2,74 (61,29)	***
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(12)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	60 ± 1,8 (60,3)	63,8 ± 2,4 (60)	<i>ns</i> (0,54)
Demi-durée (ms)	1,20 ± 0,14 (1,10)	0,89 ± 0,03 (0,90)	**
Temps de montée (ms)	0,67 ± 0,05 (0,60)	0,60 ± 0,03 (0,60)	<i>ns</i> (0,40)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	70,4 ± 6,0 (73,2)	76,9 ± 4,2 (76,8)	<i>ns</i> (0,54)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	123,6 ± 11,36 (130,2)	143,4 ± 10,0 (136,2)	<i>ns</i> (0,40)
Temps de repol. (ms)	1,09 ± 0,13 (1)	0,82 ± 0,04 (0,8)	*
Vitesse de repol. (mV/ms)	48,2 ± 4,9 (49,4)	63,9 ± 1,40 (62,7)	**
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	57 ± 5,4 (56,8)	75,2 ± 2,4 (77,2)	**
<i>Cellules (n)</i>	(7)	(8)	
AHP			
Amplitude (mV)	4,7 ± 0,6 (4,9)	5,4 ± 0,4 (4,8)	<i>ns</i> (0,56)
Durée (ms)	82 ± 7 (80)	95 ± 5 (94)	<i>ns</i> (0,14)
T _{amplitude max} (ms)	12,4 ± 1,6 (12,6)	11,2 ± 1,2 (11,2)	<i>ns</i> (0,42)
Temps de repol. (ms)	69,7 ± 7,2 (68,9)	80,7 ± 4,4 (80,3)	<i>ns</i> (0,17)
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(21)	

Table 2 : Comparaison des propriétés électriques des motoneurones WT entre les deux premières semaines postnatales.

PA_{seuil}, seuil de déclenchement du PA en mV. F_{max}, fréquence maximale de décharge des motoneurones après adaptation lors des injections de créneaux de courant. I_{max}, intensité du créneau de courant pour laquelle le motoneurone atteint sa F_{max}. Les valeurs données dans la table sont la moyenne \pm le s.e.m. suivis entre parenthèses de la valeur de la médiane. Quand les tests statistiques ne donnent pas de différence significative la valeur entre parenthèses est la valeur de la probabilité (P). Les données ont été comparées avec le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01 ;*** P<0,001). Toutes les valeurs ont aussi été comparées avec un test non paramétrique exact de permutation. Les 2 tests ont donné les mêmes résultats excepté pour le courant de rhéobase, la F_{max} et l'amplitude du PA antidromique (P=0,03 * , P=0,006 ** et P=0,008 ** avec le test de permutation).

MOTONEURONES SOD1	P3-P6	P7-P10	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-69,3 ± 1 (-70)	-69,3 ± 1,1 (-70)	<i>ns</i> (0,86)
Résistance d'entrée (MΩ)	21,9 ± 2,7 (17,8)	12,3 ± 1,1 (11,6)	***
<i>Cellules (n)</i>	(20)	(28)	
PA _{seuil} (mV)	-49,8 ± 1,6 (-49,2)	-48,5 ± 1,3 (-49,7)	<i>ns</i> (0,78)
Courant de rhéobase (nA)	1,4 ± 0,2 (1,6)	2,3 ± 0,3 (1,9)	*
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(18)	
Gain (Hz/nA)	20,9 ± 2 (18,1)	19,7 ± 0,9 (20,7)	<i>ns</i> (0,94)
F _{max} (Hz)	44,5 ± 2,6 (46,1)	58,7 ± 3,9 (60,1)	*
I _{max} (nA)	3,15 ± 0,34 (3,47)	3,92 ± 0,35 (3,93)	<i>ns</i> (0,22)
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(17)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Latence (ms)	2,46 ± 0,3 (2,27)	1,19 ± 0,15 (1,08)	***
Amplitude (mV)	75,3 ± 2,5 (73,1)	79,2 ± 2 (80,4)	<i>ns</i> (0,16)
Demi-durée (ms)	1,42 ± 0,08 (1,3)	1,08 ± 0,05 (1,05)	***
Temps de montée (ms)	1,10 ± 0,08 (1,03)	0,95 ± 0,05 (0,91)	<i>ns</i> (0,11)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	50,5 ± 4,4 (48,5)	60,9 ± 4,7 (54,8)	<i>ns</i> (0,15)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	126,8 ± 9,3 (122)	159,3 ± 6,5 (169,1)	**
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	59,3 ± 4,5 (56,4)	79,1 ± 4,4 (82,9)	**
<i>Cellules (n)</i>	(16)	(25)	
Temps de repol. (ms)	1,51 ± 0,09 (1,48)	1,17 ± 0,08 (1,15)	*
Vitesse de repol. (mV/ms)	38,4 ± 1,8 (40,4)	55,6 ± 4,5 (51,6)	**
<i>Cellules (n)</i>	(8)	(14)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	64,4 ± 3,2 (67,4)	65,1 ± 2,3 (64,1)	<i>ns</i> (1)
Demi-durée (ms)	1,26 ± 0,12 (1,3)	0,98 ± 0,07 (0,9)	<i>ns</i> (0,19)
Temps de montée (ms)	0,8 ± 0,08 (0,8)	0,70 ± 0,09 (0,60)	<i>ns</i> (0,44)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	64,9 ± 7,8 (61,4)	69,8 ± 10,6 (82,6)	<i>ns</i> (0,70)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	120,3 ± 15,1 (132)	146,7 ± 13,1 (138,6)	<i>ns</i> (0,30)
Temps de repol. (ms)	1,17 ± 0,14 (1,1)	0,94 ± 0,11 (0,8)	<i>ns</i> (0,30)
Vitesse de repol. (mV/ms)	49,6 ± 6,2 (43,3)	59,8 ± 8,2 (62,1)	<i>ns</i> (0,36)
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	60,5 ± 6,8 (60,6)	72,4 ± 9,5 (74,5)	<i>ns</i> (0,29)
<i>Cellules (n)</i>	(9)	(5)	
AHP			
Amplitude (mV)	5,2 ± 0,4 (5,3)	4,3 ± 0,3 (4)	<i>ns</i> (0,10)
Durée (ms)	110,1 ± 9,6 (100,5)	90,2 ± 6,4 (86,8)	<i>ns</i> (0,09)
T _{amplitude max} (ms)	18,9 ± 1,5 (17,5)	13,7 ± 1,7 (13,3)	*
Temps de repol. (ms)	91,2 ± 8,7 (83,8)	76,4 ± 4,9 (72,5)	<i>ns</i> (0,14)
<i>Cellules (n)</i>	(11)	(15)	

Table 3 : Comparaison des propriétés électriques des motoneurones SOD1 entre les deux premières semaines postnatales. Les valeurs données dans la table sont la moyenne ± le s.e.m. suivis entre parenthèses de la valeur de la médiane. Quand les tests statistiques ne donnent pas de différence significative la valeur entre parenthèses est la valeur de la probabilité (P). Les données ont été comparées avec le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01 ;*** P<0,001). Voir table 2 pour les abréviations.

MOTONEURONES P3-P6	WT	SOD1	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-68,2 ± 0,9 (-68)	-69,3 ± 1 (-70)	<i>ns</i> (0,19)
Résistance d'entrée (MΩ)	17,8 ± 1,7 (17,8)	21,9 ± 2,7 (17,8)	<i>ns</i> (0,21)
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(20)	
PA _{seuil} (mV)	-48,9 ± 1,3 (-48,7)	-49,8 ± 1,6 (-49,2)	<i>ns</i> (0,87)
Courant de rhéobase (nA)	1,2 ± 0,2 (1,1)	1,4 ± 0,2 (1,6)	<i>ns</i> (0,33)
Gain (Hz/nA)	25,2 ± 2,5 (24,8)	20,9 ± 2 (18,1)	<i>ns</i> (0,15)
F _{max} (Hz)	47,1 ± 3,8 (49)	44,5 ± 2,6 (46,1)	<i>ns</i> (0,68)
I _{max} (nA)	2,83 ± 0,33 (2,85)	3,15 ± 0,34 (3,47)	<i>ns</i> (0,36)
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(15)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Latence (ms)	1,94 ± 0,22 (1,59)	2,46 ± 0,3 (2,27)	<i>ns</i> (0,18)
Amplitude (mV)	76,3 ± 1,4 (77,1)	75,3 ± 2,5 (73,1)	<i>ns</i> (0,49)
Demi-durée (ms)	1,31 ± 0,06 (1,22)	1,42 ± 0,08 (1,3)	<i>ns</i> (0,3)
Temps de montée (ms)	0,95 ± 0,07 (0,86)	1,10 ± 0,08 (1,03)	<i>ns</i> (0,1)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	64,5 ± 6,9 (55)	50,5 ± 4,4 (48,5)	<i>ns</i> (0,09)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	144,1 ± 7,7 (138)	126,8 ± 9,3 (122)	<i>ns</i> (0,11)
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	63,2 ± 2,9 (65,1)	59,3 ± 4,5 (56,4)	<i>ns</i> (0,53)
<i>Cellules (n)</i>	(21)	(16)	
Temps de repol. (ms)	1,70 ± 0,15 (1,65)	1,51 ± 0,09 (1,48)	<i>ns</i> (0,67)
Vitesse de repol. (mV/ms)	37,4 ± 2,34 (36,46)	38,4 ± 1,8 (40,4)	<i>ns</i> (0,76)
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(8)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	60 ± 1,8 (60,3)	64,4 ± 3,2 (67,4)	<i>ns</i> (0,25)
Demi-durée (ms)	1,20 ± 0,14 (1,10)	1,26 ± 0,12 (1,3)	<i>ns</i> (0,76)
Temps de montée (ms)	0,67 ± 0,05 (0,60)	0,8 ± 0,08 (0,8)	<i>ns</i> (0,3)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	70,4 ± 6,0 (73,2)	64,9 ± 7,8 (61,4)	<i>ns</i> (0,41)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	123,6 ± 11,36 (130,2)	120,3 ± 15,1 (132)	<i>ns</i> (0,92)
Temps de repol. (ms)	1,09 ± 0,13 (1)	1,17 ± 0,14 (1,1)	<i>ns</i> (0,64)
Vitesse de repol. (mV/ms)	48,2 ± 4,9 (49,4)	49,6 ± 6,2 (43,3)	<i>ns</i> (1)
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	57 ± 5,4 (56,8)	60,5 ± 6,8 (60,6)	<i>ns</i> (0,84)
<i>Cellules (n)</i>	(7)	(9)	
AHP			
Amplitude (mV)	4,7 ± 0,6 (4,9)	5,2 ± 0,4 (5,3)	<i>ns</i> (0,6)
Durée (ms)	82 ± 7 (80)	110,1 ± 9,6 (100,5)	*
T _{amplitude max} (ms)	12,4 ± 1,6 (12,6)	18,9 ± 1,5 (17,5)	*
Temps de repol. (ms)	69,7 ± 7,2 (68,9)	91,2 ± 8,7 (83,8)	<i>ns</i> (0,12)
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(11)	

Table 4 : Comparaison des propriétés électriques des motoneurones WT et SOD1 pendant la première semaine postnatale. Les valeurs données dans la table sont la moyenne ± le s.e.m. suivis entre parenthèses de la valeur de la médiane. Quand les tests statistiques ne donnent pas de différence significative la valeur entre parenthèses est la valeur de la probabilité (P). Les données ont été comparées avec le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01 ;*** P<0,001). Voir table 2 pour les abréviations.

MOTONEURONES P7-P10	WT	SOD1	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-70 ± 1,1 (-70)	-69,3 ± 1,1 (-70)	<i>ns</i> (0,64)
Résistance d'entrée (MΩ)	16,2 ± 0,8 (15,3)	12,3 ± 1,1 (11,6)	***
<i>Cellules (n)</i>	(38)	(28)	
Constante de temps (ms)	10,8 ± 0,8	14,1 ± 1,8	<i>ns</i> (0,06)
Capacité membranaire (pF)	692 ± 78	1338 ± 310	**
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(9)	
PA _{seuil} (mV)	-48,1 ± 1,2 (-47,7)	-48,5 ± 1,3 (-49,7)	<i>ns</i> (0,74)
Courant de rhéobase (nA)	1,8 ± 0,2 (1,7)	2,3 ± 0,3 (1,9)	<i>ns</i> (0,42)
<i>Cellules (n)</i>	(29)	(18)	
Gain (Hz/nA)	25,1 ± 1,7 (22,8)	19,7 ± 0,9 (20,7)	*
F _{max} (Hz)	58,1 ± 3,2 (58,6)	58,7 ± 3,9 (60,1)	<i>ns</i> (0,61)
I _{max} (nA)	3,53 ± 0,21 (3,4)	3,92 ± 0,35 (3,93)	<i>ns</i> (0,61)
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(17)	
Gain [§] (Hz/nA)	231 ± 30 (183)	149 ± 10 (149)	*
f _{max} (Hz)	173 ± 8 (161)	174 ± 10 (171)	<i>ns</i> (0,41)
I ₅₀ (nA)	2,4 ± 0,2 (2,3)	2,7 ± 0,3 (2,6)	<i>ns</i> (0,78)
<i>Cellules (n)</i>	(25)	(17)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Latence (ms)	1,23 ± 0,12 (1,01)	1,19 ± 0,15 (1,08)	<i>ns</i> (0,65)
Amplitude (mV)	82,8 ± 1,8 (82,3)	79,2 ± 2 (80,4)	<i>ns</i> (0,25)
Demi-durée (ms)	1,07 ± 0,04 (1,02)	1,08 ± 0,05 (1,05)	<i>ns</i> (0,99)
Temps de montée (ms)	0,91 ± 0,05 (0,80)	0,95 ± 0,05 (0,91)	<i>ns</i> (0,75)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	64 ± 3,6 (63,3)	60,9 ± 4,7 (54,8)	<i>ns</i> (0,49)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	166 ± 6,4 (170,2)	159,3 ± 6,5 (169,1)	<i>ns</i> (0,49)
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	-82,1 ± 3,5 (81,2)	-79,1 ± 4,4 (82,9)	<i>ns</i> (0,73)
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(25)	
Temps de repol. (ms)	1,12 ± 0,10 (1,00)	1,17 ± 0,08 (1,15)	<i>ns</i> (0,22)
Vitesse de repol. (mV/ms)	-59,27 ± 2,74 (61,29)	-55,6 ± 4,5 (51,6)	<i>ns</i> (0,19)
<i>Cellules (n)</i>	(12)	(14)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	63,8 ± 2,4 (60)	65,1 ± 2,3 (64,1)	<i>ns</i> (0,28)
Demi-durée (ms)	0,89 ± 0,03 (0,90)	0,98 ± 0,07 (0,9)	<i>ns</i> (0,44)
Temps de montée (ms)	0,60 ± 0,03 (0,60)	0,70 ± 0,09 (0,60)	<i>ns</i> (0,53)
Vitesse de dépol. (mV/ms)	76,9 ± 4,2 (76,8)	69,8 ± 10,6 (82,6)	<i>ns</i> (0,72)
Vitesse _{Max} dépol. (mV/ms)	143,4 ± 10,0 (136,2)	146,7 ± 13,1 (138,6)	<i>ns</i> (0,72)
Temps de repol. (ms)	0,82 ± 0,04 (0,8)	0,94 ± 0,11 (0,8)	<i>ns</i> (0,52)
Vitesse de repol. (mV/ms)	-63,9 ± 1,40 (-62,7)	-59,8 ± 8,2 (-62,1)	<i>ns</i> (0,52)
Vitesse _{Max} repol. (mV/ms)	-75,2 ± 2,4 (-77,2)	-72,4 ± 9,5 (-74,5)	<i>ns</i> (0,44)
<i>Cellules (n)</i>	(8)	(5)	
AHP			
Amplitude (mV)	5,4 ± 0,4 (4,8)	4,3 ± 0,3 (4)	<i>ns</i> (0,06)
Durée (ms)	95 ± 5 (94)	90,2 ± 6,4 (86,8)	<i>ns</i> (0,56)
T _{amplitude max} (ms)	11,2 ± 1,2 (11,2)	13,7 ± 1,7 (13,3)	<i>ns</i> (0,4)
Temps de repol. (ms)	80,7 ± 4,4 (80,3)	76,4 ± 4,9 (72,5)	<i>ns</i> (0,46)
<i>Cellules (n)</i>	(21)	(15)	

Table 5 : Comparaison des propriétés électriques des motoneurones WT et SOD1 pendant la deuxième semaine postnatale.

Les valeurs données dans la table sont la moyenne \pm le s.e.m. suivis entre parenthèses de la valeur de la médiane. Quand les tests statistiques ne donnent pas de différence significative la valeur entre parenthèses est la valeur de la probabilité (P). Les données ont été comparées avec le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01 ;*** P<0,001). Toutes les valeurs ont aussi été comparées avec un test non paramétrique exact de permutation. Les 2 tests ont donné les mêmes résultats, sauf pour le gain et le gain[§] (P=0,009 ** et P=0,006** avec le test de permutation). Gain[§], valeur du gain mesurée lors de l'accélération de la courbe IF générée avec les fréquences instantanées des deux premiers potentiels d'action. f_{\max} , fréquence maximale de décharge mesurée sur les 2 premiers PA. I_{50} , intensité de courant faisant décharger le motoneurone à la moitié de sa f_{\max} . Pour les autres abréviations, voir table 2.

	WT	SOD1	stat
Vitesse rampe (nA.s ⁻¹)	0,56 ± 0,09	0,50 ± 0,04	ns (0,62)
Durée totale rampe (ms)	8336 ± 645	7071 ± 488	ns(0,32)
Intensité _{max} rampe (nA)	2,30 ± 0,33	1,72 ± 0,16	ns (0,32)
I _{début} (nA)	1,52 ± 0,27	0,70 ± 0,12	*
I _{fin} (nA)	1,50 ± 0,36	0,68 ± 0,17	ns (0,07)
Durée décharge montée (ms)	1358 ± 156	2076 ± 256	*
Durée décharge descente (ms)	1520 ± 291	2108 ± 314	ns (0,32)
Durée totale décharge (ms)	2878 ± 390	4183 ± 535	ns (0,09)
Gain (Hz.nA ⁻¹)	33,2 ± 3,7	28,7 ± 3,6	ns (0,54)
Fréquence maximale (Hz)	33,2 ± 4,3	40,1 ± 4,9	ns (0,20)
Potentiel de membrane (mV)	-66,6 ± 3,1	-65, 1 ± 2,2	ns (0,71)
Résistance d'entrée (MΩ)	16,4 ± 2,37	11,8 ± 2,0	ns (0,16)
Seuil PA (mV)	-49,2 ± 1,2	-49 ± 1,3	ns (1)
<i>cellules (n)</i>	(7)	(7)	

Table 6 - Caractéristiques des motoneurones WT et SOD1 soumis à des protocoles de stimulation en rampe de vitesse lente (<0,85 nA.s⁻¹) pour la période P7-P10.

Les valeurs données dans la table sont la moyenne ± le s.e.m. Les données ont été comparées avec un test non paramétrique exact de permutation et le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01). Les 2 tests ont donné les mêmes résultats.

MNs P6-P10 [Ca²⁺]_{extra}=4mM	WT	SOD1	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-64,3 ± 1,1	-64,9 ± 1,3	<i>ns</i>
Résistance d'entrée (MΩ)	33,3 ± 2,1	23,8 ± 2,2	***
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(31)	
PA _{seuil} (mV)	-45,1 ± 0,9	-45,1 ± 0,8	<i>ns</i>
Courant de rhéobase (nA)	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	*
Gain (Hz/nA)	18,4 ± 2,0	13,2 ± 0,9	*
F _{max} (Hz)	36,3 ± 3,3	34,8 ± 2,8	<i>ns</i>
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(17)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Amplitude (mV)	71,4 ± 1,9	72,1 ± 1,5	<i>ns</i>
Demi-durée (ms)	1,3 ± 0,04	1,2 ± 0,1	<i>ns</i>
Temps de montée (ms)	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	<i>ns</i>
<i>Cellules (n)</i>	(22)	(18)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	56,9 ± 1,8	53,4 ± 1,5	<i>ns</i>
Demi-durée (ms)	1,0 ± 0,04	1,1 ± 0,04	<i>ns</i>
Temps de montée (ms)	1,1 ± 0,04	1,1 ± 0,1	<i>ns</i>
Amplitude AHP (mV)	9,2 ± 0,5	9,7 ± 0,7	<i>ns</i>
Durée AHP (ms)	142 ± 10	150 ± 9	<i>ns</i>
<i>Cellules (n)</i>	(21)	(22)	

Table 7 - Propriétés des motoneurones enregistrés en haut calcium. Les valeurs données dans la table sont la moyenne ± le s.e.m. Les données ont été comparées avec un test non paramétrique exact de permutation et le test non paramétrique de Mann Whitney (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01). Les 2 tests ont donné les mêmes résultats.

MOTONEURONES WT	(2mM)	(4mM)	<i>stat</i>
Potentiel de repos (mV)	-70 ± 1,1	-64,3 ± 1,1	***
Résistance d'entrée (MΩ)	16,2 ± 0,8	33,3 ± 2,1	***
<i>Cellules (n)</i>	(38)	(27)	
PA _{seuil} (mV)	-48,1 ± 1,2	-45,1 ± 0,9	<i>ns</i> (0,07)
Courant de rhéobase (nA)	1,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	**
<i>Cellules (n)</i>	(29)	(15)	
Gain (Hz/nA)	25,1 ± 1,7	18,4 ± 2,0	**
F _{max} (Hz)	58,1 ± 3,2	36,3 ± 3,3	***
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(15)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Amplitude (mV)	82,8 ± 1,8	71,4 ± 1,9	***
Demi-durée (ms)	1,07 ± 0,04	1,25 ± 0,04	**
<i>Cellules (n)</i>	(27)	(22)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	63,8 ± 2,4	56,9 ± 1,8	*
Demi-durée (ms)	0,89 ± 0,03	1,03 ± 0,04	*
<i>Cellules (n)</i>	(8)	(22)	
Amplitude AHP (mV)	5,4 ± 0,4	9,2 ± 0,5	***
Durée AHP (ms)	95 ± 5	142 ± 10	***
<i>Cellules (n)</i>	(21)	(21)	
MOTONEURONES SOD1			
	(2mM)	(4mM)	
Potentiel de repos (mV)	-69,3 ± 1,1	-64,9 ± 1,3	*
Résistance d'entrée (MΩ)	12,3 ± 1,1	23,8 ± 2,2	***
<i>Cellules (n)</i>	(28)	(31)	<i>ns</i>
PA _{seuil} (mV)	-48,5 ± 1,3	-45,1 ± 0,8	*
Courant de rhéobase (nA)	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,2	(0,16)
<i>Cellules (n)</i>	(18)	(17)	
Gain (Hz/nA)	19,7 ± 0,9	13,2 ± 0,9	***
F _{max} (Hz)	58,7 ± 3,9	34,8 ± 2,8	***
<i>Cellules (n)</i>	(17)	(17)	
POTENTIEL D'ACTION ANTIDROMIQUE			
Amplitude (mV)	79,2 ± 2	72,1 ± 1,5	**
Demi-durée (ms)	1,08 ± 0,05	1,21 ± 0,1	*
<i>Cellules (n)</i>	(25)	(18)	
POTENTIEL D'ACTION ORTHODROMIQUE			
Amplitude (mV)	65,1 ± 2,3	53,4 ± 1,5	**
Demi-durée (ms)	0,98 ± 0,07	1,10 ± 0,04	<i>ns</i> 0,14)
<i>Cellules (n)</i>	(5)	(22)	
Amplitude AHP (mV)	4,3 ± 0,3	9,7 ± 0,7	***
Durée AHP (ms)	90 ± 6	150 ± 9	***
<i>Cellules (n)</i>	(15)	(22)	

Table 8 : Modification des propriétés électriques des motoneurones par le calcium extracellulaire

Les valeurs données dans la table sont la moyenne ± le s.e.m. Les données ont été comparées avec un test non paramétrique exact de permutation et le test non paramétrique de Mann Whitney (*ns*=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01). Les 2 tests ont donné les mêmes résultats. Pour les abréviations, voir table 2.

<i>Age</i>	$P_{\text{soma}} (\mu\text{m})$	$A_{\text{trans}} (\mu\text{m}^2)$	$\text{Frt}_{\text{max}} (\mu\text{m})$	$\text{Frt}_{\text{min}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{soma}} (\mu\text{m})$	$A_{\text{soma}} (\mu\text{m}^2)$	Den	$D_{\text{prim}} (\mu\text{m})$	$A_{\text{prim}} (\mu\text{m}^2)$
<i>Mn1 (P9)</i>	104.5	644	36.1	28.4	28.6	2576	6	5.6	169.9
<i>Mn2 (P9)</i>	97.3	530	40.8	19.2	26	2119	5	4.6	93.3
<i>Mn3 (P9)</i>	121.5	936	43.5	31.3	34.5	3744	9	5.1	206.4
<i>Mn4 (P8)</i>	126.7	692	50.1	21.5	29.7	2769	8	4.9	173.5
<i>Mn5 (P8)</i>	97.8	626	34.4	24.3	28.2	2505	8	5.4	187.7
<i>Mn6 (P9)</i>	107.2	795	35.8	31.3	31.8	3180	10	5.6	265.9
<i>Mn7 (P9)</i>	144.8	954	45.6	36.2	34.9	3817	10	4.8	195
<i>Mn8 (P8)</i>	109.4	837	40.3	28	32.6	3349	7	6.9	273.7
<i>Moyenne WT</i>	113.7	751.8	40.8	27.5	30.8	3007	7.9	5.3	195.7
<i>sd</i>	16.3	153	5.413	5.6	3.17	613	1.8	0.7	57.1
<i>Mn9 (P8)</i>	109.1	540	42	17.5	26.2	2160	6	5.2	137.2
<i>Mn10 (P8)</i>	107.7	737	39.1	26.9	30.6	2949	8	5.4	191
<i>Mn11 (P9)</i>	141.6	920	45.6	29.2	34.2	3679	8	5.8	223.5
<i>Mn12 (P9)</i>	194.9	1023	57.1	40.6	36.1	4092	8	5.3	187.2
<i>Mn13 (P8)</i>	146.6	932	46.9	29.5	34.5	3729	6	7	239.1
<i>Mn14 (P8)</i>	99.6	739	34.4	28.4	30.7	2956	6	8.3	356.1
<i>Moyenne SOD1</i>	133.3	815.3	44.2	28.7	32.1	3261	7	6.2	222.4
<i>sd</i>	35.8	176	7.779	7.4	3.6	705	1.1	1.2	74.4
<i>P</i>	0.19	0.47	0.36	0.74	0.49	0.47	0.39	0.15	0.47

Table 9 – Paramètres des corps cellulaires et des dendrites primaires des motoneurones reconstruits en 3D. Abréviations: P_{soma} =Périmètre du soma mesuré dans le plan transversal (μm). A_{trans} =Aire du soma mesurée dans le plan transversal (μm^2). Frt_{max} =Ferret maximum du soma (μm). Frt_{min} = Feret minimum du soma (μm). D_{soma} =Diamètre du soma (μm). A_{soma} =Surface membranaire somatique (μm^2). Den=Nombre de dendrites primaires par motoneurone. D_{prim} =Diamètre initial moyen des dendrites primaires pour chaque motoneurone (μm). A_{prim} =Aire totale par motoneurone des sections formées par les dendrites primaires (μm^2). Test non paramétrique exact de permutation (ns=non significatif ; * $P<0,05$; ** $P<0,01$).

Age	Brcmt	Trms	TrmOrd _{moy}	Sgmt	Ord _{moy}	Ord _{max}	\sum_{Long} (μm)	\sum_{Surf} (μm^2)	Long _{max} (μm)	Long _{moy} (μm)
<i>Mn1 (P9)</i>	34	40	4.98	74	4.88	9	11375	22368	760	523
<i>Mn2 (P9)</i>	45	50	4.78	95	4.21	7	8730	19961	536	346
<i>Mn3 (P9)</i>	68	78	4.96	146	4.03	9	16564	35258	711	417
<i>Mn4 (P8)</i>	74	83	4.95	157	4.22	8	18116	57216	715	400
<i>Mn5 (P8)</i>	82	90	5.26	172	4.43	8	17211	32394	580	375
<i>Mn6 (P9)</i>	83	95	4.95	178	4.28	9	23142	56051	1018	402
<i>Mn7 (P9)</i>	89	99	5.15	188	4.38	8	18309	37952	578	324
<i>Mn8 (P8)</i>	100	107	5.69	207	4.51	9	19813	40314	727	388
Mean WT	71.9	80.3	5.09	152.1	4.37	8.4	16658	37689	703	397
<i>sd</i>	22.3	23.7	0.28	46	0.26	0.7	4597	13672	152	60
<i>Mn9 (P8)</i>	93	100	5.71	193	5.37	9	18134	34917	661	387
<i>Mn10 (P8)</i>	134	145	6.17	279	5.88	11	25649	58427	731	379
<i>Mn11 (P9)</i>	134	145	5.88	279	6.5	9	25419	58221	706	365
<i>Mn12 (P9)</i>	154	172	6.72	326	5.57	17	37031	68175	1016	464
<i>Mn13 (P8)</i>	156	165	6.45	321	4.91	10	25942	55931	591	357
<i>Mn14 (P8)</i>	178	184	7.38	362	5.07	13	32737	81495	724	409
Mean SOD1	141.5	151.8	6.39	293.3	5.55	11.5	27485	59528	738	394
<i>sd</i>	28.9	29.7	0.61	58.4	0.58	3.1	6575	15355	146	39
P	0.0006	0.0006	0.0003	0.0006	0.0003	0.0049	0.0023	0.0199	0.6683	0.91
sign	***	***	***	***	***	**	**	*	ns	ns

Table 10 – Paramètres métriques et topologiques des arborisations dendritiques. Abréviations: Brcmt= Nombre de points de branchement par motoneurone. Trms= Nombre de segments terminaux par motoneurone. TrmOrd_{moy}= Ordre dendritique moyen des segments terminaux pour chaque motoneurone. Sgmt= nombre total de segments dendritiques par motoneurone. Ord_{moy}= Ordre dendritique moyen des segments pour chaque motoneurone. Ord_{max}= Ordre dendritique maximal pour chaque motoneurone. \sum_{Long} = Longueur dendritique totale pour chaque motoneurone (μm). \sum_{Surf} = Surface dendritique totale pour chaque motoneurone (μm^2). Long_{max} = Plus grande longueur dendritique du soma à une terminaison pour chaque motoneurone (μm). Long_{moy} = Moyenne des longueurs dendritiques du soma vers toutes les terminaisons (μm).
test non paramétrique exact de permutation (ns=non significatif ; * P<0,05 ; ** P<0,01).

ANNEXES

ANNEXE I : *Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*

SHORT COMMUNICATION

Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Julien Amendola,¹ Bernard Verrier,¹ Pierre Roubertoux² and Jacques Durand¹¹CNRS UMR-6196, Plasticité et Physiopathologie de la Motricité, Université de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France²CNRS, Génomique fonctionnelle, Comportement et Pathologie, Marseille, France**Keywords:** neurodegenerative disease, postnatal, SOD1^{G85R}, spinal networks**Abstract**

Most neurodegenerative diseases become manifest at an adult age but abnormalities or pathological symptoms appear earlier. It is important to identify the initial mechanisms underlying such progressive neurodegenerative disease in both humans and animals. Transgenic mice expressing the familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutation (G85R) in the enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) develop motor neuron disease at 8–10 months of age. We address the question of whether the mutation has an early impact on spinal motor networks in postnatal mutant mice. Behavioural tests showed a significant delay in righting and hind-paw grasping responses in mutant SOD1^{G85R} mice during the first postnatal week, suggesting a transient motor deficit compared to wild-type mice. In addition, extracellular recordings from spinal ventral roots in an *in vitro* brainstem–spinal cord preparation demonstrated different pharmacologically induced motor activities between the two strains. Rhythmic motor activity was difficult to evoke with *N*-methyl-DL-aspartate and serotonin at the lumbar levels in SOD1^{G85R} mice. In contrast to lumbar segments, rhythmic activity was similar in the sacral roots from the two strains. These results strongly support the fact that the G85R mutation may have altered lumbar spinal motor systems much earlier than previously recognized.

Introduction

The neurodegenerative diseases are characterized by dysfunction and death of specific populations of neurons that usually appear at adulthood. Pathological changes are commonly observed with late onset before clinical symptoms but the earliest mechanisms that account for progressive degeneration of neurons are still unknown.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative and fatal human disorder characterized by progressive loss of motor neurons in cortex, brain stem and spinal cord. A subset of familial and sporadic ALS cases is related to dominant missense mutations in the gene encoding Cu–Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) (Rosen *et al.*, 1993; Cleveland & Rothstein, 2001; Julien, 2001).

The SOD1^{G85R} transgenic mice, expressing a human mutant SOD1 allele with glycine 85 substituted for arginine (G85R), develop an ALS-like disease with progressive motor neuron degeneration (Bruijn *et al.*, 1997, 1998; Williamson *et al.*, 1998; Lino *et al.*, 2002; Raoul *et al.*, 2002). Unlike mutants SOD1^{G37R} and SOD1^{G93A}, the SOD1^{G85R} enzyme is inactive and transgenic SOD1^{G85R} mice are characterized by unmodified endogenous SOD1 activity (Gurney *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995; Bruijn *et al.*, 1997, 1998).

ALS-like disease is not observed in mice expressing human wild-type (WT) SOD1 (Deng *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1995; Kunst *et al.*, 1997) or in SOD1-null mice (Reaume *et al.*, 1996). Furthermore, coexpression of the human WT with the human mutant G85R enzymes does not protect against the disease (Bruijn *et al.*, 1998; Fukada *et al.*, 2001). Pathogenesis of ALS-linked mutations results

from an unidentified toxic gain-of-function of mutant polypeptides rather than a decrease in or loss of SOD1 enzymatic activity (Cleveland & Rothstein, 2001; Julien, 2001).

In homozygous SOD1^{G85R} mice (line 148), the disease onset starts between 8 and 10 months of age. After initial hindlimb paralysis, disease spreads very rapidly to the forelimbs and mice are severely paralysed within 2 weeks (Bruijn *et al.*, 1997). The earliest pathological signs are observed at 6 months in astrocytes and motoneurons from spinal cord (Bruijn *et al.*, 1997).

Recent studies suggest earlier abnormalities in mutant SOD1 motoneurons during embryonic development (Raoul *et al.*, 2002) and postnatal maturation (Lowry *et al.*, 2001). Although the SOD1 mutation could affect maturation of sensorimotor processes, no data on spinal network activities from mutant SOD1 postnatal mice are yet available.

In this work, we have studied maturation of spinal motor networks in homozygous SOD1^{G85R} (line 148) and C57BL/6J control mice during the first postnatal week by using behavioural tests and extracellular motor recordings from ventral roots in an isolated brainstem–spinal cord preparation from newborn mice, adapted from a rat preparation (Vinay *et al.*, 2002). Because the tail movements are not affected when the hindlimbs are severely paralysed in SOD1^{G85R} mice, we recorded motor activities from both sacral and lumbar roots.

Materials and methods**Mice**

All surgical and experimental procedures conformed to the European Communities council directive (86/609/EEC). The SOD1^{G85R} transgenic mice (line 148; Bruijn *et al.*, 1997) were generously provided by

Correspondence: Dr Jacques Durand, as above.

E-mail: durand@dpm.cnrs-mrs.fr

Received 18 June 2004, revised 9 September 2004, accepted 20 September 2004

U382 INSERM-Marseille (with agreement of the Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego). These transgenic mice were initially backcrossed to WT C57BL/6J for eight generations. The mice were then bred as homozygous transgenics. The C57BL/6J (WT) strain was thus used as control. The same length of gestation was observed for WT and SOD1^{G85R} mice. Postnatal day 0 (P0) was defined as the first 24 h after birth. WT pups at P2 weighed 1.74 ± 0.24 g (mean \pm SD, $n = 90$) and SOD1^{G85R} pups 1.76 ± 0.31 g ($n = 71$). The daily weight increase of WT (0.43 ± 0.01 g) and SOD1^{G85R} (0.44 ± 0.01 g) given by regression lines did not differ significantly during the first post-natal week.

Behavioural testing

We used 35–37 pups from five litters per strain with at least six pups per litter. Six sensorimotor responses appearing from P1 to P6 were measured daily in all male and female mice (Fox, 1965; Roubertoux *et al.*, 2003). When the appropriate responses were observed, the pup was given a score of 1 for the corresponding test. Tests were as follows. (i) Righting: the pup was placed on its back; it righted itself within 10 s. (ii) Cliff-drop aversion: the pup was placed on the edge of a cliff (a table), the forepaws and the head over the edge; it turned and crawled away from the cliff. (iii) Forepaw and (iv) hindpaw grasping: when the inside of one paw was gently stroked with an object, the paw flexed to grasp the object. (v) Forelimb placing: when the dorsum of the paw came into contact with the edge of an object, the hand lifted and was placed on the object. (vi) Vibrissae placing: the pup was suspended by the tail and lowered towards the tip of a pencil; when the vibrissae touched the pencil, the pup raised its head and carried out a placing response with the extended forelimb. Additional pups from two litters per strain ($n = 13$ and $n = 12$ pups for WT and SOD1^{G85R}, respectively) were tested daily between P7 and P11 to confirm whether behavioural deficits were transient. For each test the numbers of pups scoring 1 were compared between strains (χ^2 test). $P < 0.05$ was accepted as significant.

Electrophysiological experiments

P3–6 mice were anaesthetized by hypothermia. They were then decerebrated at a postcollicular level, eviscerated and pinned down onto a Petri dish. Dorsal craniotomy and laminectomy were

performed, then the spinal cord and brainstem were removed, placed in a recording chamber and superfused with an artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): NaCl, 130; KCl, 4; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; glucose, 30; bubbled with a 95% O₂–5% CO₂ mixture, adjusted to pH 7.4 at 24–25 °C. In three experiments, WT and SOD1^{G85R} isolated preparations were placed in the same recording chamber for simultaneous recordings.

Monopolar stainless steel electrodes were placed in contact with the lumbosacral ventral roots and insulated with petroleum jelly for recording (bandwidth 0.07–1 kHz). Extracellular potentials were amplified (gain 10 000) and digitized at 1 kHz (digidata 1322, Axon Instruments, Clampex 8.0 software). Using Spike 2 software, with a threshold for spike detection, the number of spontaneous events was measured in lumbar (L3 and L5) ventral roots for 10 min episodes. The mean number of spontaneous events and the mean inter-event interval (IEI) were determined in WT and SOD1^{G85R} and compared using Student's *t*-test according to the properties of the distribution; $P > 0.05$ was not significant (ns). Results are presented in the form of mean \pm SEM. Motor output activity was elicited by bath application of *N*-methyl-DL-aspartate (NMA; 2–20 μ M) in combination with serotonin (5-HT; 1–20 μ M), and recorded from lumbar (L3 to L6) and sacral (S1 to S3) roots. These substances were applied for 20–40 min and a 30 min washout period was used between different applications. Areas under the curve before and during drug applications were calculated from rectified traces and the slope of the regression line indicated the effect of the drugs. All compounds used in this study were purchased from Sigma.

Results

The SOD1^{G85R} mice (Bruijn *et al.*, 1997) maintained as homozygotes onto the C57BL/6J genetic background (> 99.8%) and the C57BL/6J strain were used in this study.

Behavioural testing in postnatal mice

To study the influence of the SOD1^{G85R} mutation during the first postnatal week, six tests currently used to investigate the maturation of sensorimotor capacities were selected. A proper righting response requires the integrity of muscular and motor functions, and also

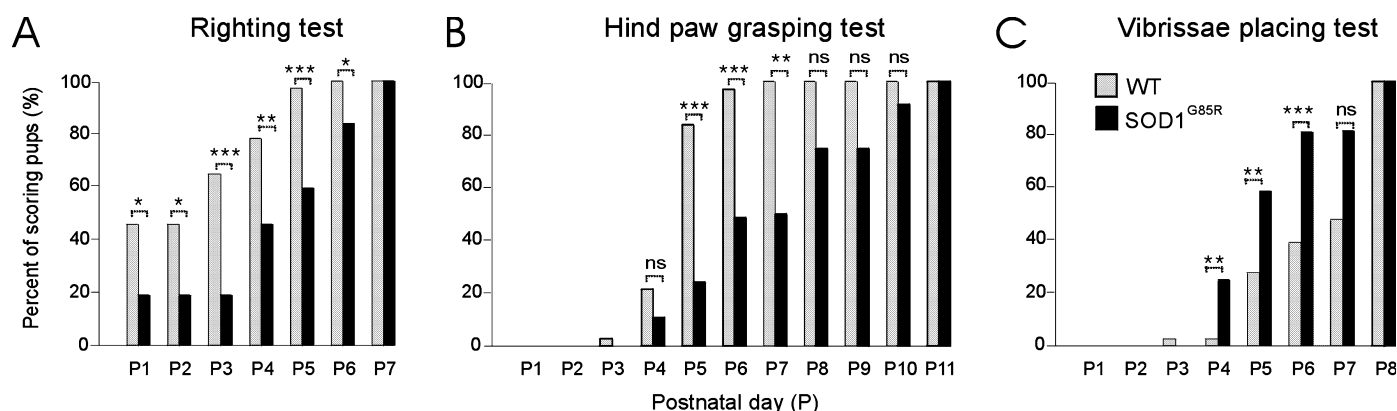


FIG. 1. Appearance of sensorimotor responses: differences between WT and SOD1^{G85R} pups. (A) Righting: the number of SOD1^{G85R} pups with proper righting was lower than WT on every day up to P6. (B) Hindpaw grasping: the number of scoring pups was significantly different between the two strains from P5 (85% WT and only 25% of SOD1^{G85R} pups) to P7 (50% of SOD pups). (C) Vibrissae placing: the strains also differed for this sensorial task from P4 to P6. At P6 the number of SOD1^{G85R} pups able to have a placing response was twice the number of WT pups. Number of pups: $n = 37$ for each strain from P1 to P6 and $n = 13$ WT and $n = 12$ SOD1^{G85R} from P7 to P11. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant ($P > 0.05$); χ^2 test.

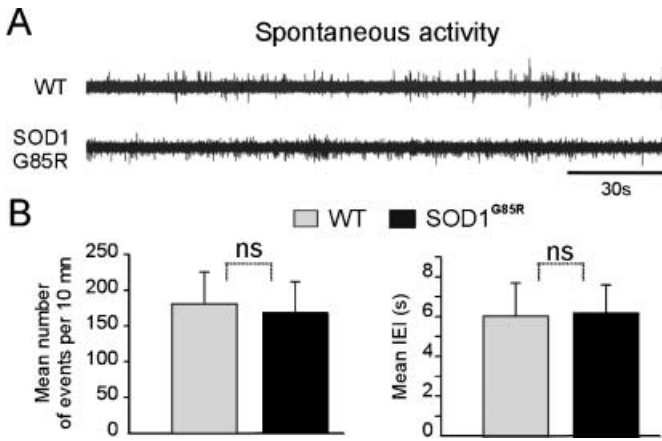


FIG. 2. Comparison of spontaneous motor activity recorded from lumbar roots of WT and SOD1^{G85R} mice. (A) Activity recorded from L5 roots of P4 WT (upper trace) and P5 SOD1^{G85R} (lower trace) mice. (B) Mean numbers of events per 10 min and mean IELs ($n = 10$ for WT, $n = 11$ for SOD1^{G85R}). Values are means \pm SEM. Not significant (ns), $P > 0.05$; Student's t -test.

depends on the labyrinthine function. The forelimb placing and forepaw and hindpaw grasping responses reflect the locomotor abilities of the limbs and the development of fine motricity for the grasping tasks. Righting and hindpaw grasping responses were significantly delayed for SOD1^{G85R} pups (Fig. 1A and B). All the transgenic pups had the proper righting response at P7. Hindpaw grasping was still impaired at P7 because the appropriate response was present in only 50% of SOD1^{G85R} pups. No differences between the two strains were observed in forepaw grasping and forelimb placing tests (not shown). All the pups had the proper forepaw grasping response at P1 and forelimb placing at P6. The vibrissae placing response gives information about the maturation of vibrissae sensibility and the cliff drop aversion response is dependent on the

labyrinthine function. The SOD1^{G85R} pups were in advance for vibrissae placing from P4 to P6 (Fig. 1C) and cliff drop aversion tests from P2 to P4 (not shown). Proper responses were recorded in all WT and SOD1^{G85R} pups at P5 for cliff drop aversion test and at P8 for vibrissae placing test.

Electrophysiological experiments

Spontaneous activity was compared between SOD1^{G85R} preparations ($n = 5$) from P3–6 pups and age-matched WT controls ($n = 6$). The *in vitro* preparation of P3–6 mice usually exhibited irregular spontaneous motor activity recorded from ventral roots (Fig. 2A). The WT and SOD1^{G85R} lumbar roots had a weak tonic activity consisting of spontaneous action potentials (Fig. 2A), and bursts were occasionally recorded. The mean number of events per 10 min was 181 ± 44 ($n = 10$) and 169 ± 43 ($n = 11$) and the mean IEL was 6.01 ± 1.66 s and 6.17 ± 1.40 s, for WT and SOD1^{G85R} mice, respectively. They did not differ significantly between the strains (Fig. 2B).

On this background activity, NMA and 5-HT, known to activate the spinal networks, were bath-applied in 9 WT and 11 SOD1^{G85R} preparations. NMA 10 μ M and 5-HT 5 μ M induced reversible rhythmic activity in 15 out of 16 (15/16) lumbar (L3–L6) roots from WT, and alternate rhythmic patterns could be evoked in opposite (left–right) lumbar roots (Fig. 3A). In contrast, NMA 10 μ M and 5-HT 5 μ M failed to evoke any activity in 12/20 lumbar (L3–L6) roots recorded from SOD1^{G85R} (Fig. 3C). In the remaining 8/20 SOD1^{G85R} roots, only transient bursting (6/20) or tonic (2/20) activities were elicited (Fig. 3D). In the example in Fig. 3F, NMA concentration was increased up to 20 μ M and irregular bursting discharges were obtained in opposite L5 ventral roots. Irregular bursting was also obtained when increasing 5-HT concentration up to 20 μ M (not shown). Increasing drug concentrations up to 20 μ M (either NMA or 5-HT, or both) led to the activation of all SOD1^{G85R} lumbar roots ($n = 15$) with persistent

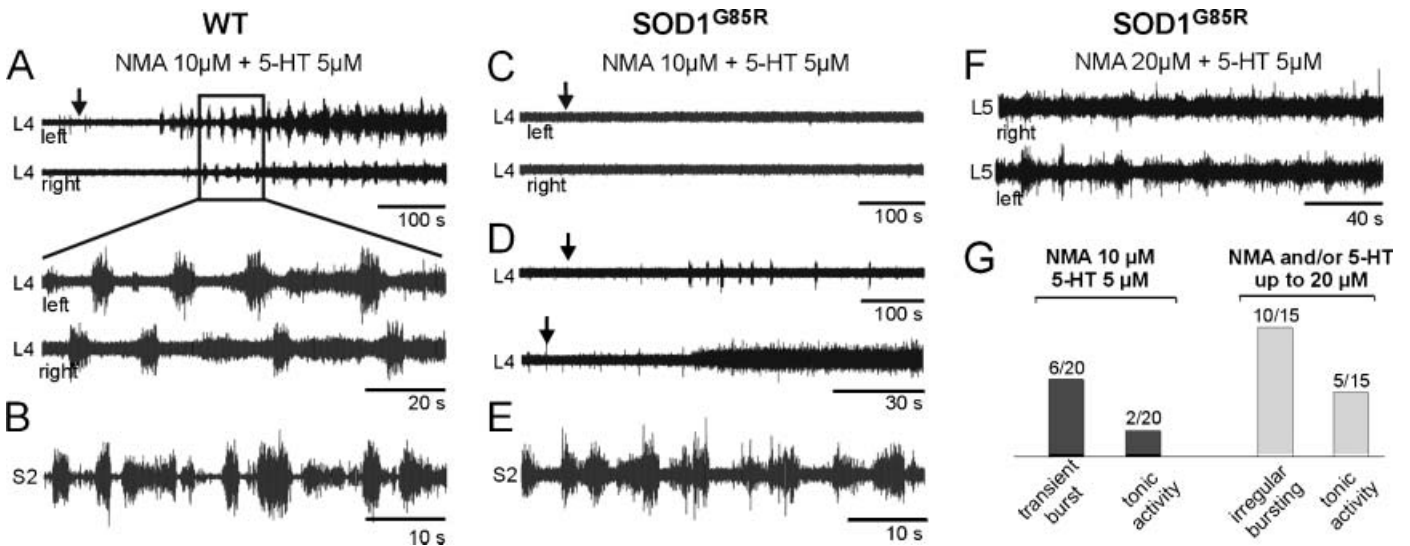


FIG. 3. Pharmacological activation of locomotor networks: lack of rhythmic activities in lumbar networks from SOD1^{G85R} mice. (A and B) NMA 10 μ M with 5-HT 5 μ M induced rhythmic bursting activity in ventral roots from WT mice. (A) Opposite L4 lumbar roots show alternate bursts in P3 WT. (B) Activity recorded from S2 sacral root of P6 WT mice. (C–E) NMA 10 μ M with 5-HT 5 μ M induced rhythmic bursting activity only in sacral roots from SOD1^{G85R} mice. (C) Silent roots (opposite L4) from P4 SOD1^{G85R} mice, simultaneously recorded in the same chamber as in A. (D) Transient bursting (upper trace) and tonic activity (lower trace) from L4 roots in P4 and P3 SOD1^{G85R} mice, respectively. (E) S2 root activity from P5 SOD1^{G85R} mice. (F) Irregular bursting activity recorded from L5 roots in P3 SOD1^{G85R} during application of NMA 20 μ M with 5-HT 5 μ M (no activity was recorded in these roots with NMA 10 μ M and 5-HT 5 μ M). (G) Number of activated lumbar roots in SOD1^{G85R} with transient burst, tonic activity and irregular bursting during application of NMA 10 μ M with 5-HT 5 μ M (dark bars), or with increased drug concentrations (light bars). Arrows indicate the onset of drug perfusion in A, C and D.

tonic activity or irregular bursting discharges which lasted throughout the application. However, alternate rhythmic activity was never evoked from SOD1^{G85R} lumbar roots. Fig. 3G represents the number of activated lumbar roots in SOD1^{G85R} with transient burst or tonic activity or with irregular bursting when different concentrations of drugs were used. In contrast to lumbar roots, all recorded sacral (S1–S3) roots exhibited similar rhythmic activities between WT ($n = 12$) and SOD1^{G85R} ($n = 16$) during NMA 10 μM and 5-HT 5 μM (Fig. 3B and E) and these rhythmic activities alternated between opposite (left–right) sacral roots (not shown).

Discussion

Electrophysiological experiments and behavioural tests have revealed for the first time functional alterations in postnatal SOD1^{G85R} mice during the sensorimotor development.

Behavioural testing on WT mice are in accordance with previous reports (Fox, 1965; Roubertoux *et al.*, 2003). Maturation of labyrinthine functions, tested by the cliff drop aversion task, is not delayed in SOD1^{G85R} mice, suggesting that the impaired righting response reflects a predominant and transient motor deficit. The grasping and placing tasks suggest a motor impairment of the hindlimbs only. As a grasping task involves a spinal reflex, this transient motor deficit could reflect a delay in rostrocaudal maturation of the cord. Vibrissae placing and cliff drop aversion tasks reveal an advance for the maturation of sensorial properties in SOD1^{G85R} mice that might be due to a behavioural compensation.

Regarding electrophysiological data, our main finding concerns the lack of alternate rhythmicity in lumbar segments from SOD1^{G85R} mice during application of NMA and 5-HT. In contrast, this classical pharmacologically induced motor pattern is normally obtained in control mice as shown in previous studies (Whelan *et al.*, 2000; Kullander *et al.*, 2003). Moreover, spontaneous activity recorded *in vitro* from WT and SOD1^{G85R} mice was similar to that already reported (Bonnot *et al.*, 1998; Whelan *et al.*, 2000). The fact that higher concentrations of NMA and 5-HT were required to evoke solely tonic activity and irregular bursting in the lumbar networks of SOD1^{G85R} preparations may indicate a lumbar network hypoexcitability. The lack of pharmacologically induced rhythmicity might be due to changes in endogenous membrane properties and/or alterations in lumbar networks and descending pathways. In SOD1^{G85R} mice neuronal abnormalities are not limited to the spinal cord but also involve the brainstem (Bruijn *et al.*, 1997, 1998). Alterations or a delayed maturation of supraspinal descending pathways could be implicated in the lumbar network hypoexcitability. Studies on SOD1^{G93A} mouse model of ALS demonstrated that supraspinal motor structures controlling the spinal cord are concerned by the disease prior to clinical onset (Azzouz *et al.*, 1999; Zang & Cheema, 2002). Moreover, in this model, changes in excitability of presymptomatic SOD1^{G93A} spinal motoneurons have been observed in culture (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004). It will be important to determine in SOD1^{G85R} pups whether changes in excitability of spinal motoneurons occur as early as the postnatal developmental period. Further investigations are needed to detect functional differences in the second postnatal week, when mice begin to weight-bear and walk, in order to evaluate the impact of early plasticity on the developing motor system of these transgenic mice. Compensatory mechanisms may develop and partly explain the progressive degeneration and the late onset of the disease.

Activation of the sacral networks (S1–S3) by NMA and 5-HT showed that these non-limb innervating segments have an intrinsic rhythmic capacity that can be used to elicit rhythmic tail

movements (Lev-Tov & Delvolve, 2000). Our results showed that NMA and 5-HT induced similar rhythmic activities in all sacral roots recorded from WT and SOD1^{G85R} mice. The fact that the tail is not affected by paralysis at latter stage suggests that, in this mouse model of ALS, the sacral segments are spared by the degeneration. Thus, the early abnormalities would be present only in lumbar segments (at least L3–L6) where motor neurons degenerate massively during the disease. In humans with ALS, Onuf's nucleus is preserved and the functions of bladder and pelvic sphincters are often intact until the latest stage of the illness. A study on SOD1^{G93A} mice showed that nuclei homologous to Onuf's nucleus are spared by the degeneration (Hamson *et al.*, 2002).

The differences in sensorimotor maturation between WT and SOD1^{G85R} mice described both *in vivo* and *in vitro* can be directly linked to the expression of mutant SOD1^{G85R} subunits. Taken together, our results suggest that the motor impairments observed during the first postnatal week are linked to the clinical phenotype which may start earlier in SOD1^{G85R} mice than generally recognized. These early abnormalities could be considered the first preclinical signs in this mouse model of ALS. Furthermore, the question was addressed whether mutant SOD1 motoneurons are already affected during embryonic development (Raoul *et al.*, 2002). Determining the mechanisms underlying these motor alterations will be important for our understanding of the pathogenesis of ALS and for planning future therapeutic strategies.

Acknowledgements

We acknowledge D.W. Cleveland (Ludwig Institute, San Diego) for providing SOD1^{G85R} mice and T.L. Williamson for critical reading of the manuscript. We also acknowledge L. Vinay, E. Pearlstein and J.F. Pflieger for their helpful advices. We thank G. Riviere and M. Aboudou for their assistance and A. Duhoux for taking care of animals. This work has been supported by CNRS, Université de la Méditerranée, INSERM and a grant from Association pour la Recherche sur la Sclérose latérale amyotrophique (ARS).

Abbreviations

5-HT, serotonin; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; G85R, SOD1 allele with glycine 85 substituted for arginine; IEI, inter-event interval; L, lumbar; NMA, *N*-methyl-DL-aspartate; P, postnatal day; S, sacral; SOD1, superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

References

- Azzouz, M., Krezel, W., Dolle, P., Vodouhe, C., Warter, J.M., Poindron, P. & Borg, J. (1999) Compensatory mechanism of motor defect in SOD1 transgenic mice by overactivation of striatal cholinergic neurons. *Neuroreport*, **10**, 1013–1018.
- Bonnot, A., Morin, D. & Viala, D. (1998) Genesis of spontaneous rhythmic motor patterns in the lumbosacral spinal cord of neonate mouse. *Brain Res. Dev.*, **108**, 89–99.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L. & Cleveland, D.W. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, **18**, 327–338.
- Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W. & Cleveland, D.W. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, **281**, 1851–1854.
- Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 806–819.
- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P. *et al.* (1993) Amyotrophic

- lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*, **261**, 1047–1051.
- Fox, M. (1965) Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.*, **13**, 234–241.
- Fukada, K., Nagano, S., Satoh, M., Tohyama, C., Nakanishi, T., Shimizu, A., Yanagihara, T. & Sakoda, S. (2001) Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 2032–2036.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L. & Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, **264**, 1772–1775.
- Hamson, D.K., Hu, J.H., Krieger, C. & Watson, N.V. (2002) Lumbar motoneuron fate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, **13**, 2291–2294.
- Julien, J.P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*, **104**, 581–591.
- Kullander, K., Butt, S.J., Lebre, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydstrom, A., Klein, R. & Kiehn, O. (2003) Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science*, **299**, 1889–1892.
- Kunst, C.B., Mezey, E., Brownstein, M.J. & Patterson, D. (1997) Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat. Genet.*, **15**, 91–94.
- Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N., Fu, R., Bar, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J. & Kroese, A.B. (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.*, **91**, 571–575.
- Lev-Tov, A. & Delvolve, I. (2000) Pattern generation in non-limb moving segments of the mammalian spinal cord. *Brain Res. Bull.*, **53**, 671–675.
- Lino, M.M., Schneider, C. & Caroni, P. (2002) Accumulation of SOD1 mutants in post-natal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.*, **22**, 4825–4832.
- Lowry, K.S., Murray, S.S., McLean, C.A., Talman, P., Mathers, S., Lopes, E.C. & Cheema, S.S. (2001) A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **2**, 127–134.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S. & Zona, C. (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, **351**, 153–156.
- Raoul, C., Estevez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Haase, G. & Pettmann, B. (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*, **35**, 1067–1083.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H. Jr, Scott, R.W. & Snider, W.D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.*, **13**, 43–47.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. & Brown, R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59–62.
- Roubertoux, P.L., Sluyter, F., Carlier, M., Marcet, B., Maarouf-Veray, F., Cherif, C., Marican, C., Arrechi, P., Godin, F., Jamon, M., Verrier, B. & Cohen-Salmon, C. (2003) Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat. Genet.*, **35**, 65–69.
- 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 Res. Rev.*, **40**, 118–129.
- Whelan, P., Bonnot, A. & O'Donovan, M.J. (2000) Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J. Neurophysiol.*, **84**, 2821–2833.
- Williamson, T.L., Bruijn, L.I., Zhu, Q., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Julien, J.P. & Cleveland, D.W. (1998) Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9631–9636.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W. & Price, D.L. (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, **14**, 1105–1116.
- Zang, D.W. & Cheema, S.S. (2002) Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1 (G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, **332**, 99–102.

ANNEXE II: *Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*

Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Cyril Bories,¹ Julien Amendola,¹ Boris Lamotte d'Incamps² and Jacques Durand¹

¹Laboratoire de Plasticité et Physio-Pathologie de la Motricité, UMR 6196 CNRS, Aix-Marseille Université, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France

²Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, UMR 8119, CNRS, Université René Descartes, Paris, France

Keywords: ALS, degeneration, excitability, intracellular recording, mouse models, spinal motor neurons

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis is a lethal, adult-onset disease characterized by progressive degeneration of motoneurons. Recent data have suggested that the disease could be linked to abnormal development of the motor nervous system. Therefore, we investigated the electrical properties of lumbar motoneurons in an *in-vitro* neonatal spinal cord preparation isolated from SOD1^{G85R} mice, which is a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis. The study was performed on young animals at the beginning of their second week, between postnatal days 6 and 10. Measurements of resting membrane potential and action potential characteristics of motoneurons were similar in wild-type and SOD1^{G85R} mice. However, the input resistance of motoneurons from transgenic mice was significantly lower than that of wild-type animals, whereas their membrane capacitance was increased, strongly suggesting larger SOD1^{G85R} motoneurons. Furthermore, the slope of the frequency–intensity curve was steeper in motoneurons from wild-type pups. Interestingly, the input resistance as well as the slope of the frequency–intensity curves of other spinal neurons did not show such differences. Finally, the amplitude of dorsal root-evoked potentials following high-intensity stimulation was significantly smaller in SOD1^{G85R} motoneurons. The superoxide dismutase 1 mutation thus induces specific alterations of the functional properties of motoneurons early in development.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), initially described by Charcot (1865), is an adult onset and fatal neurodegenerative disease. It induces a selective loss of motoneurons that initiates a progressive paralysis of skeletal musculature. In 90% of cases, no apparent genetic link has been determined (sporadic cases) whereas in 10% of cases, ALS is inherited in a dominant manner (familial cases). Sporadic and familial forms of the disease are clinically indistinguishable. Mutation of Cu/Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) is one proven cause of familial ALS (Rosen *et al.*, 1993; Gurney *et al.*, 1994). Although more than 110 mutations in the SOD1 gene are known to be responsible for ALS, only a subset of familial ALS cases is related to dominant missense mutations of the SOD1 gene. Transgenic mouse models of ALS are very useful to study the initial mechanisms underlying this neurodegenerative disease (Cleveland & Rothstein, 2001; Bruijn *et al.*, 2004).

Early behavioral alterations were described in 8-week-old transgenic mice expressing the mutated human protein SOD1^{G93A} (Wooley *et al.*, 2005). Abnormal walking gait and increased stride length were observed using treadmill testing. In another transgenic mouse model (SOD1^{G85R}), behavioral tests showed a delayed development of certain reflex responses (Amendola *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2006). Furthermore, the lumbar spinal network from SOD1^{G85R} mice was not

activated by pharmacological agents that induce rhythmic motor activity in wild-type (WT) mice during the first postnatal week (Amendola *et al.*, 2004). It was suggested that this hypoexcitability could be due to changes in endogenous membrane properties of the motoneurons and spinal neurons or to alterations in spinal synaptic connectivity. Recent evidence indicates an increased ratio of inhibitory to excitatory synapses contacting motoneurons in organotypic slice cultures obtained from embryonic spinal cords of SOD1^{G93A} mice (Avossa *et al.*, 2006). A reduction of cholinergic synaptic contacts was also described in the lumbar spinal cord from adult SOD1^{G93A} mice (Schutz, 2005). Conversely, an intrinsic hyperexcitability of mutant SOD1^{G93A} spinal motoneurons was found in culture and in organotypic slice cultures (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004, 2005). However, as the cells were not recorded from until they had been cultured for several weeks, it is not known whether this hyperexcitability may have taken place earlier during their development.

The aim of the present work was to find out whether the electrical properties of motoneurons in SOD1^{G85R} mutant mice are different from those of WT mice during the early phases of postnatal development. We used an *in-vitro* spinal cord preparation to study antidromically identified lumbar motoneurons during the postnatal period [postnatal days (P)6–10] when pups progressively stop crawling and begin to bear weight. The slope of the current intensity–voltage relationship (i.e. the input resistance R_{in}), action potential (AP) characteristics and the gain of the frequency vs. intensity of injected current relation [frequency–intensity (F–I) curve] of SOD1^{G85R} motoneurons were compared with those of WT

Correspondence: Dr J. Durand, as above.
E-mail: durand@dpm.cnrs-mrs.fr

Received 12 June 2006, revised 16 November 2006, accepted 20 November 2006

motoneurons. Dorsal root-evoked postsynaptic potentials (PSPs) were also recorded in order to evaluate whether an alteration of synaptic transmission has already occurred in this early period. Some of the results have been published in abstract form (Bories *et al.*, 2004).

Materials and methods

Transgenic mice

The SOD1^{G85R} transgenic mice (line 148, Bruijn *et al.*, 1997) were generously provided by U382 INSERM-Marseille (with agreement of the Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego, CA, USA). These transgenic mice were initially backcrossed to C57BL/6J (WT) for eight generations. The mice were then bred as homozygous transgenics in our laboratory. The C57BL/6J (WT) strain was used as control. The same length of gestation was observed for WT and SOD1^{G85R} mice. P0 was defined as the first 24 h after birth.

Surgical procedures

The experiments were performed on the isolated brainstem spinal cord preparation of neonate mice at P6–P10. All surgical and experimental procedures were in conformity with the European Communities council directive (86/609/EEC) and COPE (CNRS). Pups were anesthetized by hypothermia. They were then decerebrated at a postcollicular level, eviscerated and pinned to a Petri dish. Dorsal craniotomy and laminectomy were performed, allowing the spinal cord and brainstem to be removed, placed in a recording chamber, and perfused with an artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): NaCl, 130; KCl, 4; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 4; NaH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; glucose, 30; oxygenated with a 95% O₂/5% CO₂ mixture, adjusted to pH 7.4. The temperature of the bath solution was kept at 24 °C by a servo-controller (Harvard TC-202A).

Electrophysiology

Monopolar stainless steel electrodes were placed in contact with the ventral and dorsal roots of the L5 segment and insulated with petroleum jelly for recording (bandwidth 0.07–1 kHz) or stimulation using an isolation unit (Isoflex; AMPI, Jerusalem, Israel). Extracellular potentials were amplified (gain ×10 000) and digitized at 10 kHz (digidata 1322, Axon Instruments, CLAMPEX 9.0 software). Micropipettes for intracellular recording were made from 1.2-mm filament glass (Clark Instruments) using a pipette puller (model P-97, Sutter Instruments). Electrodes were filled with 2 M potassium acetate and their resistances ranged between 80 and 130 MΩ.

At the level of the fifth ventral root entry, the pia was carefully removed medially with very fine forceps under binocular control to allow microelectrode penetration. It is not excluded that such procedure may have cut some motor axons. Motoneurons were impaled at a depth of 150–450 μm from the ventral cord surface corresponding to the fifth lumbar segment with an angle of 30–45° using a Narishige three-dimensional hydraulic manipulator. Dorsal root-evoked reflexes were used to control the state of the preparation throughout the experiment.

Intracellular potentials were recorded with an Axoclamp-2B amplifier in current clamp (bridge or discontinuous-current-clamp modes) and digitized at 10 kHz by an A/D converter (Digidata 1322, Axon Instruments). CLAMPEX and CLAMPfit 9.0 were used to acquire, save and analyse the data on a computer. The motoneurons were

identified by their antidromic AP (see Fig. 2) evoked by the electrical stimulation of the cut fifth lumbar ventral root (L5). The L5 ventral root was chosen because it contains fewer pools of motoneurons (thus less heterogeneous populations) compared with L1–L4 lumbar roots in the mouse (McHanwell & Biscoe, 1981). Some motoneurons were identified by their orthodromic AP recorded on the ventral root during repetitive firing (see Fig. 3). The other neurons, not identified as motoneurons, will hereafter be called spinal neurons. This population may well have included a few motoneurons that were neither identified by antidromic stimulation nor by recording the centrifugal AP on the ventral root.

The intensity–voltage relationship was established by computing the voltage deviations in the last 50 ms of a 350-ms test pulse (−0.4 to 0.4 nA). No sag was observed in this range of current intensity. The rheobase current was determined as the minimal current intensity needed to evoke an AP during the intracellular injection of pulses that were performed to compute the F–I curve. The F–I relationship was computed by calculating the mean steady-state firing frequency during the last 500 ms of test pulses lasting up to 800 ms. The voltage threshold of the AP was measured when the motoneuron fired its first AP. The AP amplitude and duration were measured on both the antidromic AP and that evoked by direct intracellular current injection. Only the motoneurons with an overshooting AP and amplitude greater than 55 mV were kept for analysis. The after-hyperpolarization (AHP) consecutive to the orthodromic AP was thus studied during the F–I protocols or during the intensity–voltage curve measurement when the motoneuron fired (see Fig. 1A).

The F–I relationship proved linear along the explored ranges of injected current (see Fig. 3C). The upper limit of the investigated range of injected current was set to ensure stability of the recording. No secondary range was observed. One motoneuron was found to fire at the lowest intensity of injected current and its threshold for repetitive firing was thus not determined.

The first two membrane time constants τ_m and τ_1 were measured during the relaxation of the voltage after the depolarizing pulses elicited to measure the F–I relationship. Only subthreshold steps were analysed to limit measurements to passive conditions. Only 10 cells out of 27 WT and 13 out of 31 SOD1^{G85R} were kept as they gave consistent results during the relaxation from different levels of potentials. The membrane capacitance of the motoneuron and the electrotonic length of an equivalent cylindrical dendrite were estimated, respectively, as $C_m = \tau_m/R_{in}$ and $L = \pi/((\tau_m/\tau_1) - 1)^{1/2}$ (Rall, 1969).

Afferent synaptic potentials were evoked in lumbar L5 motoneurons by electrical stimulation of the corresponding ipsilateral L5 dorsal root (single shock, 300 μs; 3–15 μA at 0.05 Hz). In all cases, the threshold responses to peripheral stimulation were obtained for intensities in the range 3.5–5 μA. The PSPs were evoked at increasing intensity stimulation up to the AP threshold.

Statistical analysis

Developmental changes are likely to occur during the time period that we investigated (P6–P10). We therefore checked that the age distribution of the pups was not different between the WT and SOD1^{G85R} by dividing the data in two subgroups (P6–P7 and P8–P10). The number of recorded motoneurons in these subgroups was similar for the two samples (Fisher exact test, $P > 0.05$). Hence, the differences observed between the motoneurons of the two groups can be ascribed to the disease and not to the development of the pups at that age. Differences in the measured parameters between the two

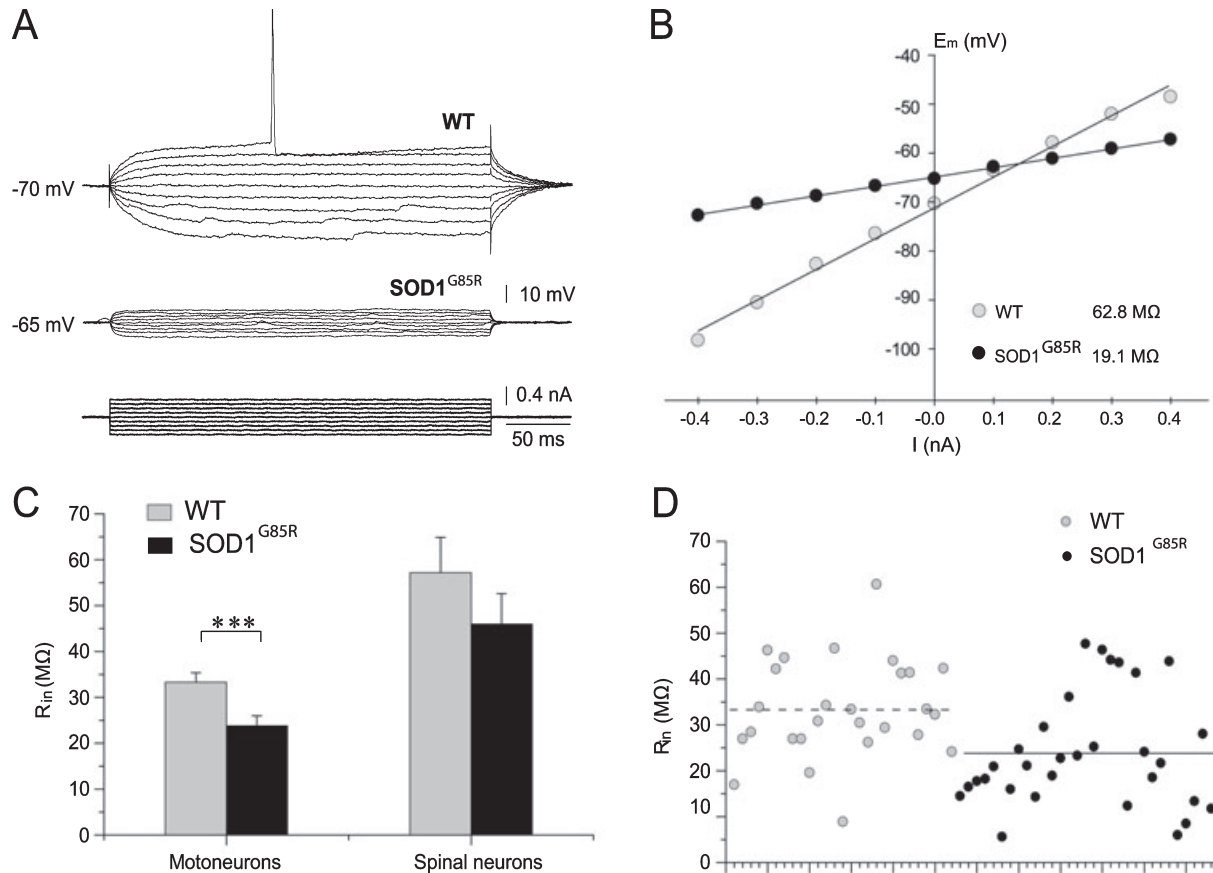


FIG. 1. The input resistance (R_{in}) of lumbar motoneurons from SOD1^{G85R} postnatal mice was lower than that measured in motoneurons from wild-type (WT) mice. (A) Voltage deflections (upper traces) elicited by a series of small steps of current (-0.4 to $+0.4$ nA, lower traces) injected through the microelectrode to construct the intensity–voltage (I – V) curve in two motoneurons (WT and SOD1^{G85R}). Only a few traces derived from current steps of 0.05 nA are illustrated in both examples. Note the small amplitudes of the depolarizations in the SOD1^{G85R} motoneuron compared with WT (same scale). The WT motoneuron with the highest R_{in} from the sample was chosen to illustrate the difference; it fired an action potential following current injection of $+0.4$ nA, whereas the SOD1^{G85R} motoneuron was far from reaching the voltage threshold for spiking. (B) I – V relationships of the two motoneurons shown in A. (C) Histograms of mean input resistances of the motoneurons ($n = 58$) and neurons ($n = 55$) of SOD1^{G85R} and WT mice. The difference between the mean input resistance of the motoneurons from the two groups was highly significant (unpaired t -test and permutation with general scores exact test, $P = 0.003$), whereas the spinal neurons of the two groups have a similar input resistance ($P = 0.27$). (D) Scatter plot of input resistances measured in lumbar motoneurons from WT (open circles, $n = 27$) and SOD1^{G85R} preparations (filled circles, $n = 31$). The mean values of the two groups are drawn with continuous (SOD1^{G85R}, $R_{in} = 23.8 \pm 2.2$ M Ω) and dashed (WT, $R_{in} = 33.3 \pm 2.1$ M Ω) lines. *** $P < 0.005$.

groups were tested using non-parametric exact tests (permutation with general scores test) or the non-parametric Mann–Whitney U -test. When the median of the sample was close to its mean value (for R_{in} and the slopes), we also used an unpaired t -test. The t -tests gave results identical to the exact tests. In all tests, $P < 0.05$ was considered significant. The results are expressed as mean \pm SEM. All statistical differences were tested using STATXACT 7.0 software (Cytel Inc., Cambridge, MA, USA).

Results

Intracellular recordings were performed from 58 lumbar motoneurons (WT, $n = 27$, $N = 7$ mice; SOD1^{G85R}, $n = 31$, $N = 8$ mice) and 55 spinal neurons that were recorded in the motor pool (WT, $n = 26$, $N = 12$ mice; SOD1^{G85R}, $n = 29$, $N = 14$ mice).

Input resistance

The motoneurons of WT and SOD1^{G85R} mice had similar resting membrane potentials (Table 1). However, the mean R_{in} of SOD1^{G85R}

motoneurons was lower than that of WT ($P = 0.003$; Fig. 1). The R_{in} was measured using protocols as illustrated in Fig. 1A. These two examples (WT and SOD1^{G85R}) of voltage deflections are shown in response to identical current pulse injections. The corresponding plots of the intensity–voltage relationship for the two motoneurons are illustrated in Fig. 1B. The difference in the mean R_{in} , as shown by the histograms in Fig. 1C, strongly suggests that the motoneurons are already deeply affected by the mutation at age P6–P10. It should be noted that the lower average value of the R_{in} of motoneurons from SOD1^{G85R} mice did not reflect a shift of the R_{in} of all of the motoneurons but a differential effect on the subpopulations of motoneurons with low R_{in} . This is illustrated by the scatter plot of the R_{in} in Fig. 1D. Only one motoneuron from the WT animals had an R_{in} lower than 15 M Ω compared with 26% (8/31) of the motoneurons from the SOD1^{G85R} animals. The number of motoneurons with high R_{in} (higher than 40 M Ω) was similar in the two groups (SOD1^{G85R}, 6/31; WT, 9/27). We then measured the membrane time constants of the WT and SOD1^{G85R} motoneurons (τ_m and τ_1 , see Table 1). No difference was found between the two groups of motoneurons, suggesting that a change of membrane surface, not of membrane resistivity, is responsible for the decrease of R_{in} . Accordingly, the

TABLE 1. Motoneuron electrical properties

	WT	SOD1 ^{G85R}
V_{rest} (mV)	-64.3 ± 1.1	-64.9 ± 1.3
R_{in} (MΩ)	33.3 ± 2.1	23.8 ± 2.2***
Cells (<i>n</i>)	(27)	(31)
Anti AP (mV)	71.4 ± 1.9	72.1 ± 1.5
Half-width (ms)	1.3 ± 0.04	1.2 ± 0.1
Time to peak (ms)	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Cells (<i>n</i>)	(22)	(18)
Ortho AP (mV)	56.9 ± 1.8	53.4 ± 1.5
Half-width (ms)	1.0 ± 0.04	1.1 ± 0.04
Time to peak (ms)	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.1
AHP (mV)	9.2 ± 0.5	9.7 ± 0.7
AHP duration (ms)	142 ± 10	150 ± 9
AHP 1/2 duration (ms)	64 ± 6	72 ± 5
Cells (<i>n</i>)	(21)	(22)
Rheobase (nA)	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.2*
Threshold (mV)	-45.1 ± 0.9	-45.1 ± 0.8
Slope (Hz/nA)	18.4 ± 2.0	13.2 ± 0.9*
I_{max} (nA)	2.4 ± 0.3	3.4 ± 0.3*
f_{max} (Hz)	36.3 ± 3.3	34.8 ± 2.8
Cells (<i>n</i>)	(15)	(17)
τ_m (ms)	10.6 ± 1.7	9.7 ± 1.0
τ_1 (ms)	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2
C_m (pF)	316 ± 34	551 ± 97*
L (λ)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Cells (<i>n</i>)	(10)	(13)

V_{rest} , resting potential; R_{in} , input resistance; anti and ortho AP, amplitude of antidromic and orthodromic action potentials, respectively; half-width, measured as the time (ms) spent by the membrane potential above 50% of the total amplitude of the action potential; time to peak, measured as the time needed for the potential to deviate from 5 to 95% of the total amplitude; AHP, postspike after-hyperpolarization amplitude, duration and half duration; rheobase, lowest intensity of current injected through the electrode to construct the frequency–intensity (F–I) curve eliciting an action potential was used as the criterion for rheobase current (nA) measurements; threshold, voltage threshold measured at the foot of the orthodromic action potential; slope, slope of the steady-state F–I curves; I_{max} , maximal current injected through the microelectrode to obtain the maximal steady-state frequency; f_{max} , maximal steady-state frequency; τ_m and τ_1 , membrane time constants; C_m , membrane capacitance; L , electrotonic length; *n*, number of cells; WT, wildtype. All values are means ± SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

capacitance of the motoneurons was higher in SOD1^{G85R} than in WT mice ($P = 0.04$; Table 1) and the estimated electrotonic lengths were similar (Table 1).

As a developmental change may occur during this postnatal period (P6–P10), we divided the data into two equal-sized age groups corresponding to P6–P7 and P8–P10. No statistical difference was found between the R_{in} of the motoneurons in the first group (P6–P7; WT, 30.8 ± 2.5 MΩ, $n = 17$; SOD1^{G85R}, 25.5 ± 2.6 MΩ, $n = 22$). In the second group (P8–P10), however, the R_{in} of the motoneurons exhibited a large difference that was highly significant (WT, 37.6 ± 3.4 MΩ, $n = 10$; SOD1^{G85R}, 19.5 ± 3.9 MΩ, $n = 9$; $P = 0.003$).

No differences of resting membrane potential (WT, -63.3 ± 2.0 mV, $n = 26$, $N = 12$; SOD1^{G85R}, -63.0 ± 1.5 mV, $n = 29$, $N = 14$) or R_{in} (WT, 57.2 ± 7.7 MΩ, $n = 26$; SOD1^{G85R}, 46.0 ± 6.6 MΩ, $n = 29$; $P = 0.27$) were observed between the spinal neurons from the two groups of animals (Fig. 1D). The mean R_{in} of the spinal neurons was almost twice that of the motoneurons.

As expected from their lower R_{in} , the mean rheobase current of motoneurons from SOD1^{G85R} mice was higher compared with that obtained in motoneurons from WT mice (Table 1). The spinal neurons did not show such a difference in rheobase current (WT, 1.6 ± 0.3 nA, $n = 10$; SOD1^{G85R}, 1.8 ± 0.4 nA, $n = 10$; $P = 0.41$).

Action potential and after-hyperpolarization characteristics

Action potential shape was previously found to be different in motoneurons cultured from control (overexpressing the non-mutated human SOD1 protein) and SOD1^{G93A} embryos (Pieri *et al.*, 2003). In this study, the duration and falling phase of the AP were significantly shorter in the transgenic cells in culture. In two subsequent studies (Kuo *et al.*, 2004, 2005), no differences were found in amplitude and duration of the AP measured in cultures from neonatal motoneurons. We therefore measured the AP characteristics to assess whether the AP was similar in motoneurons from the developing animals.

Measurements were made from antidromic and orthodromic APs. All measured characteristics of APs were indistinguishable between the motoneurons from SOD1^{G85R} and WT mice (see in Table 1). The voltage threshold for the orthodromic AP was similar in motoneurons from WT and SOD1^{G85R} mice (Table 1). This is in agreement with studies in organotypic cultures from neonates and embryonic tissues (Kuo *et al.*, 2004, 2005), where no difference in the voltage threshold for AP was reported between control and SOD1^{G93A} cell cultures. Examples of responses to antidromic and orthodromic stimulations of WT motoneurons are shown in Fig. 2. In about one-third of the motoneurons, depolarizing potentials were clearly evident following subthreshold antidromic stimulation of the L5 ventral root (Fig. 2A) and they contaminated the AHP of evoked impulses (Fig. 2B), thereby precluding accurate determination of AHP duration. These depolarizing synaptic potentials were blocked by 1 μM strychnine ($n = 2$), indicating Renshaw cell activation (Eccles *et al.*, 1954). Therefore, the characteristics of the postspike AHP were only measured following the orthodromic AP elicited during the long depolarizing steps of the F–I protocols (Fig. 2C and D). No differences in AHP characteristics were found between the two groups of motoneurons (see Table 1).

Input–output relationship

The firing rate of motoneurons was previously shown to be higher in cultures from SOD1^{G93A} transgenic animals than in control mice (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004). In a later study, the hyperexcitability was demonstrated for the cells with low R_{in} (Kuo *et al.*, 2005). We therefore analysed the steady-state firing properties of the motoneurons from WT and SOD1^{G85R} mice to assess if such differences were present in the developing animals. The same proportion (about 80%) of motoneurons from WT and SOD1^{G85R} animals were able to sustain repetitive firing in response to long pulses of depolarizing current. Examples of responses obtained in two motoneurons are illustrated in Fig. 3 (WT in A and SOD1^{G85R} in B). Initiation of repetitive firing required substantially higher current intensities in motoneurons from the SOD1^{G85R} animals (1.74 ± 0.3 nA, $n = 16$) compared with motoneurons from WT animals (1.2 ± 0.2 nA, $n = 15$). This difference is in line with the lower R_{in} of motoneurons from the SOD1^{G85R} animals. The slope of the F–I relationship of the SOD1^{G85R} motoneurons was lower than the slope of the F–I curves in WT motoneurons ($P = 0.014$; Fig. 3D). Despite these differences, the maximum firing frequency was similar for the motoneurons from the SOD1^{G85R} and WT animals (Table 1).

We also subdivided the age group into two groups of equivalent sizes for the WT and SOD1^{G85R} mice (P6–7 and P8–10). This showed that the gain of the motoneurons was already different in the young animals (WT, 20.1 ± 2.5 Hz/nA, $n = 11$; SOD1^{G85R}, 12.7 ± 0.8 Hz/nA, $n = 12$; $P = 0.0045$), whereas no difference was found in the older mice (WT, 14.5 ± 2.1 Hz/nA, $n = 4$; SOD1^{G85R}, 13.8 ± 1.3 Hz/nA, $n = 4$; $P = 0.8$).

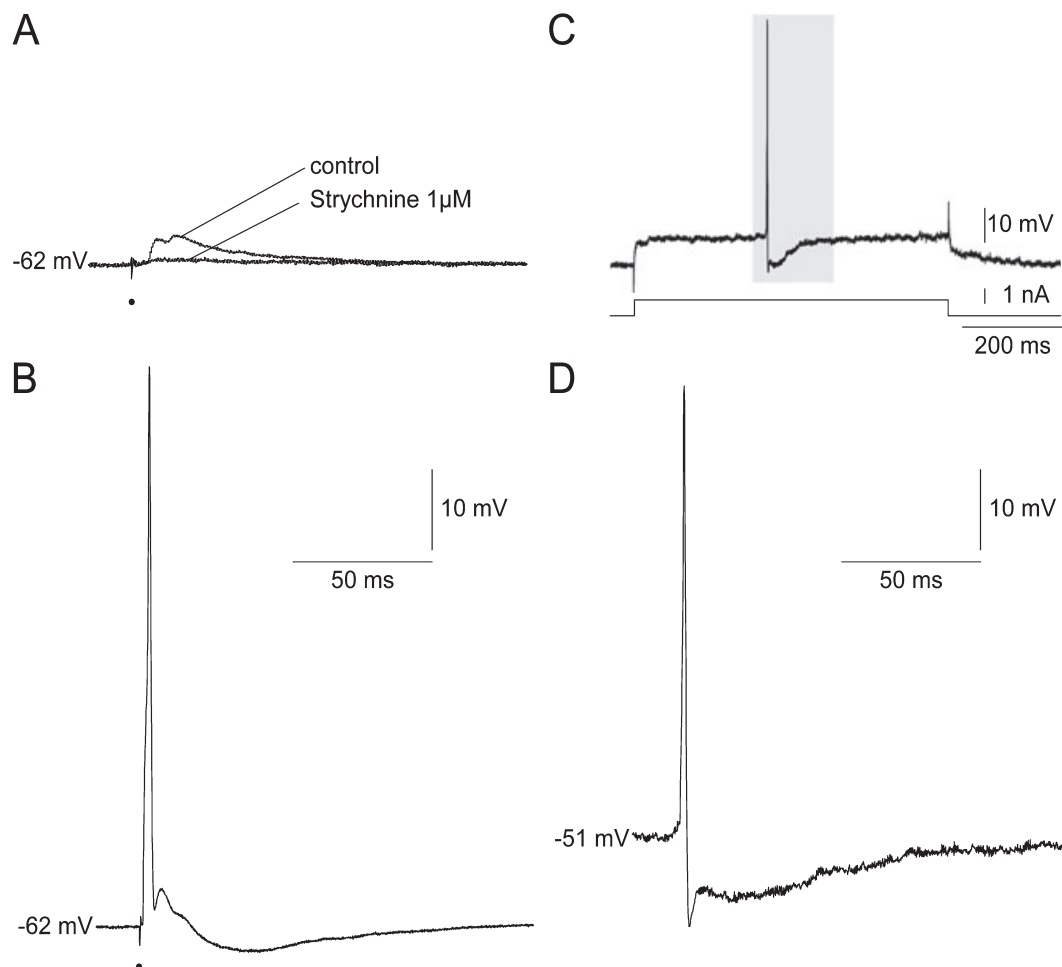


FIG. 2. Antidromic and orthodromic action potentials (APs) in mouse lumbar motoneurons. (A) Subthreshold stimulation of the cut ventral root elicited a synaptic potential in the motoneuron. Bath application of strychnine ($1 \mu\text{M}$) eliminated the synaptic potential. Such recurrent potentials were depolarizing and were observed in about 30% of the motoneurons of both wild-type (WT) and $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ animals. This percentage may be underestimated in both cases as we did not systematically analyse their occurrence at various membrane potentials to reveal the reversal potential for Cl^- . (B) The supra-limiar stimulation of the ventral root elicited an antidromic AP that can be recorded in the soma by the intracellular electrode at a latency of 0.75–3.8 ms (the peripheral conduction delay depending on both the axonal conduction velocity and the distance between the wire electrode and cord). Same scale for A and B. (C) The first AP elicited in the series of long-lasting depolarizing pulses was taken as a representative orthodromic AP for characteristic measurements (see Table 1). (D) The orthodromic AP obtained by direct intracellular stimulation (enlargement of the shaded area in C) is shown at the same scale as B to emphasize the differences in AP amplitude and after-hyperpolarization characteristics in comparison with antidromic conditions. In both cases, the different parameters have been compared between WT and $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ motoneurons (see Table 1).

The spinal neurons showed no difference in the slope of the F–I curve (WT, $15.4 \pm 2.6 \text{ Hz/nA}$, $n = 8$; $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$, $17.8 \pm 2.4 \text{ Hz/nA}$, $n = 10$; $P = 0.49$; Fig. 3D).

Dorsal root-evoked potentials

Sensory PSPs (mixed inhibitory and excitatory) were evoked in antidromically identified motoneurons by electrical stimulation of the corresponding L5 dorsal root. The current intensities ($3.5\text{--}5 \mu\text{A}$) for PSP production were similar for both groups (WT, $n = 22$; $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$, $n = 18$) and no significant differences in the dorsal root-evoked PSP characteristics (amplitude, time to peak, half-width and duration) were found between motoneurons when using low-intensity stimuli (Fig. 4A, B, D and E; Table 2).

However, higher stimulus intensities ($> 1.3 \times$ threshold), up to the threshold for orthodromic AP generation, elicited PSPs with significantly lower amplitudes in $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ motoneurons (Fig. 4F and Table 2).

Discussion

Our results show for the first time that abnormalities in the electrical properties of motoneurons from SOD1 transgenic mice occur during the postnatal period. These abnormalities were not observed between the other spinal neurons.

Input resistance of developing mice motoneurons

A possible explanation for the lower R_{in} in motoneurons from $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ animals is that they are larger than motoneurons from WT animals. This hypothesis is supported by the measurements of membrane time constants, which are identical in the two groups of motoneurons. As a consequence of the surface increase, the membrane capacitance of $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ motoneurons proved to be higher than in the WT animals. Finally, the first equilibration time constant (τ_1) was similar in both groups of motoneurons. Accordingly, the estimated electrotonic lengths were similar, suggesting that the surface increase

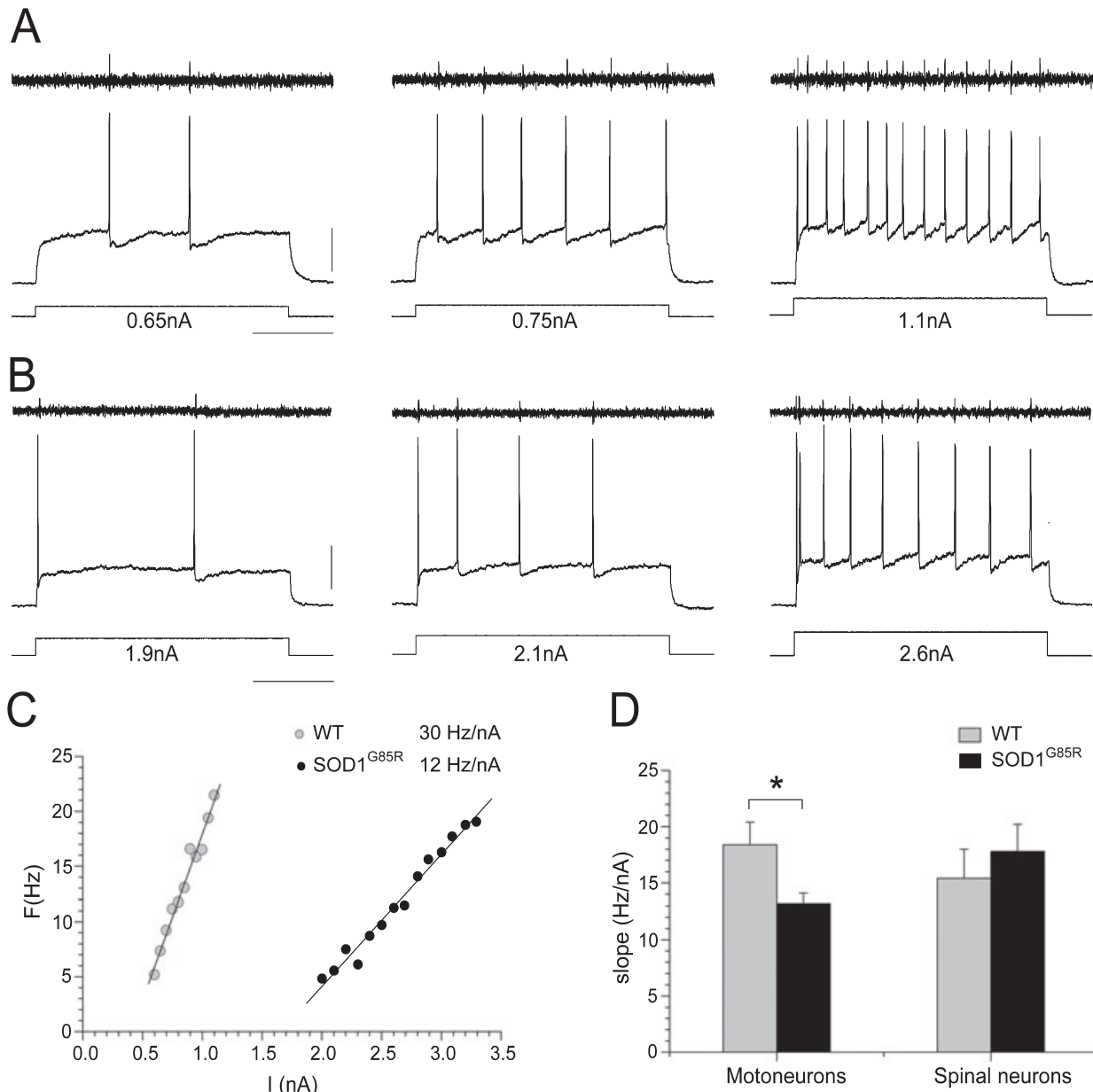


FIG. 3. The slope of the frequency–intensity (F–I) relationship in lumbar motoneurons from $SOD1^{G85R}$ postnatal mice was lower than that obtained in motoneurons from wild-type (WT) mice. (A and B) The upper trace shows the potential recorded from a wire electrode in contact with the L5 ventral root. The action potentials elicited by the current injection in the soma can be observed at the periphery, thereby confirming the identification of the motoneuron. Lower traces: voltage deflections obtained from WT (A) and $SOD1^{G85R}$ (B) postnatal day 7 motoneurons in response to injected pulses at three different current intensities. Note that the current evoking discharge firing in the WT motoneuron was lower than that needed for the $SOD1^{G85R}$ motoneuron. Same scale for A and B; 20 mV and 200 ms. (C) Steady-state F–I curves of the two motoneurons shown in A and B (WT, open circles; $SOD1^{G85R}$, filled circles). The instantaneous frequency of firing was averaged during the last 500 ms of the current pulse to construct the steady-state F–I curve. (D) Histograms of the slopes of the F–I relationships of the motoneurons ($n = 32$) and spinal neurons ($n = 20$). No difference was observed between the spinal neurons of WT and $SOD1^{G85R}$ groups whereas the slope of the F–I relationship of the $SOD1^{G85R}$ motoneurons (13.2 ± 0.9 Hz/nA; $n = 17$) was less than that of the WT motoneurons (18.4 ± 2.0 Hz/nA, $n = 15$, $P = 0.02$). * $P < 0.05$.

of motoneurons from $SOD1^{G85R}$ animals is likely to be due either to a larger soma or to a higher number of dendritic branches but not to an increased length of the dendrites. The morphology of these developing motoneurons is currently under investigation in this laboratory.

Three preceding studies, based on cultured cells from $SOD1^{G93A}$ embryos or neonate mice, did not report such a difference in R_{in} between the two animal types (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004, 2005). This may be due to the culture conditions that do not allow neurons to grow normally or to the length of time that the tissues were maintained in culture. It is possible that cultured tissues are too mature

to exhibit a difference similar to the early symptom described in the present study. Another explanation would lie in the fact that we have not observed any difference between the spinal neurons of the two groups. Hence if the recordings of neurons in organotypic cultures incorporated too many such neurons, no difference could have been observed.

Recent data show that the fast fatiguable motoneurons are first affected in both $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G85R}$ mice models (Pun *et al.*, 2006), whereas the slow motoneurons (with the highest R_{in}) not only resist the disease but reinnervate the fast muscle fibers (sprouting). Our

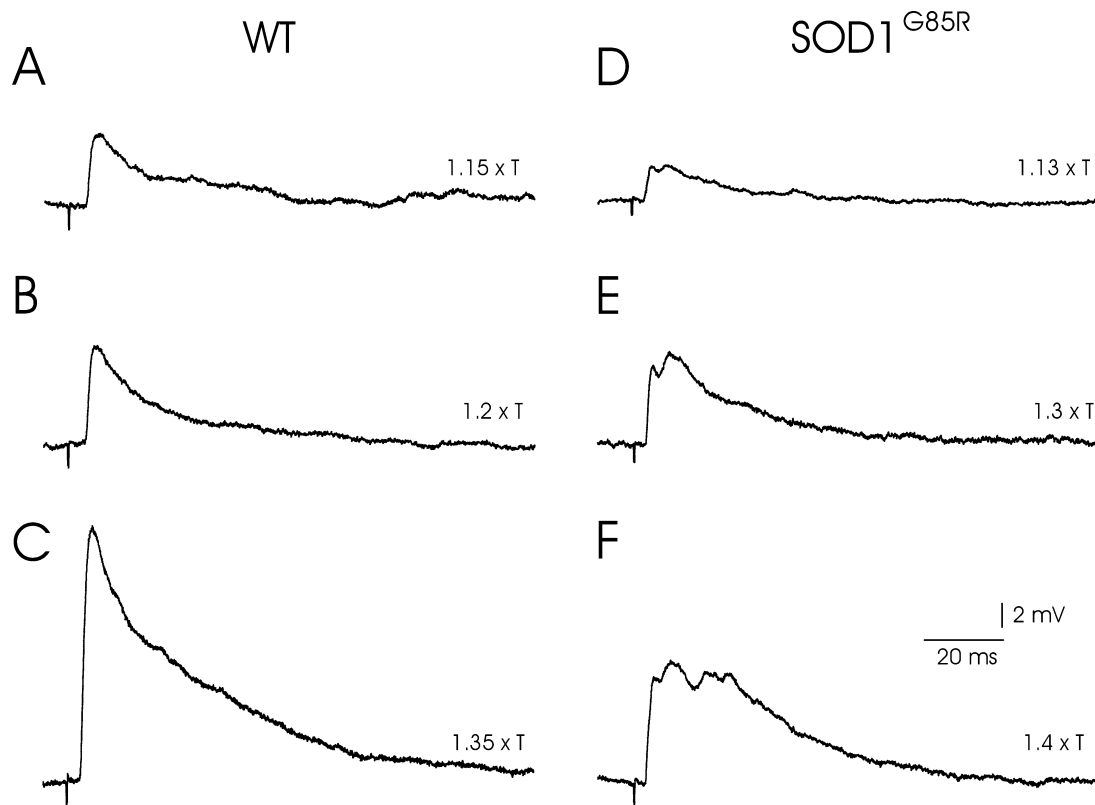


FIG. 4. Dorsal root-evoked postsynaptic potentials (PSPs) in wild-type (WT) and SOD1^{G85R} motoneurons. (A–C) Responses evoked at increasing intensity stimulation applied to the ipsilateral L5 dorsal root in a postnatal day (P)9 WT motoneuron ($E_m = -67$ mV). Note the large amplitude of the synaptic potential at $1.35 \times$ threshold (T). (D–F) Responses evoked at increasing intensity stimulation applied to the ipsilateral L5 dorsal root in a P9 SOD1^{G85R} motoneuron ($E_m = -61$ mV). Note the smaller PSP in the SOD1^{G85R} motoneuron (at $1.4 \times$ T) in F compared with that obtained at $1.35 \times$ T in the WT motoneurons in C. Five averaged traces for each PSP. Same calibration for all of the records in F.

TABLE 2. Dorsal root-evoked synaptic potential characteristics

	Low stimulus intensity ($< 1.3 \times T$)		$1.3 \times T < \text{stimulus intensity} < 5 \times T$	
	WT	SOD1 ^{G85R}	WT	SOD1 ^{G85R}
Amplitude (mV)	5.95 ± 1.3 (3.4–15)	4.2 ± 1.9 (1.56–13.6)	18 ± 3 (7.5–25)	15.2 ± 5.4 (6.2–21)*
Time to peak (ms)	4.4 ± 4.6 (1.6–27)	6.2 ± 3.1 (1.6–25)	5.3 ± 2.5 (1.46–28)	3.3 ± 1.4 (1.44–35.7)
Half-width (ms)	31 ± 27 (4.6–114)	21 ± 15 (6.45–154)	90 ± 40 (5.8–213)	57 ± 15 (7.4–950)
Duration (ms)	165 ± 113 (55–2000)	93 ± 66 (40–2900)	1200 ± 486 (120–2500)	915 ± 1101 (120–9000)
Motoneurons (n)	(22)	(18)	(17)	(16)

Postsynaptic potentials (PSPs) evoked in motoneurons by stimulation of the L5 dorsal root; threshold for PSP production ($< 1.3 \times T$); threshold for orthodromic action potential generation (between $1.3 \times T$ and $5 \times T$). * $P = 0.035$, permutation with general scores test. Values are median \pm quartile (with range in parentheses). WT, wild-type.

data also suggest that the motoneurons were impaired in a selective way by the mutation at this early stage of the disease, the motoneurons with a low R_{in} being affected in the transgenic animals whereas those with a high R_{in} seem to be spared.

Action potential characteristics; frequency–intensity relationship

The AP characteristics were similar in the motoneurons from the two groups of mice. Furthermore, the change of rheobase strictly compensates for the change of R_{in} , thereby indicating that triggering of an AP in the motoneurons is primarily determined by the (same) voltage threshold. These observations suggest that the voltage-dependent properties of the motoneurons responsible for AP generation are not altered by the mutation.

The difference in R_{in} between the two groups of motoneurons cannot account for the steepness of their F–I relation as, in the youngest animals, no change in R_{in} was detectable although a less steep slope was already measured. The slope of the F–I curve of an ‘integrate and fire’ neuron with AHP does not depend on the neuron’s capacitance but on its time constant (Meunier & Borejsza, 2005). The membrane time constants of the WT and SOD1^{G85R} motoneurons were identical. Therefore, the size increase of motoneurons from mutant animals should not directly influence the slope of their F–I curve.

The amplitude of the AHP is determined by the balance between AHP and leak conductances. The similar AHP amplitudes despite a large difference in R_{in} thus suggest a constant ratio of AHP to leak conductances. The conductance sustaining the AHP should be increased in the motoneurons of lower R_{in} (in the SOD1^{G85R} mice).

In these motoneurons, the mutation seems to alter the intimate morphology of the motoneurons with a high functional consequence, probably through a modification of the distribution of Ca^{2+} and K^{+} channels responsible for the AHP, at a time when calcium channels become functionally mature (Carlin *et al.*, 2000). Again the difference in the gain of the F–I curve was not observed between the spinal neurons of the two groups.

Motoneuron specificity

The degeneration that occurs during ALS targets motoneurons with relative precision as some motor nuclei are relatively spared by the illness (the extra-ocular nuclei and the Onuf's nucleus, see Bruijn *et al.*, 2004). Such specificity, observed in human patients, is also present in the mouse model, as the bladder and pelvic motoneurons are spared whereas other nuclei are drastically affected (Hamson *et al.*, 2002). A further indication of such specificity in the SOD1^{G85R} mouse is the fact that pharmacological activation of spinal rhythmic networks is impaired at the lumbar level but unaffected in the sacral segments (Amendola *et al.*, 2004). We have now found that although the electrical properties of lumbar motoneurons display abnormalities, other non-identified spinal neurons do not. However, these neurons were recorded close to the pool of motoneurons in the ventro-lateral cord and we cannot exclude the possibility that changes in electrical properties occurred in other populations of spinal neurons, such as those located near the ventral commissure (Kullander *et al.*, 2003; Hinckley *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005).

Synaptic activation

The dorsal root-evoked synaptic potentials recorded in motoneurons from WT animals were similar to those described in the spinal cord of neonate mouse (Li & Burke, 2002) or rat lumbar motoneurons (Seebach & Mendell, 1996). When using low stimulus intensity, no significant differences in dorsal root-evoked PSP characteristics were found between motoneurons from WT and SOD1^{G85R} mice. The early part of dorsal root-evoked excitatory PSPs could be attributed to monosynaptic activation, which mainly involves AMPA receptors (Engberg *et al.*, 1993; Pinco & Lev-Tov, 1993). This initial part was not altered, suggesting that monosynaptic Ia excitation and AMPA receptor-associated channels function normally in the SOD1^{G85R} pups. However, the synaptic potentials at low intensity stimulation were similar although R_{in} were different. This could indicate changes in synaptic action as the same currents should produce lower voltage potentials in motoneurons with lower resistances. Such synaptic change may include different location of synapses, proliferation of new terminals or growth of existing terminals.

Concerning polysynaptic activation using strong stimulus intensities, composite PSPs (mixed excitatory and inhibitory) were found to be different between WT and SOD1^{G85R} animals (see Table 2), strongly suggesting that early alterations of the organization of spinal motor circuitry might occur in the transgenic animals, long before disease onset. We previously hypothesized early compensatory mechanisms with possible reorganization of synaptic inputs (Amendola *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2006). Our results are in accordance with observations from organotypic spinal cord slice cultures showing that the synaptic coverage of motoneurons was different between slices from SOD1^{G93A} mice and from control animals (Avossa *et al.*, 2006).

In conclusion, lumbar motoneurons from SOD1^{G85R} mice do not develop normally during the second postnatal week when mice start

to bear weight and walk. The R_{in} of motoneurons becomes lower and the membrane capacitance higher, strongly suggesting morphological changes and synaptic re-organization of the spinal inputs to motoneurons. Whether these developmental changes are an adaptation of the nervous system to preserve the integrity of the motor units remains to be determined. Peripheral denervation was recently shown to be the predominant pathological feature of motoneuron disease (Gould *et al.*, 2006). However, these authors do not exclude the possibility of a centrally initiated mechanism to explain the denervation. Here, we show that motoneuron dysfunction appears centrally long before axonal degeneration (Bruijn *et al.*, 1997, 1998; Williamson & Cleveland, 1999; Pun *et al.*, 2006). These motoneuronal alterations, which are the earliest described in an ALS model, may lead to perturbations of the synapse tightening between nerve endings and muscles at a time when polyneuronal innervation is still present (Buffelli *et al.*, 2002; Fields & Stevens-Graham, 2002; Hausmanowa-Petrusewicz & Vrbova, 2005).

Acknowledgements

This work was supported by grant no. 11117 from Association Française contre les Myopathies (AFM). J.A. is a research fellowship grant recipient from AFM. We thank Drs Suzanne Tyc-Dumont, Claude Meunier, Daniel Zytnicki and the late Professor Ingemar Engberg for valuable comments on a first version of the manuscript. We also thank Professor Philippe Ascher for his valuable comments on the last version and Brandon Stell for English corrections.

Abbreviations

AHP, after-hyperpolarization; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AP, action potential; F–I, frequency–intensity; G85R, superoxide dismutase 1 allele with glycine 85 substituted for arginine; L, lumbar; P, postnatal day; PSP, postsynaptic potential; R_{in} , input resistance; SOD1, superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

References

- Amendola, J., Verrier, B., Roubertoux, P. & Durand, J. (2004) Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2822–2826.
- Avossa, D., Grandolfo, M., Mazzarol, F., Zatta, M. & Ballerini, L. (2006) Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: Characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience*, **138**, 1179–1194.
- Bories, C., Lamotte d'Incamps, B. & Durand, J. (2004) Early electrophysiological abnormalities in lumbar spinal motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. In *The World of the Synapse: Molecular Basis, Pathologies and Drug Discovery – Conferences en Neurobiologie Ladislav Tauc* [Gif Sur Yvette, France, December 9–10, 2004]. Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Institut Alfred Fessard and CNRS, p.8.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L. & Cleveland, D.W. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, **18**, 327–338.
- Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W. & Cleveland, D.W. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, **281**, 1851–1854.
- Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 723–749.
- Buffelli, M., Busetto, G., Cangiano, L. & Cangiano, A. (2002) Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: Link with synapse elimination. *PNAS*, **99**, 13 200–13 205.

- Carlin, K.P., Jiang, Z. & Browstone, R.M. (2000) Characterization of calcium currents in functionally mature mouse spinal motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1624–1634.
- Charcot, J.M. (1865) Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière chez une femme hystérique, atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris [Second Series]*, **2**, 24–35.
- Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 806–819.
- Durand, J., Amendola, J., Bories, C. & Lamotte d'Incamps, B. (2006) Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. Paris*, **99**, 211–220.
- Eccles, J.C., Fatt, P. & Koketsu, K. (1954) Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol.*, **126**, 524–562.
- Engberg, I., Tarnawa, I., Durand, J. & Ouardouz, M. (1993) An analysis of synaptic transmission to motoneurons in the cat spinal cord using a new selective receptor blocker. *Acta Physiol. Scand.*, **148**, 97–100.
- Fields, R.D. & Stevens-Graham, B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science*, **298**, 556–562.
- Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E. & Oppenheim, R.W. (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J. Neurosci.*, **26**, 8774–8786.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L. & Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, **264**, 1772–1775.
- Hamson, D.K., Hu, J.H., Krieger, C. & Watson, N.V. (2002) Lumbar motoneuron fate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, **13**, 2291–2294.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I. & Vrbova, G. (2005) Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis. *Neuroreport*, **16**, 657–661.
- 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. *J. Neurophysiol.*, **93**, 1439–1449.
- Kullander, K., Butt, S.J., Lebret, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydström, A., Klein, R. & Kiehn, O. (2003) Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science*, **299**, 1889–1892.
- Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N., Fu, R., Bar, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J. & Kroese, A.B. (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.*, **91**, 571–575.
- Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R. & Heckman, C.J. (2005) Increased persistent Na⁽⁺⁾ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol.*, **563**, 843–854.
- Li, Y. & Burke, R.E. (2002) Developmental changes in short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.*, **88**, 3218–3231.
- McHanwell, S. & Biscoe, T.J. (1981) The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **293**, 477–508.
- Meunier, C. & Borejsza, K. (2005) How membrane properties shape the discharge of motoneurons: a detailed analytical study. *Neural Comput.*, **17**, 2383–2420.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S. & Zona, C. (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, **351**, 153–156.
- Pinco, M. & Lev-Tov, A. (1993) Synaptic excitation of alpha-motoneurons by dorsal root afferents in the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, **70**, 406–417.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.*, **9**, 408–419.
- Rall, W. (1969) Distributions of potential in cylindrical coordinates and time constants for a membrane cylinder. *Biophys. J.*, **9**, 1509–1541.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. & Brown, R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59–62.
- Schutz, B. (2005) Imbalanced excitatory to inhibitory synaptic input precedes motor neuron degeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.*, **20**, 131–140.
- Seebach, B.S. & Mendell, L.M. (1996) Maturation in properties of motoneurons and their segmental input in the neonatal rat. *J. Neurophysiol.*, **76**, 3875–3885.
- Williamson, T.L. & Cleveland, D.W. (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.*, **2**, 50–56.
- Wilson, J.M., Hartley, R., Maxwell, D.J., Todd, A.J., Lieberam, I., Kaltschmidt, J.A., Yoshida, Y., Jessell, T.M. & Brownstone, R.M. (2005) Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein. *J. Neurosci.*, **25**, 5710–5719.
- Wooley, C.M., Sher, R.B., Kale, A., Frankel, W.N., Cox, G.A. & Seburn, K.L. (2005) Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve*, **32**, 43–50.

ANNEXE III: *Morphological Differences Between Wild-Type and Transgenic SOD1 Lumbar Motoneurons in Postnatal Mice*

Morphological Differences Between Wild-Type and Transgenic Superoxide Dismutase 1 Lumbar Motoneurons in Postnatal Mice

JULIEN AMENDOLA AND JACQUES DURAND*

UMR 6196, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Plasticité et Physiopathologie de la Motricité, Université de la Méditerranée, 13402 Marseille Cedex 20, France

ABSTRACT

Quantitative analysis of the dendritic arborizations of wild-type (WT) and superoxide dismutase 1 (SOD1) postnatal mouse motoneurons was performed following intracellular staining and 3D reconstructions with NeuroLucida system. The population of lumbar motoneurons was targeted in the caudal part of the L5 segment, and all labeled motoneurons were located within the same ventrolateral pool. Despite the similar size of the soma and the mean diameter of primary dendrites, the dendritic arborizations of the WT and SOD1 motoneurons showed significant differences in terms of their morphometric parameters. The metric and topological parameters of dendrites show that the total dendritic length and surface area and total number of segments, branching nodes, and tips per motoneuron were significantly higher in SOD1 motoneurons. Our main finding concerns a proliferation of dendritic branches starting at about 100 μm from the soma in the SOD1 motoneurons. However, the longest and mean dendritic paths from soma to terminations were similar, giving a comparable envelope of the dendritic fields. Indeed, the SOD1 motoneurons were larger as a result of abnormal branching. The results suggest that a defect in pruning mechanisms occurs during this developmental period. The abnormal growth of the dendritic arborizations and the reduced excitability of postnatal SOD1 motoneurons could be a neuroprotective response and would represent an early compensatory mechanism against the activity-induced toxicity. *J. Comp. Neurol.* 511:329–341, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: ALS; dendrites; neurodegenerative disease; abnormal branching; spinal cord

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a human neurodegenerative disease characterized by a selective loss of motor neurons in spinal cord, brainstem, and motor cortex. Mutation of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) is one proven cause of familial ALS (Rosen et al., 1993). Although more than 130 mutations in the SOD1 gene are known to be responsible for ALS, only a subset of familial ALS cases is related to dominant missense mutations of SOD1 gene. However, sporadic and familial forms of the disease are clinically indistinguishable, suggesting that they may share common mechanisms (Boillee et al., 2006; Bruijn et al., 2004). Transgenic mice expressing a mutated human SOD1 gene develop a motor neuron disease similar to familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). The initial mechanisms underlying the progressive degeneration of motoneurons and the disconnection between motor axons and muscular fibers can be studied in transgenic

mouse models of ALS (Boillee et al., 2006; Bruijn et al., 2004; Gurney et al., 1994). Early abnormalities have been described in motoneurons during embryonic and postnatal periods (Bories et al., 2007; Durand et al., 2006; Kieran et

Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Grant sponsor: Association Française contre les Myopathies (AFM; to J.A.); Grant number: 11117; Grant sponsor: Association pour la recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres maladies du motoneurone (ARS).

*Correspondence to: Jacques Durand, UMR CNRS 6196 P3M, Laboratoire de Plasticité et Physiopathologie de la Motricité, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

E-mail: durand@dpm.cnrs-mrs.fr

Received 12 March 2008; Revised 12 May 2008; Accepted 11 July 2008

DOI 10.1002/cne.21818

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

al., 2005; Raoul et al., 2002). Slowing of retrograde axonal transport was already present in motoneurons of SOD1^{G93A} mice during embryonic development (Kieran et al., 2005). Both fast and slow axonal transports were impaired in the ventral roots of these mice, coinciding with the appearance of neurofilament inclusions and vacuoles in the axons and perikarya of vulnerable motoneurons (Zhang et al., 1997).

ALS lesions such as fragmentation of the Golgi apparatus and neurofilament (NF)-rich inclusions were observed in surviving motoneurons (Boillee et al., 2006; Bruijn et al., 2004; Julien, 2001). It was shown in legs-at-odd-angles (Loa) mice that mutations in the motor protein dynein were associated with axonal transport defects and motoneuron degeneration (Kieran et al., 2005). We have also detected early abnormalities during the maturation of motor systems in the SOD1^{G85R} transgenic mouse model (Amendola et al., 2004; Bories et al., 2007; Durand et al., 2006). In particular, we have recently shown that the mean input resistance of motoneurons from SOD1^{G85R} mice was lower than that of wild-type animals (WT), whereas their membrane capacitance was increased, suggesting larger SOD1^{G85R} motoneurons (Bories et al., 2007). Here we sought to verify whether the size of these SOD1 motoneurons was increased compared with WT mice. For this purpose, we studied the morphology of the reconstructed dendritic arborizations of both types and analyzed their morphometric properties. We verified the hypothesis that a modification of the size of motoneurons can be an early sign of the pathology. Part of this work has been published in abstract forms and in the proceedings of an international symposium (Amendola et al., 2006, 2007a,b).

MATERIALS AND METHODS

All surgical and experimental procedures were in conformity with European Communities council directive 86/609/EEC. The SOD1^{G85R} (line 148) transgenic mice (Bruijn et al., 1997) were originally provided by U382 INSERM-Marseille with the agreement of the Ludwig Institute for Cancer Research (San Diego, CA). In these mice, expression of human SOD1 mutant with glycine substituted for arginine at position 85 (SOD1^{G85R}) causes motor neuron loss and rapidly progressing disease, without change in SOD1 activity (Bruijn et al., 1997, 1998). These transgenic mice were initially back-crossed to C57BL/6J animals for eight generations. The mice were then bred as homozygous transgenics in our laboratory. The WT C57BL/6J was used as control. The same length of gestation was observed for WT and SOD1^{G85R} mice. P0 was defined as the first 24 hours after birth. The experiments were performed on the isolated brainstem-spinal cord preparation of neonate mice between P4 and P9. Motoneurons were intracellularly recorded and stained through sharp micropipettes in *in vitro* brainstem-spinal cord preparations isolated from postnatal WT and SOD1^{G85R} mice.

Surgical procedures

Some of the experimental procedures were described previously (Amendola et al., 2004; Bories et al., 2007). Briefly, pups were anesthetized by hypothermia, decerebrated at a postcollicular level, eviscerated, and pinned to a Sylgard-coated Petri dish. Dorsal craniotomy and lami-

nectomy were performed, allowing for the spinal cord and brainstem to be removed, placed in a recording chamber, and superfused (10 ml/minute) with an artificial cerebrospinal (ACSF) fluid containing (in mM): NaCl, 130; KCl, 4; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; glucose, 30; oxygenated with a 95% O₂/5% CO₂ mixture and adjusted to pH 7.4. The temperature of the bath was kept at 24°C by a servo-controlled Peltier device (Harvard TC-202A). The preparation was allowed to equilibrate for a minimum of 1 hour before recordings started. Monopolar stainless-steel electrodes were placed in contact with the cut fifth lumbar (L5) ventral and dorsal roots and insulated with Vaseline for recording and stimulation.

Retrograde labeling of the motoneuron pools

To characterize the distribution of the motoneurons in the L5 segment, back-labeling was performed in four experiments (two WT and two SOD1 mice). Crystals of rhodamine dextran (Molecular Probes, Eugene, OR) were applied on the cut L5 ventral root, and the preparation was protected from light and kept in the recording chamber for several hours to allow retrograde transport. Then, the spinal cord was immersed in fixative (4% paraformaldehyde) overnight at 4°C, and the blocks were cut in the transverse plane at 75 μm thickness. Staining was visualized with an Olympus confocal microscope (excitation light for rhodamine: 543nm) and Fluoview 4.1 software.

Intracellular recordings and staining

To allow microelectrode penetration, the pia was carefully removed medially to L5 ventral root entry, using very fine forceps under binocular control. Micropipettes for intracellular recordings were made from 1.2-mm filament glass (Clark Instruments) using a pipette puller (model P-97; Sutter Instruments). Electrodes were filled with 2 M potassium acetate containing 2% Neurobiotin (Vector, Burlingame, CA), and their resistances ranged between 80 and 130 MΩ. The microelectrode was positioned to penetrate the L5 spinal segment with an angle of 30–45° and advanced in the tissue using a Narishige three-dimensional hydraulic microdrive. Motoneurons were impaled at a depth of 150–450 μm from the ventral cord surface corresponding to the caudal part of the fifth lumbar segment. Thus, motoneuronal pools of the intrinsic musculature of the foot were particularly targeted (McHanwell and Biscoe, 1981). Motoneurons were identified by their antidromic action potential evoked following the electrical stimulation of the cut ventral root L5 as described previously (Bories et al., 2007). The motoneurons were stained using positive current pulses (duration 150 msec, current intensity 1–4 nA, frequency 3.3 Hz) applied for 10–12 minutes.

Histological procedures

One to two hours after labeling of the motoneuron, the spinal cord was immersed in fixative (4% paraformaldehyde) overnight at 4°C, and the blocks were then rinsed with PBS (pH 7.4). Each block was placed on a sliding microtome (Microm HM 650V) and cut in the transverse plane at 75 μm thickness. Sections were mounted on slides and air dried overnight. Neurobiotin was visualized using a standard avidin-HRP-diaminobenzidine staining procedure. The labeled motoneurons were reconstructed

from serial sections (75 μm thick) first on a Zeiss microscope equipped with camera lucida attachment and then on a Nikon microscope equipped with a computer-interfaced motorized stage and z-axis optical encoder using Neurolucida software. The Nikon microscope was equipped with a $\times 20$ dry objective and a numerical zoom $\times 3$ (final magnification $\times 60$). Shrinkage in section thickness was estimated by measuring the distance between the dendritic tips observed at the top and the bottom of the histological section containing the cell body and the two adjacent sections. This value was divided by the original thickness of the section giving the shrinkage factor. In most of the cases, a factor of 0.3 (range 0.25–0.39) was observed, and corrections in the z axis were applied for each motoneuron on the basis of their individual factor. No correction was applied in the x-y axis that has been measured in living slices for comparison. A single motoneuron was described by 6,000–18,000 data points, which were stored in a database with fiducial marks (boundaries of transverse spinal cord sections and central canal). The motoneurons analyzed in this work have been added to our database of digitized neurons that have been fully reconstructed following intracellular staining with Neurobiotin. Digital images were obtained with an Olympus (FV500) confocal microscope with Fluoview 4.1 software and modified in Adobe Photoshop 5 to improve contrast and brightness.

Quantitative morphologic data

A series of morphologic parameters was used to characterize the morphometric and topologic features of the arborizations as computed by Neurolucida Explorer. Metric and topological parameters, such as the number of primary dendrites, the number of dendritic segments (between either two branch nodes or the last branch point and the end point), the total length of all dendritic segments, and the length and surface area of each dendrite, were considered for each motoneuron. For statistical analysis of small samples, nonparametric exact tests (permutation with general scores test) and the nonparametric Mann-Whitney U test were used (StatXact 7.0 software; Cytel Studio). Unless otherwise stated, the results are expressed as mean \pm SD.

Size-related parameters

Size-related parameters were as follows: P_{soma} = soma perimeter measured in the transverse plane (μm); A_{trans} = soma area measured in the transverse plane (μm^2); F_{max} = maximum feret of the soma (μm); F_{min} = minimum feret of the soma (μm); D_{soma} = soma diameter (in μm , calculated from A_{trans}); A_{soma} = soma surface ($\Pi \times D_{\text{soma}}^2$, in μm^2); D_{stem} = mean initial diameter of stem branches for each motoneuron (μm); A_{stem} = total cross-sectional area of stem dendrites in each motoneuron (μm^2); Σ_{Len} = total dendritic path length for each motoneuron (μm); Σ_{Surf} = total dendritic surface area for each motoneuron (μm^2); Path_{max} = longest dendritic path from soma to termination for each motoneuron (μm); and $\text{Path}_{\text{mean}}$ = mean dendritic path from soma to all terminations for each motoneuron (μm).

Topology-related parameters

Topology-related parameters were as follows: Trees = number of dendritic trees per motoneuron; Nodes = number of branching points per motoneuron; Trms = number

of terminal segments per motoneuron; Sgmt = total number of dendritic segments per motoneuron; $\text{BrOrd}_{\text{max}}$ = maximum branch order for each motoneuron; $\text{BrOrd}_{\text{mean}}$ = mean order of all segments for each motoneuron; and $\text{TrmOrd}_{\text{mean}}$ = mean order of all terminal segments for each motoneuron.

The abbreviation list gives definitions of all analyzed parameters resumed in Tables 1 and 2 and used in the text. Most of the definitions are intuitive, but measurements related to the somata require additional explanation. Motoneurons somata were measured from the area (A_{trans}) of the somatic outline image in transverse sections, with the soma diameter (D_{soma}) calculated from a circle of the same area ($A_{\text{trans}} = \Pi D_{\text{soma}}^2 / 4$). The surface of the corresponding sphere with an equivalent diameter was calculated to determine the soma surface ($A_{\text{soma}} = \Pi D_{\text{soma}}^2$). Feret Min (μm) and Feret Max (μm) are the smallest and the largest dimensions of the contour (soma) as if a caliper was used to measure across the contour (shape information, Neurolucida 7 v4 User's Guide, p 15–17; MicroBrightField, Inc., Colchester, VT).

RESULTS

In four experiments (two WT and two SOD1), the retrograde transport of rhodamine dextran applied to the cut L5 ventral root was used for labeling the motoneuronal pools (Fig. 1B). In each spinal cord, about 450 labeled motoneurons were found to be distributed into three pools, a dorsolateral, a ventrolateral, and a small ventromedial pool, in the transverse plane (Fig. 1B). In the caudal part of L5 segment, only the ventrolateral pool was observed. In all intracellular staining experiments, the ventrolateral pool was targeted using the same angle and depth of penetrations (see Materials and Methods; Fig. 1C) from the ventral cord surface corresponding to the caudal part of the fifth lumbar segment (Fig. 1D).

In total, 26 motoneurons antidromically identified were intracellularly stained with Neurobiotin. In eight cases, multiple labeling probably resulting from gap junctions was found at all ages (P4–P9), precluding their full 3D reconstruction (Fig. 2C). Among the 18 remaining motoneurons, four were obtained at P4–P7 and were excluded from this study. P8–P9 were selected to compare the morphology of the two groups, because input resistances of the motoneurons in WT and SOD1 mice were found to be significantly different at that stage (Bories et al., 2007). The actual data included eight WT and six SOD1 lumbar motoneurons, all of them located in the ventrolateral pool of the caudal part of the fifth segment (Fig. 1D). Figure 2 shows some examples of intracellularly stained WT and SOD1 motoneurons. The WT motoneuron (Fig. 2A) and the SOD1 motoneuron (Fig. 2B) are shown in the section (75 μm) containing the soma from which originates seven and six primary dendrites, respectively. In both cases, some dendrites extended up to the medial region close to the middle line (arrows), whereas others reached the boundaries of the ventral horn ventrally or entered the white matter laterally (see enlarged insets in Fig. 2A2,B2).

The 3D representation of arborizations in WT and SOD1

Each motoneuron was reconstructed from six to eleven transverse sections corresponding to a rostrocaudal exten-

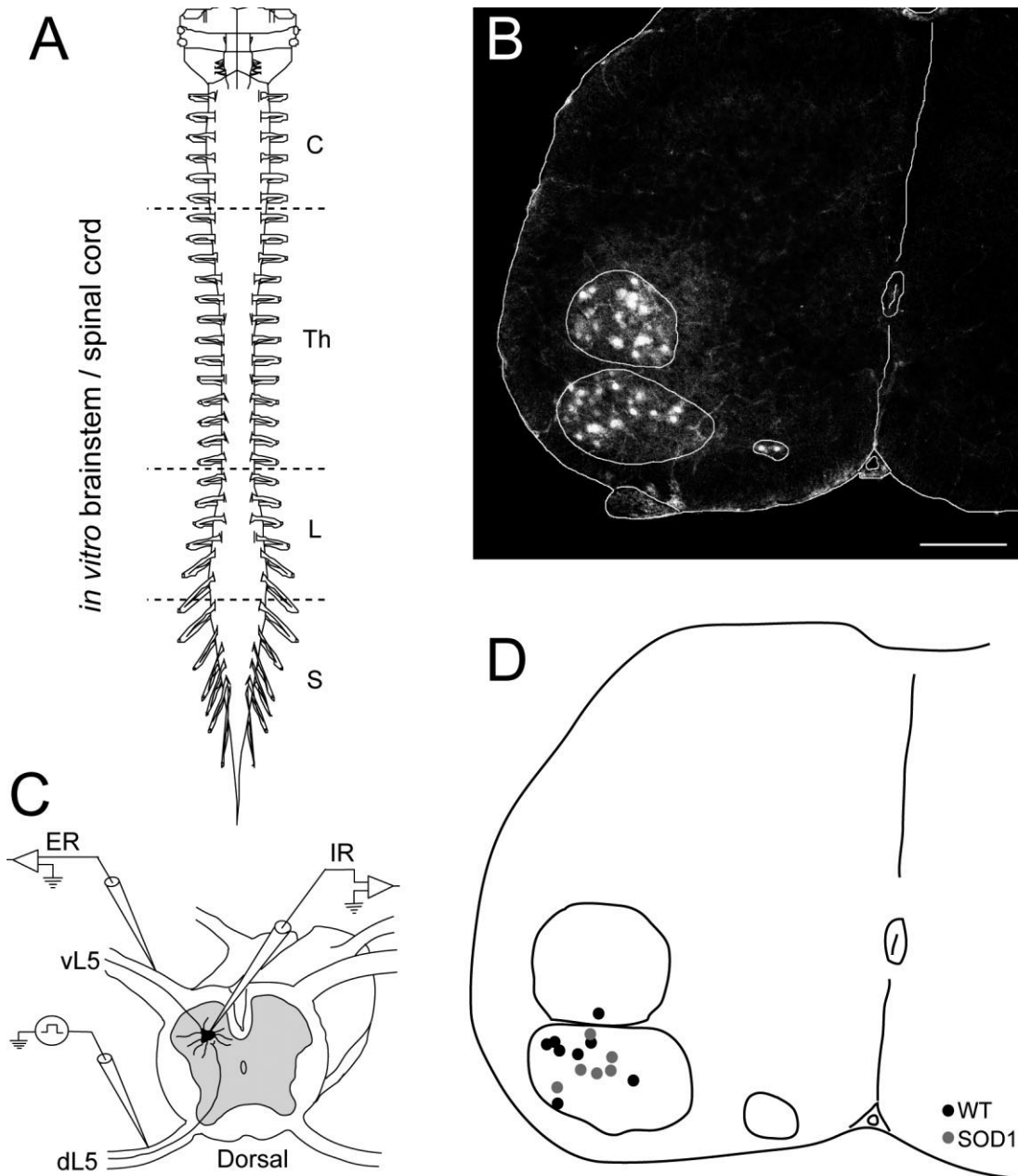


Fig. 1. Experimental setup and location of motoneurons. **A:** Schematic view of the entire *in vitro* brainstem/spinal cord preparation of the neonatal mouse used either for retrograde labeling of motoneurons from cut L5 ventral root or for intracellular injection of Neurobiotin into electrically identified motoneurons. **B:** Visualization of the three pools of motoneurons from L5 segment after back-labeling with rhodamine-dextran. Note that the ventromedial pool is much smaller than the two others. This image was obtained from an optical section ($\times 10$ objective; excitation light for rhodamine: 543 nm; confocal microscope Olympus FV500). **C:** Experimental setup for intracellular recording showing the *in vitro* brainstem/spinal cord preparation with the ventral side up. Micropipette was inserted into antidromically

identified motoneuron following electrical stimulation of L5 ventral root (vL5). Electrodes were placed in contact with the dorsal and ventral roots either to stimulate or to record the activities of motoneurons and sensory afferents. ER, extracellular recording; IR, intracellular recording; vL5, ventral root from L5 segment; dL5, dorsal root from L5 segment. **D:** Schematic view of transverse section showing the localization of the 14 cell bodies taken from the 3D reconstructions. The three pools of motoneurons were delimited using computations of several sections from the rhodamine staining and the 3D reconstructions. All reconstructed motoneurons (WT $n = 8$, SOD1 $n = 6$) have the same location, although one WT was recorded more dorsally at the border of the ventrolateral pool. Scale bar = 200 μm .

sion of 440–730 μm . The rostrocaudal extension was found to be similar between WT ($595 \pm 95 \mu\text{m}$) and SOD1 ($601 \pm 92 \mu\text{m}$) motoneurons ($P = 0.90$). The position and

dendritic extension of labeled motoneurons relative to the ventral horn in the transverse plane were thus precisely determined as illustrated by the six examples shown in

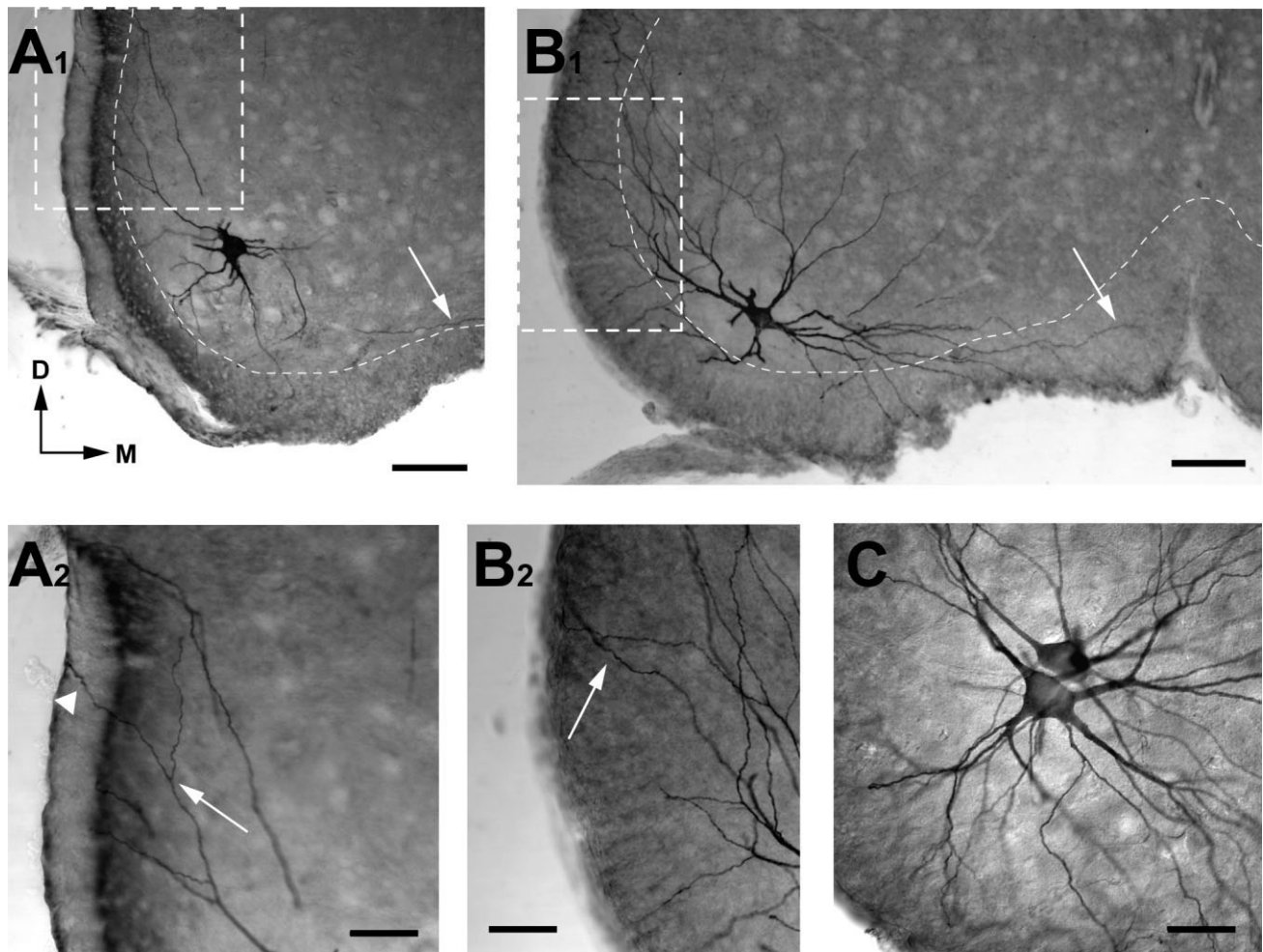


Fig. 2. Digital images of intracellularly labeled WT and SOD1 identified lumbar motoneurons. **A1,B1:** Images of two motoneurons from each strain (WT: A1 and SOD1: B1) illustrated at the same scale from the transverse section containing the soma (section of 75 μ m thick). These motoneurons have been chosen because they have the highest total dendritic length in each strain (Mn6 and Mn12 in tables). Note that some of the dendrites were cut proximally to the soma, and their dendritic trees are not visible in the transverse section. Arrows point dendrites projecting near the middle line. Dashed boxes show dendrites close to the lateral border of the sections and are

enlarged in A2,B2. The border between white and gray matters is approximately delimited by dashed lines. D, dorsal; M, medial. **A2,B2:** Higher magnification of parts delimited by dashed boxes in A1 and B1. Arrows point to dendrites running laterally close to the border of the section and entering the section. Arrowhead shows one dendrite crossing the section. **C:** Example of multiple staining following a single injection of neurobiotin giving rise to two intensely labeled motoneurons. WT, postnatal age (P9). Scale bars = 100 μ m in A1,B1; 50 μ m in A2,B2; 25 μ m in C.

Figure 3. All the labeled motoneurons were located within the same ventrolateral region. A first examination of the 3D representation of the motoneurons showed that the projection fields of the dendrites depended on the precise location of the cell bodies. The dendrites projected mainly in three directions (dorsal, dorsolateral, and medial) when the soma was in close proximity to the ventral horn boundary (see Fig. 3E,F), whereas dendrites extended also ventrally when the soma was located centrally within the pool (Fig. 3C,D). For comparison between WT and SOD1, the motoneurons with increasing number of segments are illustrated, and Figure 3A,B represents the motoneurons with the lowest number of branching points, Figure 3C,D those close to the median values, and Figure 3E,F the two motoneurons with the highest number of branching

points. These “selection criteria” for pairing were also applied for Figures 4 and 5.

Comparative dendritic geometry of WT and SOD1 motoneurons

Metric properties concerning the soma and the primary dendrites are given in Table 1. The soma size, number, and mean diameter of primary dendrites were comparable in WT and SOD1 motoneurons (see Table 1). Despite the similar size of the soma, the WT and SOD1 dendritic arborizations showed significant differences in terms of their morphometric parameters. The metric and topological parameters of all motoneurons are given in Table 2. The total number of dendritic branches (segments) was higher in the SOD1 group, with a mean of 293 compared

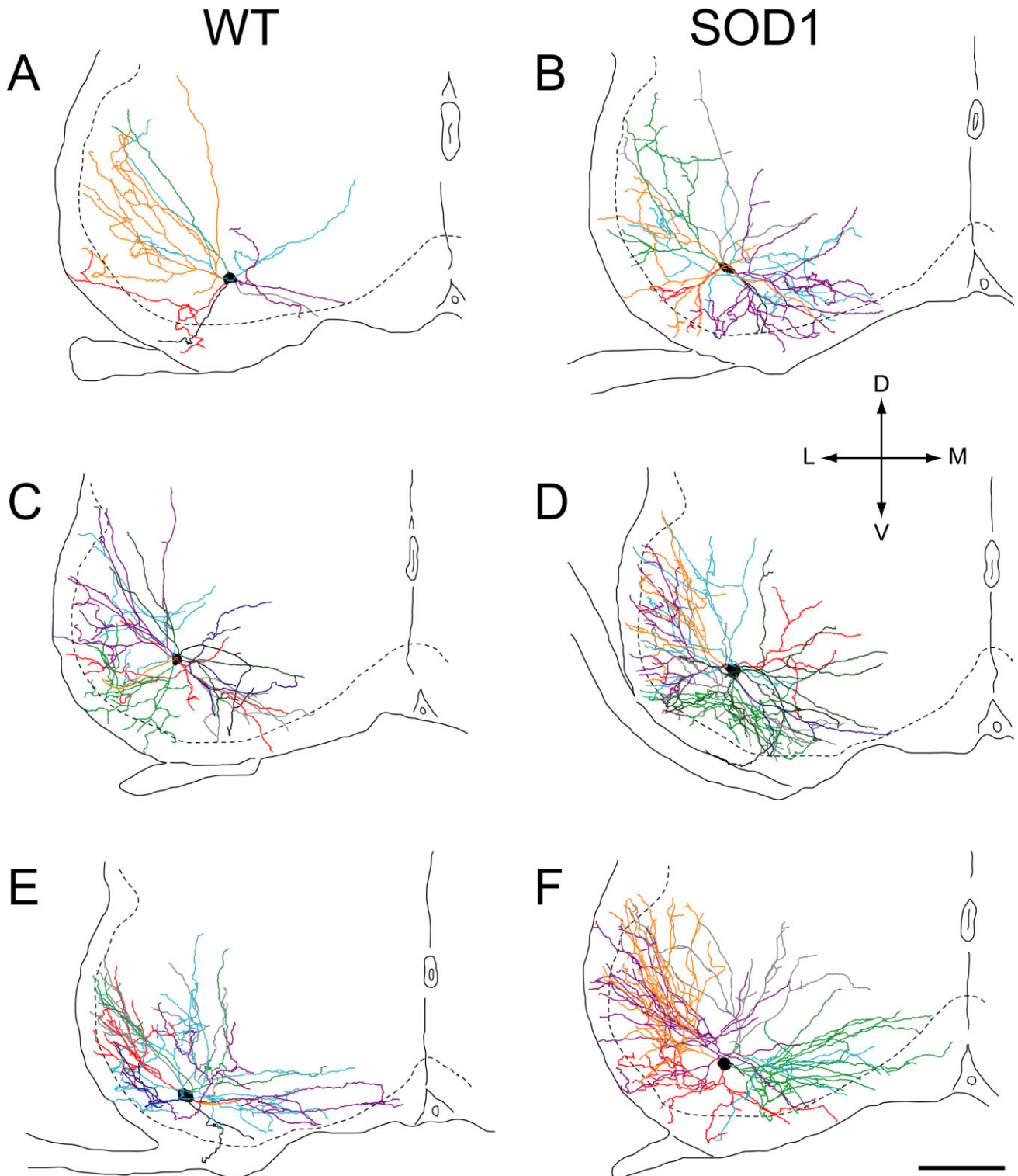


Fig. 3. Digitized full reconstructions showing the complete dendritic trees of three WT (**A,C,E**) and three SOD1 (**B,D,F**) motoneurons in transverse view. For comparison between WT and SOD1, the motoneurons with increasing number of branches are illustrated. A and B represent the motoneurons with the lowest number of branching points, C and D those close to the median values, and E and F the two motoneurons with the highest number of branching points. In all cases, SOD1 motoneurons have a higher number of branching points (see Table 2). The number of branching points is related to the tree

complexity, so the morphology of SOD1 motoneurons was found to be more complex. All the motoneurons were located in the ventrolateral part of the ventral horn. Each dendrite is represented by a specific color. Motoneurons are depicted at the same scale (200 μm) and are represented within the outline of the section containing the soma. The border between white and gray matters is delimited by the dashed line. D, dorsal; V, ventral; L, lateral; M, medial (A: Mn1; B: Mn9; C: Mn5; D: Mn11; E: Mn8; F: Mn14, in Tables). Scale bar = 200 μm .

TABLE 1. Cell Body and Stem Dendrite Parameters¹

Age	P _{soma} (μm)	A _{trans} (μm ²)	F _{max} (μm)	F _{min} (μm)	D _{soma} (μm)	A _{soma} (μm ²)	Trees	D _{stem} (μm)	A _{stem} (μm ²)
Mn1 (P9)	104.5	644	36.1	28.4	28.6	2,576	6	5.6	169.9
Mn2 (P9)	97.3	530	40.8	19.2	26	2,119	5	4.6	93.3
Mn3 (P9)	121.5	936	43.5	31.3	34.5	3,744	9	5.1	206.4
Mn4 (P8)	126.7	692	50.1	21.5	29.7	2,769	8	4.9	173.5
Mn5 (P8)	97.8	626	34.4	24.3	28.2	2,505	8	5.4	187.7
Mn6 (P9)	107.2	795	35.8	31.3	31.8	3,180	10	5.6	265.9
Mn7 (P9)	144.8	954	45.6	36.2	34.9	3,817	10	4.8	195
Mn8 (P8)	109.4	837	40.3	28	32.6	3,349	7	6.9	273.7
Mean WT	113.7	751.8	40.8	27.5	30.8	3,007	7.9	5.3	195.7
SD	16.3	153	5.413	5.6	3.17	613	1.8	0.7	57.1
Mn9 (P8)	109.1	540	42	17.5	26.2	2,160	6	5.2	137.2
Mn10 (P8)	107.7	737	39.1	26.9	30.6	2,949	8	5.4	191
Mn11 (P9)	141.6	920	45.6	29.2	34.2	3,679	8	5.8	223.5
Mn12 (P9)	194.9	1023	57.1	40.6	36.1	4,092	8	5.3	187.2
Mn13 (P8)	146.6	932	46.9	29.5	34.5	3,729	6	7	239.1
Mn14 (P8)	99.6	739	34.4	28.4	30.7	2,956	6	8.3	356.1
Mean SOD1	133.3	815.3	44.2	28.7	32.1	3,261	7	6.2	222.4
SD	35.8	176	7.779	7.4	3.6	705	1.1	1.2	74.4
P	0.19	0.47	0.36	0.74	0.49	0.47	0.39	0.15	0.47

¹Abbreviations: P_{soma} = soma perimeter measured in the transversal plane; A_{trans} = soma area measured in the transversal plane; F_{max} = maximum feret of the soma; F_{min} = minimum feret of the soma; D_{soma} = soma diameter; A_{soma} = soma surface; Trees = number of dendritic trees per motoneuron; D_{stem} = mean initial diameter of stem branches for each motoneuron; A_{stem} = total cross-sectional area of stem dendrites in each motoneuron.

TABLE 2. Topological and Metric Parameters of Dendritic Trees¹

Age	Nodes	Trms	TrmOrd _{mean}	Sgmt	BrOrd _{mean}	BrOrd _{max}	Σ _{Len} (μm)	Σ _{Surf} (μm ²)	Path _{max} (μm)	Path _{mean} (μm)
Mn1 (P9)	34	40	4.98	74	4.88	9	11,375	22,368	760	523
Mn2 (P9)	45	50	4.78	95	4.21	7	8,730	19,961	536	346
Mn3 (P9)	68	78	4.96	146	4.03	9	16,564	35,258	711	417
Mn4 (P8)	74	83	4.95	157	4.22	8	18,116	57,216	715	400
Mn5 (P8)	82	90	5.26	172	4.43	8	17,211	32,394	580	375
Mn6 (P9)	83	95	4.95	178	4.28	9	23,142	56,051	1,018	402
Mn7 (P9)	89	99	5.15	188	4.38	8	18,309	37,952	578	324
Mn8 (P8)	100	107	5.69	207	4.51	9	19,813	40,314	727	388
Mean WT	71.9	80.3	5.09	152.1	4.37	8.4	16,658	37,689	703	397
SD	22.3	23.7	0.28	46	0.26	0.7	4,597	13,672	152	60
Mn9 (P8)	93	100	5.71	193	5.37	9	18,134	34,917	661	387
Mn10 (P8)	134	145	6.17	279	5.88	11	25,649	58,427	731	379
Mn11 (P9)	134	145	5.88	279	6.5	9	25,419	58,221	706	365
Mn12 (P9)	154	172	6.72	326	5.57	17	37,031	68,175	1,016	464
Mn13 (P8)	156	165	6.45	321	4.91	10	25,942	55,931	591	357
Mn14 (P8)	178	184	7.38	362	5.07	13	32,737	81,495	724	409
Mean SOD1	141.5	151.8	6.39	293.3	5.55	11.5	27,485	59,528	738	394
SD	28.9	29.7	0.61	58.4	0.58	3.1	6,575	15,355	146	39
P	0.0006	0.0006	0.0003	0.0006	0.0003	0.0049	0.0023	0.0199	0.6683	0.91
Sign	***	***	***	***	***	**	**	*	ns	ns

¹Abbreviations: Nodes = number of branching points per motoneuron; Trms = number of terminal segments per motoneuron; TrmOrd_{mean} = mean order of all terminal segments for each motoneuron; Sgmt = total number of dendritic segments per motoneuron; BrOrd_{mean} = mean order of all segments for each motoneuron; BrOrd_{max} = maximum branch order for each motoneuron; Σ_{Len} = total dendritic path length for each motoneuron; Σ_{Surf} = total dendritic surface area for each motoneuron; Path_{max} = longest dendritic path from soma to termination for each motoneuron; Path_{mean} = mean dendritic path from soma to all terminations for each motoneuron.

with 152 for WT. The total dendritic length was also greater in the SOD1 group, extending from 18,134 to 37,031 μm from the soma, with a mean number of 27,485 μm compared with 16,658 μm in WT. The other parameters such as the number of branching points (nodes), the total number of tips (Trms), and the total dendritic surface area followed the same rule, being significantly larger in the SOD1 motoneurons. However, the distances from the soma to the dendritic tips and the longest dendritic path from soma to termination were similar (Path_{max} and Path_{mean} in Table 2), indicating comparable envelopes of the dendritic fields.

The dendrograms of the motoneurons illustrated in Figure 3 provided more information about the spatial relation among the dendrites in single arborizations (Fig. 4). The longest path distances of the dendrites reached 700 μm and were comparable in WT and SOD1 motoneurons (see Path_{max} in Table 2). In developing motoneurons, dendrites are still growing or retracting (pruning), which may explain why some of the dendrites exhibit no or a few

branches. In the WT motoneurons, nine dendrites of 63 had fewer than three nodes (see, for example, dendrites 2, 6, and 6 in Figure 4A,C,E, respectively). None of the SOD1 dendrites (0 of 42) possessed fewer than three branching nodes. At the opposite, the number of dendrites containing 18 nodes or more was about 50% (20 of 42 dendrites) of the total number in the SOD1 but less than 20% (12/63) in the WT.

An increase in complexity of the arborizations occurred in the SOD1 group because of an abnormal number of branching nodes at different distances from the soma, varying between individual motoneurons. The complexity function described by Korogod et al. (2000) was defined by the number of dendritic paths as a function of the path distance from the soma. This provides a good tool for comparing different dendritic arborizations. In Figure 5, the number of nodes was plotted against the radial distance from the soma for the motoneurons illustrated in Figures 3 and 4. In all cases, the number of nodes between 100 and 200 μm from the soma was much greater in SOD1

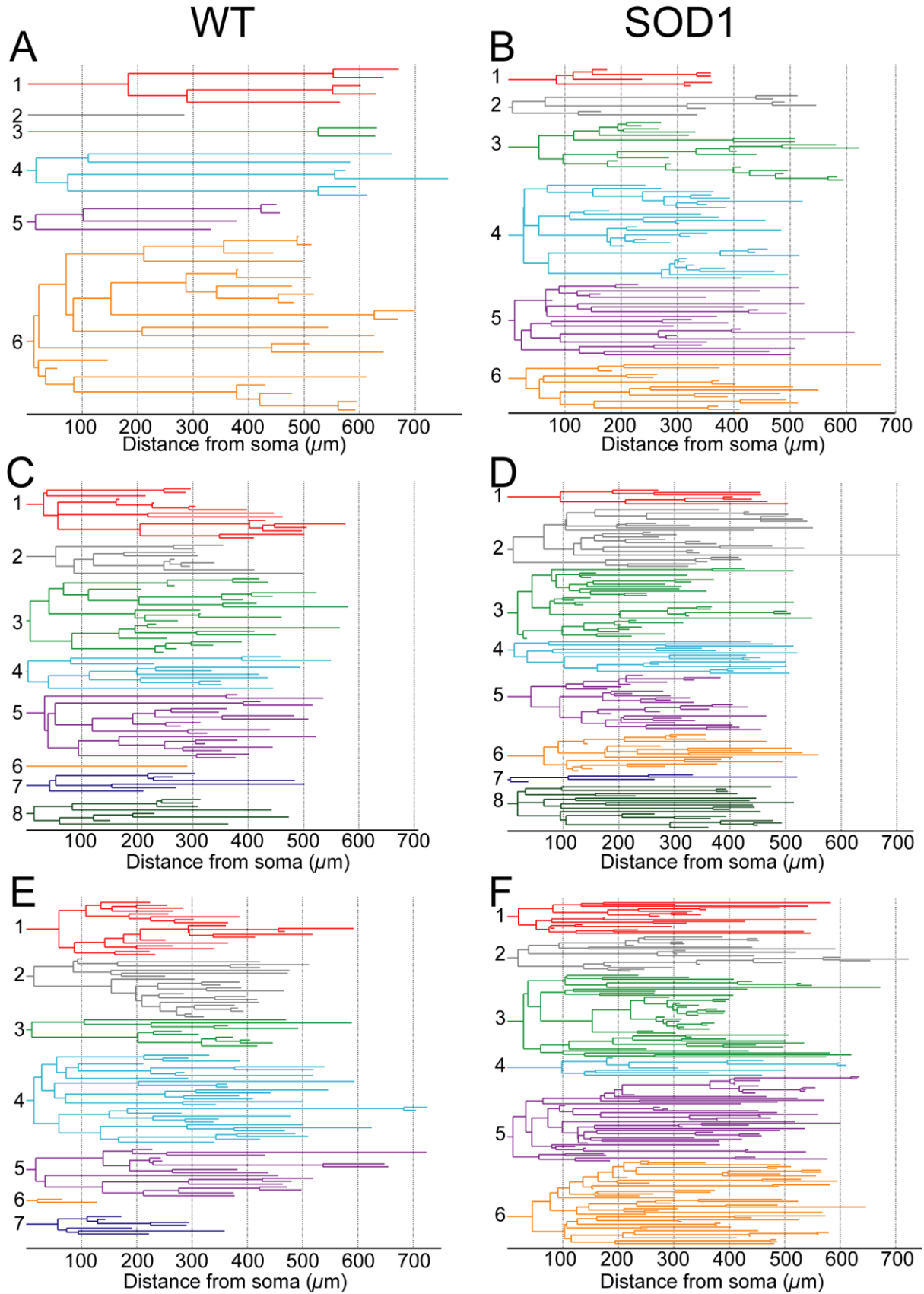


Fig. 4. **A–F:** Two-dimensional representations (dendrograms) obtained from the digitized reconstructions of the six motoneurons shown in Figure 3. In both cases (WT and SOD1), highly connected trees are more numerous in SOD1, although the dendritic paths from

soma to termination for each tree are quite comparable (above 500 μm for the majority of trees). Each dendrite was represented by a specific color and plotted as a function of the distance from the soma (in μm). Dendrograms are shown at the same scale.

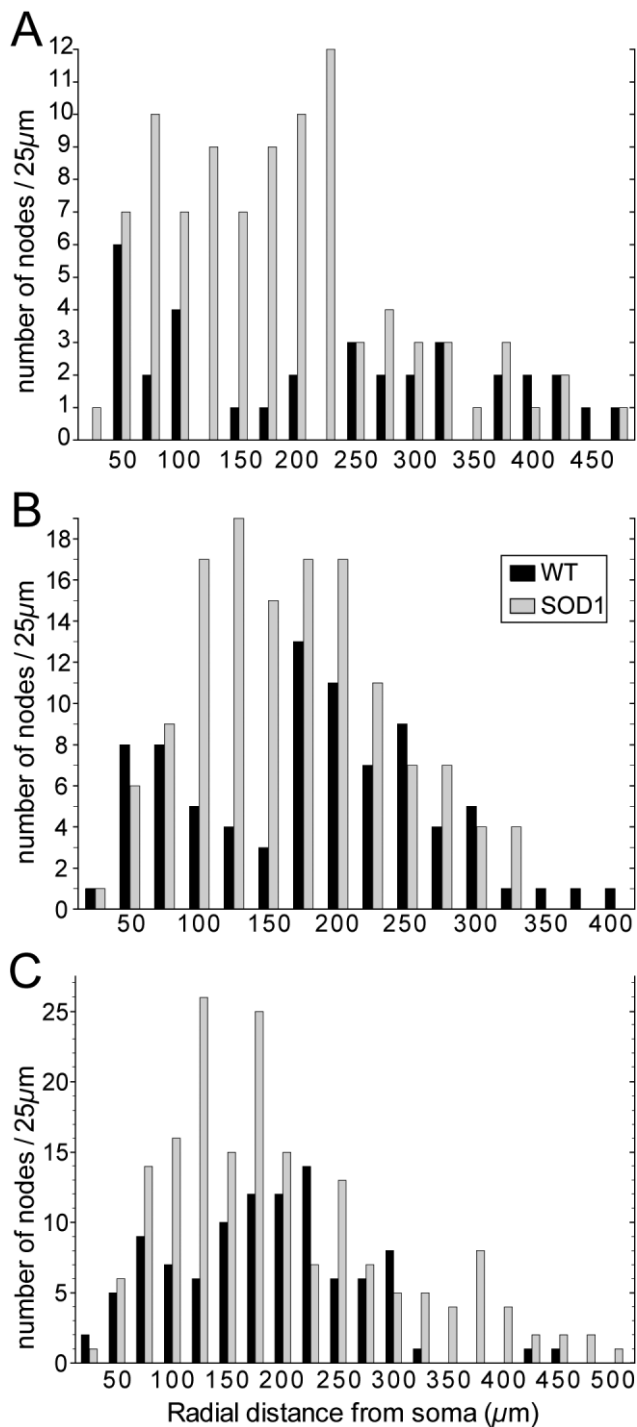


Fig. 5. Sholl graphs of the number of branching points obtained from the six motoneurons illustrated in Figures 3 and 4 with lower (A), median (B), and higher (C) numbers of nodes. Values from WT and SOD1 motoneurons are plotted on the same graph for direct comparison. These graphs represent the number of nodes in dendritic trees as a function of Euclidian distance from the soma. A radius of 25 µm was used to build each graph. In all cases, graphs show the higher occurrence of branching points in SOD1 motoneurons between 100 and 200 µm from the soma.

than in WT motoneurons. Beyond 300 µm from the soma, the number of branches decreased in both WT and SOD1 motoneurons.

Figure 6A illustrates the plots applied for the whole populations of WT (n = 8) and SOD1 (n = 6) motoneurons. In WT motoneurons, the maximum number of nodes in the dendrites was reached between 50 and 75 µm and remained maximal up to 175 µm. On the contrary, the dendrites of SOD1 motoneurons continued to increase their number of branches between 50 and 175 µm from the soma before decreasing as in the case of the WT dendrites. The higher occurrence of branching points observed in SOD1 motoneurons should result in an increase in the dendritic length. As expected, the dendritic length followed the same rule, with a peak at a distance of 200 µm from the soma in both cases (Fig. 6B).

The distribution histograms of the somatic surface area, the total dendritic length, the total dendritic surface area, and the total number of nodes are given for the two populations of motoneurons in Figure 7. These histograms clearly show the main differences in the metric and topologic dendritic parameters between WT and SOD1 motoneurons.

DISCUSSION

In the present study, we have compared the dendritic arborizations of WT mouse motoneurons with those of the SOD1^{G85R} model. The G85R (line 148) mice have been precisely characterized, and the mutant SOD1 protein levels are quite low, making the condition of these mice similar to the human disease (Bruijn et al., 1997, 1998; Williamson et al., 1998).

Our quantitative analysis of their geometrical features shows without ambiguity that the dendritic structure of the SOD1 motoneurons is profoundly affected by the neurodegenerative disease during the first postnatal days. Our main finding is a proliferation of dendritic branches starting at about 100 µm from the soma in the affected motoneurons.

Because our intracellular recordings in situ revealed a lower input resistance and a higher capacitance of SOD1 motoneurons in comparison with WT motoneurons (Bories et al., 2007), our hypothesis was that these parameters resulted mainly from a greater dendritic membrane area. It is known that the size and complexity of the dendritic arborizations depend on many intrinsic and extrinsic factors (Libersat and Duch, 2004). A number of molecules including neurotrophic factors, Rho-GTPases, and neuroglial regulates dendritic growth and branching (Brandt et al., 2007; Fu et al., 2007; Furrer et al., 2007; Grueber and Jan, 2004; Hayashi et al., 2007; Horch and Katz, 2002; Rosso et al., 2005; Yamamoto et al., 2006). We first discuss the possible causes of this abnormal dendritic growth in SOD1 mutants and the functional consequences on the electrical properties of motoneurons. We suggest a link between the early abnormalities and the toxic mechanisms leading to the disease.

Abnormal morphology of dendrites in SOD1 motoneurons

Our results clearly show that the total length and surface area of the dendritic arborizations were significantly higher in SOD1 motoneurons as a result of abnormal

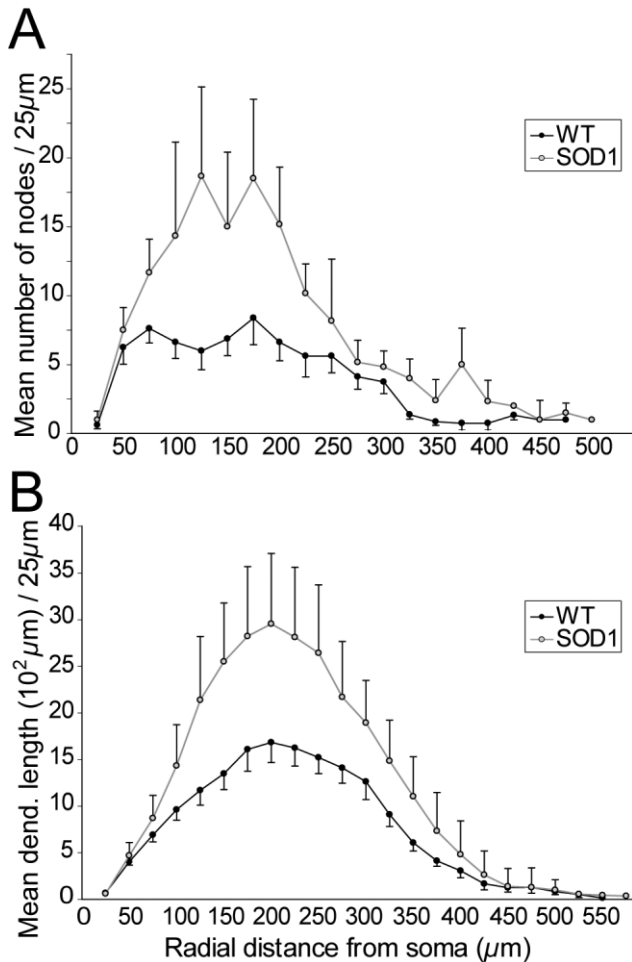


Fig. 6. Histograms of radial location of nodes (A) and dendritic length (B) for all WT ($n = 8$) and SOD1 ($n = 6$) motoneurons. The average number of nodes and dendritic length was plotted as a function of radial distance from the soma (radius 25 μ m) to compare their radial location between WT and SOD1 populations. In A and B, histograms reveal the higher occurrence of nodes and dendritic length at different distance from the soma. The largest difference was observed for distance between 100 and 200 μ m in A and about 200 μ m in B. Bars indicate SD.

branching. Although we cannot totally exclude that motoneurons may innervate different muscles, the morphological data strongly support the fact that WT and SOD1 motoneurons belong to the same population, insofar as the motoneurons were precisely targeted in the caudal part of the L5 segment (Fig. 1; see Materials and Methods; Bories et al., 2007). Furthermore, the soma diameter, the mean diameter of primary dendrites, the longest maximal dendritic path, and the sphere envelope of the dendritic arbors were similar in WT and SOD1 motoneurons. The dendritic arborizations of the WT and SOD1 motoneurons occupy comparable fields in the spinal cord. Thus it is unlikely that the different size of WT and SOD1 dendritic arborizations described in the present study corresponds to different types (slow vs. fast) of motoneurons.

The metric and topological parameters of WT motoneurons are in the range of those previously given for mouse

pups (Li et al., 2005). The mean number of branching nodes in SOD1 dendrites was almost twice that found in WT motoneurons. It is well known that rapid additions and retractions of branches occur during development (Jan and Jan, 2003). The presence of a few dendrites with no or poor branching suggests that such mechanisms also occur in lumbar motoneurons from P8–P9 mice. However, in SOD1 motoneurons, the poorest dendritic arborizations exhibit more than three nodes, confirming their propensity to overbranching. A defect in pruning mechanisms may explain the abnormal dendritic growth observed in SOD1 motoneurons.

An explanation for dendritic overbranching can be provided by data obtained in the SOD1^{G93A} transgenic mouse model of ALS showing early defects in the slow axonal transport (Kieran et al., 2005) and associated changes in microtubule dynamics (Fanara et al., 2007). A slowing of the axonal transport involving dynein has been shown in SOD1^{G93A} motoneurons at embryonic day E13 (Kieran et al., 2005). Defects in slow axonal transport were also described in the SOD1^{G85R} and SOD1^{G37R} models several months before the onset of the disease (Williamson and Cleveland, 1999). Impaired axonal transport has been reported in patients with sporadic ALS (Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; Julien, 2001). Cytoplasmic dynein seems to play a central role as a molecular motor for the retrograde transport of filaments and growth factors and for the anterograde movement of microtubules (He et al., 2005). Neurofilaments are important for dendrite development in large spinal motoneurons (Kong et al., 1998; Marszalek et al., 1996; Zhang et al., 2002). However, it is difficult to reconcile a change in neurofilament expression with a highly branched arborization, insofar as changes in the ratio between neurofilament subunits lead to a reduced dendritic arborization (Kong et al., 1998; Zhang et al., 2002).

The complexity of dendritic arborizations is regulated by neuronal activity and trophic factors that take a large place during development (Libersat and Duch, 2004). The amount of synaptic inputs that the neuron receives is related to the surface of reception of the dendritic arborization. A greater surface area could be linked to an increase of synaptic terminals contacting the motoneuron. An enlarged dendritic morphology may also be due to a lack of synapse stabilization and a defective pruning mechanism. Avossa et al. (2006) suggested a subtle synaptic dysfunction in SOD1^{G93A} cultured tissue resulting from a significantly increased ratio between excitatory and inhibitory synapses contacting SOD1 motoneurons. It was shown that a decrease in inhibitory transmission resulted in an increase of the number of branching points (Huang et al., 2007; Sanes and Hafidi, 1996; Sanes et al., 1992). Thus a misbalance between excitatory and inhibitory inputs might be involved in overbranching of the SOD1 motoneurons.

Possible involvement of AMPA receptors

Motor neuron dendritic growth is also regulated by NMDA and AMPA receptor activation (Kalb, 1994; Lee et al., 2005; Prithviraj et al., 2008). It is noteworthy that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induced local dendritic branching (Horch and Katz, 2002). In addition, Ca²⁺ transients evoked by BDNF induced translocation of the GluR1 AMPA receptor subunit to the postsynaptic membrane (Nakata and Nakamura, 2007). Our previous

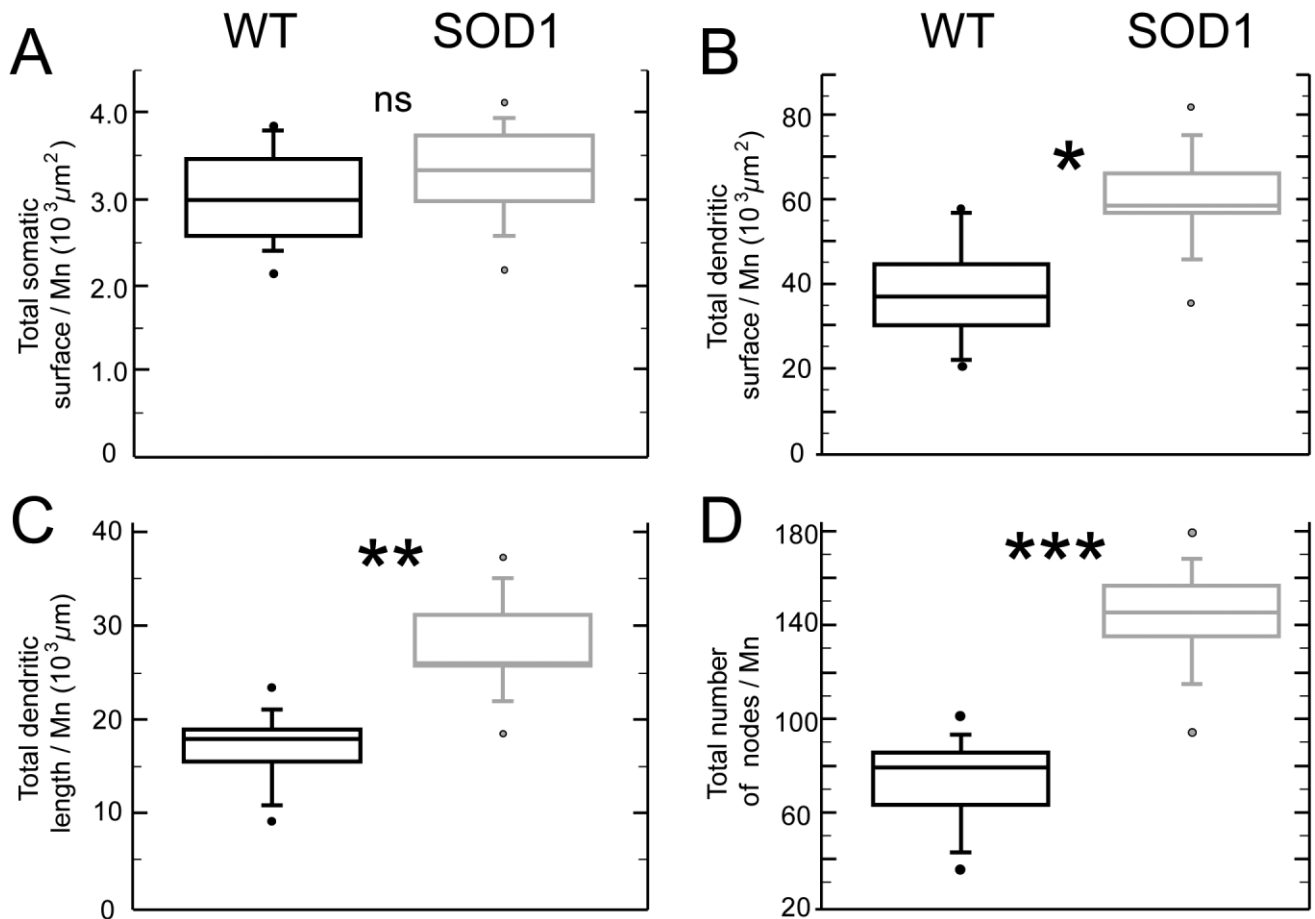


Fig. 7. Box and whiskers graphs comparing the statistical distributions of some parameters for the WT (n = 8) and SOD1 (n = 6) motoneurons. **A:** Somatic surface. **B:** Total dendritic surface. **C:** Total dendritic length. **D:** Total number of branching points per motoneuron. Each box is delimited by the first and the third quartiles and is

crossed by the median value. The ends of the bars are the first and ninth deciles. The circles and dots represent the lower and higher values. The differences in size concern the dendritic compartment but not the cell body. ns, Not significant (A), * $P = 0.0199$ (B), ** $P = 0.0023$ (C), *** $P = 0.0006$ (D).

results on dorsal root evoked excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in SOD1 motoneurons showed similar amplitude, although motoneurons have a lower input resistance, suggesting that the synaptic (AMPA) current produced by the primary afferents was increased by a greater number of synapses, by a change in AMPA receptor subunit composition, or by an increase in persistent inward current (Bories et al., 2007).

A recent study has shown an increase in synaptic GluR1 and a decrease in GluR2 subunit in spinal cord motoneurons from SOD1^{G93A} mice (Zhao et al., 2008). Overexpression of GluR1 has been shown to increase the complexity of dendritic arbor in part by augmenting the number of excitatory synapses within motor neuron dendrites (Prithviraj et al., 2008). These findings are in favor of change in trafficking of AMPA receptors during the presymptomatic period. The question has been raised of whether such mechanisms start earlier during the postnatal period. The decrease in GluR2 subunit in SOD1 motoneurons that would lead to an increase in calcium permeability of AMPA receptor-associated channels (Zhao et al., 2008) could then be compensated

by the increase in dendritic surface area described in the present study.

On the other hand, a hyperexcitability resulting from an increase in sodium PIC was found in cultured motoneurons from SOD1^{G93A} embryos or neonate mice (Kuo et al., 2005). Further experiments are needed to determine the precise mechanisms by which the synaptic current was increased in motoneurons in situ (Bories et al., 2007).

We found that postnatal SOD1 motoneurons were hypoexcitable with a higher rheobasic current (Bories et al., 2007). Simulations on cortical neurons have shown that additional proximal dendrites increased the current threshold for evoking the somatic action potential (Schaefer et al., 2003). The abnormal growth of the dendritic arborizations and the reduced excitability of postnatal SOD1 motoneurons could be a neuroprotective response and would represent an early compensatory mechanism against the activity-induced toxicity.

Early abnormalities in ALS

Although the disease is expressed in adulthood, early abnormalities have been described in embryonic and post-

natal SOD1 motoneurons (Bories et al., 2007; Durand et al., 2006; Kieran et al., 2005). It was shown that retrograde axonal transport defects were already present in motoneurons of SOD1^{G93A} mice at E13 (Kieran et al., 2005). A direct link between retrograde axonal transport and mutant SOD1 has been recently provided with the discovery that dynein interacts and colocalizes with the mutant SOD1 (Zhang et al., 2007). Furthermore, soluble misfolded SOD1 proteins could be detected at birth and were particularly enriched in the spinal cord of SOD1 mice (Zetterstrom et al., 2007), suggesting that the dynein function could be perturbed by mutant SOD1 very early. Indeed, the misfolded mutant proteins are able to catch a number of cytoplasmic molecules others than those expected initially (Rakhit et al., 2007; Shaw and Valentine, 2007). Abnormalities in neurofilament movements may start early, and neurofilaments increase the vulnerability of motor neurons to SOD1^{G85R} toxicity (Williamson et al., 1998). It is worth noting that a disruption of tubulin transport may precede the defects in the transport of neurofilaments and others cargoes, suggesting a slow accumulation of damage over a long period of time, up to the disconnection between the motor axon and the muscle fibers (Williamson and Cleveland, 1999). Neurofilament accumulations are a common pathological hallmark in ALS (Boillee et al., 2006; Julien, 2001). Thus several mechanisms may lead to perturbations in the cytoskeleton formation and vesicular trafficking very early in SOD1 mice. Further studies are needed to determine the initial abnormal steps in the animal models of ALS so that we are able to intervene earlier during the development of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Suzanne Tyc-Dumont and Ginette Bossavit for fruitful discussions and constant encouragements during this work. We also thank our colleagues Drs. Jean Patrick Guéritaudo and Christiane Rossi for their valuable comments on the manuscript. We thank Sylvie Liabeuf for her excellent technical assistance and Camille Allène for her participation in some of the experiments. We also thank Marie Gardette and Iboira Aboudou for taking care of the animals and breeding. We thank the Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED) for the use of their NeuroLucida system.

LITERATURE CITED

- Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, Durand J. 2004. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:2822–2826.
- Amendola J, Allene C, Liabeuf S, Durand J. 2006. Electrical and morphological properties of developing lumbar motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Abstr Am Neurosci Soc*, Atlanta.
- Amendola J, Guéritaudo JP, d'Incamps BL, Bories C, Liabeuf S, Allene C, Pambo-Pambo A, Durand J. 2007a. Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 145:311–323.
- Amendola J, Liabeuf S, Durand J. 2007b. Postnatal lumbar motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have abnormally complex dendritic trees: correlation with electrical properties. *Abstract Am Neurosci Soc*, San Diego.
- Avossa D, Grandolfo M, Mazzarol F, Zatta M, Ballerini L. 2006. Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience* 138:1179–1194.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39–59.
- Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B, Durand J. 2007. Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25:451–459.
- Brandt N, Franke K, Rasin MR, Baumgart J, Vogt J, Khrulev S, Hassel B, Pohl EE, Sestan N, Nitsch R, Schumacher S. 2007. The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. *EMBO J* 26:2371–2386.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, & Cleveland DW. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851–1854.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723–749.
- Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806–819.
- Durand J, Amendola J, Bories C, Lamotte d'Incamps B. 2006. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris* 99:211–220.
- Fanara P, Banerjee J, Hueck RV, Harper MR, Awada M, Turner H, Husted KH, Brandt R, Hellerstein MK. 2007. Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 282:23465–23472.
- Fu Z, Lee SH, Simonetta A, Hansen J, Sheng M, Pak DT. 2007. Differential roles of Rap1 and Rap2 small GTPases in neurite retraction and synapse elimination in hippocampal spiny neurons. *J Neurochem* 100:118–131.
- Furrer MP, Vasenkova I, Kamiyama D, Rosado Y, Chiba A. 2007. Slit and Robo control the development of dendrites in *Drosophila* CNS. *Development* 134:3795–3804.
- Grueber WB, Jan YN. 2004. Dendritic development: lessons from *Drosophila* and related branches. *Curr Opin Neurobiol* 14:74–82.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1775.
- Hayashi K, Ohshima T, Hashimoto M, Mikoshiba K. 2007. Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Dev Neurobiol* 67:655–669.
- He Y, Francis F, Myers KA, Yu W, Black MM, Baas PW. 2005. Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *J Cell Biol* 168:697–703.
- Horch HW, Katz LC. 2002. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5:1177–1184.
- Huang LC, Thorne PR, Housley GD, Montgomery JM. 2007. Spatiotemporal definition of neurite outgrowth, refinement and retraction in the developing mouse cochlea. *Development* 134:2925–2933.
- Jan YN, Jan LY. 2003. The control of dendrite development. *Neuron* 40:229–242.
- Julien JP. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581–591.
- Kalb RG. 1994. Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120:3063–3071.
- Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L. 2005. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol* 169:561–567.
- Kong J, Tung VW, Aghajanian J, Xu Z. 1998. Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J Cell Biol* 140:1167–1176.
- Korogod SM, Kulagina IB, Horscholle-Bossavit G, Gogan P, Tyc-Dumont S. 2000. Activity-dependent reconfiguration of the effective dendritic field of motoneurons. *J Comp Neurol* 422:18–34.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ. 2005. Increased persistent Na⁺ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843–854.
- Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS. 2005. NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J Neurosci* 25:2304–2311.

- Li Y, Brewer D, Burke RE, Ascoli GA. 2005. Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J Comp Neurol* 483:304–317.
- Libersat F, Duch C. 2004. Mechanisms of dendritic maturation. *Mol Neurobiol* 29:303–320.
- Marszalek JR, Williamson TL, Lee MK, Xu Z, Hoffman PN, Becher MW, Crawford TO, Cleveland DW. 1996. Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol* 135:711–724.
- McHanwell S, Biscoe TJ. 1981. The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293:477–508.
- Nakata H, Nakamura S. 2007. Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Lett* 581:2047–2054.
- Prithviraj R, Kelly KM, Espinoza-Lewis R, Hexom T, Clark AB, Inglis FM. 2008. Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol* 68:247–264.
- Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabarty A. 2007. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* 13:754–759.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067–1083.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.
- Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC. 2005. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci* 8:34–42.
- Sanes DH, Hafidi A. 1996. Glycinergic transmission regulates dendrite size in organotypic culture. *J Neurobiol* 31:503–511.
- Sanes DH, Markowitz S, Bernstein J, Wardlow J. 1992. The influence of inhibitory afferents on the development of postsynaptic dendritic arbors. *J Comp Neurol* 321:637–644.
- Schaefer AT, Larkum ME, Sakmann B, Roth A. 2003. Coincidence detection in pyramidal neurons is tuned by their dendritic branching pattern. *J Neurophysiol* 89:3143–3154.
- Shaw BF, Valentine JS. 2007. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 32:78–85.
- Williamson TL, Cleveland DW. 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2:50–56.
- Williamson TL, Bruijn LI, Zhu Q, Anderson KL, Anderson SD, Julien JP, Cleveland DW. 1998. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9631–9636.
- Yamamoto M, Ueda R, Takahashi K, Saigo K, Uemura T. 2006. Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron–glia interface. *Curr Biol* 16:1678–1683.
- Zetterstrom P, Stewart HG, Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Oliveberg M, Marklund SL. 2007. Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14157–14162.
- Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 139:1307–1315.
- Zhang F, Strom AL, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. 2007. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *J Biol Chem* 282:16691–16699.
- Zhang Z, Casey DM, Julien JP, Xu Z. 2002. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J Comp Neurol* 450:144–152.
- Zhao P, Ignacio S, Beattie EC, Abood ME. 2008. Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 27:572–579.

ANNEXE IV : *Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis*

Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis

Jacques Durand ^{a,*}, Julien Amendola ^a, Cyril Bories ^b, Boris Lamotte d'Incamps ^c

^a CNRS UMR 6196, Plasticité et Physiopathologie de la Motricité, Université de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

^b Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard 2601, Chemin de la canardière, F-6500 Québec, QC, Canada G1J 2G3

^c Laboratoire de Neurophysique et Physiologie du Système Moteur, UMR 8119 CNRS, Université René Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative and fatal human disorder characterized by progressive loss of motor neurons. Transgenic mouse models of ALS are very useful to study the initial mechanisms underlying this neurodegenerative disease. We will focus here on the earlier abnormalities observed in superoxide dismutase 1 (SOD1) mutant mice. Several hypotheses have been advanced to explain the selective loss of motor neurons such as apoptosis, neurofilament disorganisation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, astrogliosis and excitotoxicity. Although disease onset appears at adulthood, recent studies have detected abnormalities during embryonic and postnatal maturation in animal models of ALS. We reported that SOD1^{G85R} mutant mice exhibit specific delays in acquiring sensory-motor skills during the first week after birth. In addition, physiological measurements on *in vitro* spinal cord preparations reveal defects in evoking rhythmic activity with *N*-methyl-DL-aspartate and serotonin at lumbar, but not sacral roots. This is potentially significant, as functions involving sacral roots are spared at late stages of the disease. Moreover, electrical properties of SOD1 lumbar motoneurons are altered as early as the second postnatal week when mice begin to walk. Alterations concern the input resistance and the gain of SOD1 motoneurons which are lower than in control motoneurons. Whether or not the early changes in discharge firing are responsible for the uncoupling between motor axon terminals and muscles is still an open question. A link between these early electrical abnormalities and the late degeneration of motoneurons is proposed in this short review. Our data suggest that ALS, as other neurodegenerative diseases, could be a consequence of an abnormal development of neurons and network properties. We hypothesize that the SOD1 mutation could induce early changes during the period of maturation of motor systems and that compensatory mechanisms—linked to developmental spinal plasticity—might explain the late onset of the disease.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Development; SOD1^{G85R}; Spinal network; Electrical properties

1. Introduction

The identification of the initial mechanisms leading to the progressive loss of motoneurons in transgenic animal models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is crucial for future treatment of the disease in humans. Information about early abnormalities related to the disease would pro-

vide valuable insights about the disease mechanisms and about possible early detection and treatment in patients.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), initially described by Charcot (1865), is a fatal, adult-onset neurodegenerative disease characterized by a selective loss of motor neurons in the spinal cord, brainstem, and motor cortex (Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; Julien, 2001). The loss of motoneurons initiates a progressive paralysis which affects skeletal musculature with the exception of extraocular and pelvic muscles. The dominant clinical symptoms are muscle weakness, muscle atrophy and

* Corresponding author. Tel.: +33 4 9116 4650; fax: +33 4 9177 5084.
E-mail address: durand@dpm.cnrs-mrs.fr (J. Durand).

spasticity which appear in mid-life. ALS is generally fatal within 1–5 years of onset when respiratory motoneurons are affected. In 90% of cases, no apparent genetic link has been determined (sporadic cases) and in 10% of cases, the disease is inherited in a dominant manner (familial cases). Mutation of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) is one proven cause of familial ALS (Gurney et al., 1994; Rosen et al., 1993). Although more than 110 mutations are known, only a subset of familial ALS cases is related to dominant missense mutations in the SOD1 gene (Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; Julien, 2001 an updated list is available on the web <http://www.alsod.org>). However, sporadic form of the disease, although indistinguishable from the familial cases, are the results of multiple—yet unidentified—causes. Among the external causes of the disease, one can cite the geographical factor, as indicated by the high incidence of ALS in the Guam islands in the 50s (Garruto et al., 1985). Whether the external factor associated to ALS is the indirect consumption of the local Cycad seed (Cox and Sacks, 2002; Spencer et al., 1987) or not, it has been suggested that even a short stay in these islands increase the risk of developing ALS (Majoor-Krakauer et al., 2005). On the contrary, it has been reported that a supplementation of vitamin E intake (but not vitamin C) reduces the risk of ALS (Ascherio et al., 2005). Another external factor that was pointed out is the Gulf-war as the incidence of early onset ALS among veterans seemed elevated (Haley, 2003; Horner et al., 2003; Rose, 2003), but it then appeared that the military service in the US army—especially during war times—increases the risk of ALS (Coffman et al., 2005; Weisskopf et al., 2005). There are thus numerous external factors that remain to be identified in order to better understand the pathways of neurodegeneration leading to the fatal issue of this disease.

Several transgenic mice overexpressing the mutated human SOD1 gene develop phenotypic and pathological symptoms resembling ALS in humans (Brown et al., 2000; Cleveland and Rothstein, 2001; Gurney et al., 1994). Introduction of such mutated SOD1 genes into rat also provokes ALS-like symptoms characterized by selective death of spinal motoneurons and limb weakness (Howland et al., 2002). Three mutations (SOD1^{G85R}, SOD1^{G37R}, and SOD1^{G93A}) have been extensively characterized in transgenic mouse models of ALS (Bruijn and Cleveland, 1996; Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). Mice expressing high levels of SOD1^{G93A} or G37R mutants display vacuolar pathology (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995) whereas no vacuolization has been reported in G85R mice (Bruijn et al., 1998) or in similar mice expressing the murine counterpart mutation G86R (Ripps et al., 1995). The G85R (line 148) mice have been precisely characterized (Bruijn et al., 1997, 1998; Williamson and Cleveland, 1999) and the mutant SOD1 protein levels in these mice are quite low, equal to endogenous, making the condition of these mice similar to the human disease (Williamson et al., 1998). Homozygous G85R mice have their first pathological symptoms at 6 months (Bruijn et al., 1997) and a

paralysis onset at 8 months. Once the disease starts, the survival period is only 2–3 weeks (Bruijn et al., 1997, 1998). Heterozygous SOD1^{G85R} mice have a similar age of disease onset to SOD1^{G37R} mice (approximately 12 months of age). In these models, retardation of slow axonal transport is a very early event. Furthermore, this was the earliest known abnormality in heterozygous SOD1^{G85R} mice, arising months before any pathological changes can be detected (Williamson and Cleveland, 1999).

Several pathways involved in the pathogenesis of ALS, i.e. selective motoneuron degeneration, have been proposed on the basis of genetic, pathological and biochemical post-mortem human studies. Some of these pathways have been identified in SOD1 mice, particularly oxidative damage, accumulations of neurofilaments, aggregation/misfolding of mutant proteins, and glutamate excitotoxicity (Bruijn et al., 2004).

Glutamate induced excitotoxicity has been strongly implicated in the pathophysiology of ALS patients and mutant SOD1 transgenic mice (Bruijn et al., 2004; Rothstein et al., 1995; Van Damme et al., 2003). High levels of excitatory amino-acids have been measured in serum and cerebrospinal fluid of ALS patients (Plaitakis, 1991) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) antagonists prevent death of neurons exposed to cerebrospinal fluid from ALS patients (Couratier et al., 1993) and protect against SOD1 mutant toxicity (Roy et al., 1998). Pharmacological experiments have suggested that the excitotoxicity of spinal motoneurons could depend on Ca²⁺-permeable AMPA receptors (Bruijn et al., 2004). New evidences for the involvement of glutamate in ALS concern AMPA receptors (Kawahara et al., 2004; Tateno et al., 2004). Furthermore, riluzole (the ALS drug treatment) appears to be a non competitive inhibitor of AMPA receptors (Albo et al., 2004), in addition to its effects on sodium persistent inward current (Urbani and Belluzzi, 2000) and on glutamate release (Jehle et al., 2000). On the other hand, increased permeability of sodium via AMPA receptors containing GluR3-GluR4 flip subunits has also been reported in SOD1 motoneurons (Pieri et al., 2003b). Cultured motoneurons from mutant SOD1 mice were characterized by enhanced intrinsic excitability with a marked increased in the slope of the frequency–intensity (*F–I*) relationship (Kuo et al., 2004, 2005; Pieri et al., 2003a). Persistent sodium currents were proposed to be responsible for the hyperexcitability in the presymptomatic period.

Most of the studies have been performed either in culture or in the late adult presymptomatic period when multiple abnormalities are found and the initiating mechanism(s) underlying these processes have not yet been revealed (Bruijn et al., 2004). It is therefore of interest to detect the very early abnormalities in endogenous electrical properties and/or AMPA-mediated synaptic properties of mutant SOD1 motoneurons in situ. A number of recent reviews already deal with the mechanisms leading to the degeneration of motoneurons in ALS. Here, we only stress

the earliest abnormalities described in the different well-characterized mouse models and provide a brief description of our recent electrophysiological data obtained on the SOD1^{G85R} model.

2. Gain of toxic function in familial ALS: an unresolved hypothesis

In the transgenic mouse models of ALS, the mutant human protein is ubiquitously expressed at levels equal to or several fold higher than the level of endogenous SOD1. Changes in SOD1 activity do not correlate with severity of motor disease and a number of studies indicate that mutant SOD1 toxicity is not due to changes in dismutase activity (Cleveland and Rothstein, 2001). ALS-like disease is not observed in mice expressing human wild-type SOD1 (Deng et al., 1993; Kunst et al., 1997; Wong et al., 1995) or in SOD1-null mice (Reaume et al., 1996). Unlike mutants SOD1^{G37R} and SOD1^{G93A}, the SOD1^{G85R} enzyme is inactive and transgenic SOD1^{G85R} mice are characterized by unmodified endogenous SOD1 activity (Bruijn et al., 1997, 1998; Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). Furthermore, co-expression of the human wild-type with the human mutant G85R enzymes does not protect against the disease (Bruijn et al., 1998; Fukada et al., 2001). Removal of the normal SOD1 genes in mice that develop motor neuron disease from expressing a dismutase inactive mutant (SOD1^{G85R}) does not affect onset or survival (Bruijn et al., 1998). Thus, pathogenesis of ALS-linked mutations results from an unidentified toxic gain-of-function of mutant polypeptides, rather than a decrease or loss in SOD1 enzymatic activity (Cleveland and Rothstein, 2001; Julien, 2001). Some common pathological hallmarks observed in humans and mice concern inclusions in motor neurons and astrocytes, neurofilament accumulation and glutamate excitotoxicity. Further, mitochondrial pathology, fragmentation of the golgi apparatus and slow axonal transport alteration have been detected in spinal motoneurons before disease onset (Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; Julien, 2001).

2.1. Misfolding and aggregation of mutant proteins

Mutations in SOD1 result in the formation of mutant SOD1 protein aggregates (Bruijn et al., 1998). The hypothesis maintains that mutant SOD1 proteins are misfolded, and consequently oligomerized and aggregated, gaining toxic properties at some stage in their formation (Cleveland and Liu, 2000; Johnston et al., 2000; Valentine and Hart, 2003). On the other hand, inclusion body formation might protect neurons by decreasing the levels of toxic diffuse forms of mutant protein as suggested in Huntington's disease (Arrasate et al., 2004; Bruijn et al., 2004). In all SOD1 models, the aggregate formation was visible at adult age. A possible link between excessive Ca⁺⁺-influx and misfolding of SOD1 mutant has been proposed (Tateno et al., 2004).

2.2. Axonal transport

Neurofilament accumulations are a common pathological hallmark in both sporadic and familial ALS (Bruijn et al., 2004; Van Damme et al., 2003). Improper assembly of neurofilaments has particular impact on motoneurons because of their exceptionally long axons. Slowing of axonal transport occurred before any pathological changes were evident in the G85R heterozygous model (Williamson and Cleveland, 1999). Although accumulation of abnormal neurofilaments leading to slowing of anterograde axonal transport has been shown to be an early event in SOD1^{G85R} mice (Williamson and Cleveland, 1999; Zhang et al., 1997), it occurs at 6 months of age, before disease onset (Williamson et al., 1998).

2.3. Astrocytes implications in ALS

Alterations of motor neurons from SOD1 mutants require mutant damage not just within the motor neurons circuits but also to non-neuronal cells (Clement et al., 2003; Lino et al., 2002). Restricted expression of SOD1 mutants into motoneurons (Lino et al., 2002) or astrocytes (Gong et al., 2000) was not sufficient to develop motoneuron disease. The death of the motor neurons depends, at least in part, on a contribution from surrounding glia and possibly other cell types (Clement et al., 2003) via nitric oxide pathways (Ferri et al., 2004; Raoul et al., 2002). The hypothesis is based on the numerous observations that SOD1-containing inclusions of high-molecular-weight-shifted protein complexes are specifically found in spinal motoneurons and their surrounding astrocytes from autopsied patients and transgenic mice carrying mutant SOD1 genes (Bruijn et al., 1998; Shibata et al., 1996; Watanabe et al., 2001), in spinal cord extracts from mutant SOD1 transgenic mice (Johnston et al., 2000; Puttapparthi et al., 2003; Wang et al., 2002, 2003) and in cultured motoneurons into which mutant SOD1 has been microinjected (Durham et al., 1997). Pathological examination of transgenic mice expressing a SOD1^{G85R} demonstrates abnormal protein inclusions in astrocytes at early clinically presymptomatic time points when motoneuron pathology is not readily apparent (Bruijn et al., 1997). The homozygous G85R mice (line 148) develop cytoplasmic inclusions that appear in astrocytes and neurons at 6 months, before clinical signs of disease, and dramatically increase in abundance with disease progression (Bruijn et al., 1997).

Mutant SOD1^{G85R} mice were also shown to be deficient in the spinal cord astroglial glutamate transporter EAAT2 (GLT-1), similar to observations in sporadic ALS (Bruijn et al., 1997; Canton et al., 1998), suggesting that astroglial dysfunction in ALS may contribute to motor neuron degeneration, although this appears to be a secondary event in the disease progression. In the SOD1^{G93A} transgenic rat model, a loss of GLT1 transporter was also reported in adults (Howland et al., 2002). Further, co-expressions of SOD1 mutants (A4V or I113T) with

GLT1 in xenopus oocytes led to selective inactivation of the glial glutamate transporter upon injection of H₂O₂ (Trotti et al., 1999). Several studies have focused on glutamate-induced excitotoxicity linked to abnormal glutamate accumulation in the extracellular space due to defective glutamate clearance by related transporters. Another recent argument to involve glutamate in ALS was brought by the fact that overexpression of the glial glutamate transporter GLT1 by certain antibiotics delayed the onset of ALS disease in SOD1^{G93A} mice (Rothstein et al., 2005). Thus, it seems that EAAT2 (GLT1) dysfunction in ALS may contribute to death of motoneurons.

2.4. Glutamate excitotoxicity

Calcium permeability through AMPA receptor-associated channels depends on the presence or absence of a GluR2 subunit from a post-transcriptionally edited RNA (Sommer et al., 1991). Reduced editing efficiency of GluR2 mRNA has been specifically reported in post-mortem studies of spinal motor neurons from human sporadic ALS patients (Kawahara et al., 2004). The fact that Ca²⁺ influx through atypical motoneuronal AMPA receptors promotes a misfolding of mutant SOD1 protein and eventually the death of these neurons is an important finding obtained by crossing SOD1 mice with mice which overexpress GluR2 into motoneurons (Tateno et al., 2004). An overexpression of GluR2 subunits composing AMPA receptors renders the AMPA channel impermeant to calcium. Crossbreeding of the SOD1^{G93A} transgenic mice with these GluR2 transgenic mice, which show reduced Ca²⁺ permeability of AMPA channels, delays disease onset and reduces mortality in double-transgenics (Tateno et al., 2004). On the contrary, crossbreeding of the SOD1^{G93A} transgenic mice with transgenic mice lacking GluR2, i.e. with increase in Ca²⁺ permeability of motoneuronal AMPA receptors, accelerates disease progression, aggravates severity of motor decline, and decreases survival (Kuner et al., 2005). Furthermore, post-mortem observations revealed that the normally reduced fraction of GluR2 among the AMPA receptors of motoneurons is not observed in ALS patients (Kawahara et al., 2003). This may be a compensation of the low efficiency of RNA-editing of GluR2 transcripts in ALS (Kawahara et al., 2004). These results strongly support the notion that Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity is closely linked to the vulnerability of spinal motoneurons in ALS.

Another pathway for calcium entry is through activation of voltage-dependant calcium channels upon depolarization and firing. A hyperexcitability of SOD1 motoneurons in culture was recently described involving the persistent sodium current (Kuo et al., 2004, 2005; Pieri et al., 2003a). It was also shown that the SOD1^{G93A} mutation favors the expression of GluR3 and GluR4 flip isoforms of AMPA receptors (Spalloni et al., 2004) and AMPA receptor channels in SOD1^{G93A} motoneurons have

a greater permeability to sodium, but not to calcium, than those in wild-type motoneurons (Pieri et al., 2003b).

3. Early abnormalities in SOD1 mice

In SOD1^{G93A} mice (high expressor line), the fragmentation of the golgi apparatus of motor neurons was observed as early as 31 days of age (Mourelatos et al., 1996) but the authors did not examine before this time point. This may have important implications for AMPA receptor trafficking and synaptic clustering (Cuadra et al., 2004).

In this model, a loss of functional motor units appeared at 47–50 days of age (Frey et al., 2000; Kennel et al., 1996). Then, degenerating axons are observed at around 80–100 days. The question could be addressed on why, in this mouse model, axon terminals disconnect from muscular fibres in the post-maturational period of the neuromuscular junction? A progressive degeneration of lumbar motoneurons in SOD1^{G93A} transgenic mice has been suggested to begin at birth (Lowry et al., 2001) but this was not confirmed by other studies (Wengenack et al., 2004). In SOD1^{G85R} model, degenerating axons have been seen late at 6.5 months of age (Bruijn et al., 1997). It would be of interest to determine precisely when the loss of neuromuscular junction begins in SOD1^{G85R} mice, although one could expect that neuromuscular synapses start to disconnect a short time before degenerating axons were observed, i.e. in around 5–6 months old mice. Finally, clinical symptoms appear in all models when a large proportion of motoneurons have already begun their journey on the degenerating pathway.

3.1. Early motor defects

The earliest functional deficits that have been reported to date for SOD1 transgenic mice concerns the motor impairments observed in post-natal SOD1^{G85R} mice (Amendola et al., 2004). Behavioral tests performed on pups showed a significant delay in righting and hind paw grasping responses during the first postnatal week, suggesting a transient motor deficit in mutant mice. On the contrary, maturation of sensorial properties related to vibrissae and labyrinthine functions seems to be in advance in SOD1 mice (Amendola et al., 2004). Consequences of these developmental alterations are not known. i.e., it could be questioned whether SOD1 pups are walking normally. An early subtle change in the walking gait of SOD1^{G93A} mice (8-weeks old) was recently detected in a treadmill assay and even gait abnormalities could be evident prior to 8 weeks, according to the authors (Wooley et al., 2005).

4. Early alteration of the electrophysiological properties of spinal motor circuitry

In a series of experiments in an in vitro brainstem/spinal cord preparation from postnatal SOD1 mice, we observed

that fictive locomotion could not be normally induced by pharmacological agents (Amendola et al., 2004).

4.1. Lumbar circuitry is affected in the neonate SOD1 mouse but not sacral circuitry

The activation of spinal networks in SOD1 and control mice was studied using a cocktail of *N*-methyl-DL-aspartate (NMDA) and serotonin (5-HT), superfused in a chamber containing both control and SOD1 brainstem/spinal cord preparations. This cocktail of neuro-active substances induced reversible alternate rhythmic activity in opposite (left/right) lumbar roots recorded from control mice but

not from SOD1^{G85R} mice (see Fig. 1). No activity or only transient bursting or tonic activities were obtained in lumbar roots recorded from SOD1^{G85R} preparation (Amendola et al., 2004). In contrast to lumbar segments, all recorded sacral roots exhibited similar rhythmic activities between control and SOD1^{G85R} mice during NMDA and 5-HT application and these rhythmic activities alternated between opposite roots. Thus, during application of NMDA and 5-HT, the lack of alternate rhythmic affected solely the lumbar segments from SOD1^{G85R} mice.

It seems unlikely that the lack of pharmacologically-induced rhythmic motor pattern in SOD1^{G85R} mice could be due to differences in the genetic background since the

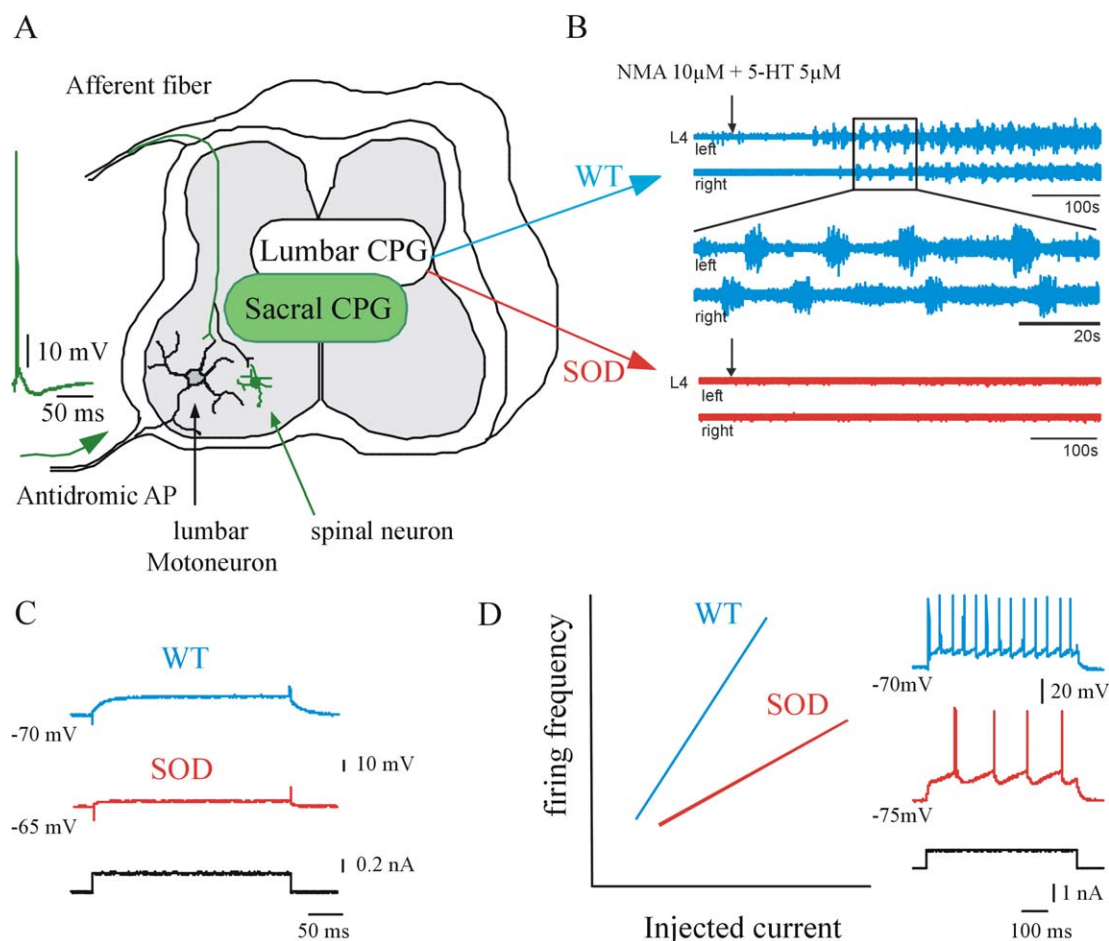


Fig. 1. Modifications of the electrophysiological properties of spinal circuitry in SOD1^{G85R} pups. (A) Schematic representation of the investigated spinal elements in an entire in vitro brainstem/spinal cord preparation and illustrated in a cross-section view. Lumbar motoneurons and lumbar central pattern generators (CPG) express early defects in the ALS animals whereas no differences were observed between the wild-type (WT) and the mutant animals (SOD1^{G85R}) for the activity of the sacral ventral roots evoked by bath application of NMDA and 5-HT (sacral CPG). The characteristics of the antidromic action potentials (AP) of lumbar motoneurons and the electrophysiological characteristics of spinal interneurons (input resistance and gain of the *F-I* curve) were similar in both strains. The monosynaptic response of lumbar motoneurons to electrical stimulation of afferent fibres was also similar between SOD1 and control pups whereas the polysynaptic responses involving spinal interneurons were prolonged. Not affected elements are represented in green. (B) The pharmacological activation of the lumbar CPG proved impossible in the mutant animals (increasing the concentrations of NMDA and 5-HT induced tonic activation), whereas alternated rhythmic activity could be induced by NMDA 10 μM and 5-HT 5 μM in the control animals (adapted from Amendola et al., 2004). (C) The mean input resistance of SOD1^{G85R} motoneurons is smaller than that of control animals as shown in these two responses of motoneurons to an identical depolarizing current pulse. The motoneuron of the wild type mouse is at the verge of firing, whereas the motoneuron of the mutant mouse is slightly depolarized. (D) The slope of the *F-I* relationship of the mutant's motoneurons ranged from 7.8 to 17.8 Hz/nA, whereas 50% of the control motoneurons' gain was greater than 17.8 Hz/nA. Therefore, the mutation reduces the slope of the *F-I* relation of motoneurons, but not that of spinal interneurons.

rhythmical motor pattern classically evoked in the in vitro brainstem/spinal cord isolated preparation using application of a combination of NMDA and 5-HT has been described in a number of species including different strains of mice (C3H: Cazalets et al., 2000, Balb C: Jiang et al., 1999, C57Bl6: Kullander et al., 2003, Swiss Webster: Whelan et al., 2000). Moreover the lack of rhythmicity doesn't concern the sacral segments in which motoneurons seem to be spared by the degeneration. This is a strong argument to link these early abnormalities to the disease and consequently to the mutation. In human with ALS, the functions of bladder and pelvic sphincters are often intact until the latest stage of the illness. A study on SOD1^{G93A} mouse showed that motoneurons of the bulbocavernosus nuclei (homologous to Onuf's nucleus) are spared by the degeneration (Hamson et al., 2002). Altogether, these results suggest that the early alteration in the ALS mutant are strongly affecting lumbar networks whereas sacral circuitry is preserved.

4.2. Maturation of descending pathways

A delay in the maturation of descending pathways controlling the spinal networks may explain the early motor deficits observed in mutant mice. This would have important consequences for the development of motoneurons. The clinical features of ALS usually include a combination of upper and lower motor neuron dysfunction. A progressive decline in the corticospinal and bulbospinal (including reticulo-, rubro- and vestibulo-spinal) projections has been described in SOD1^{G93A} transgenic mice prior to the onset of clinical signs (Zang and Cheema, 2002). There is also neurodegeneration in the substantia nigra where dopaminergic neurons are lost, at the end-stages of the disease (Kostic et al., 1997) and compensatory mechanisms occur in striatum (Azzouz et al., 1999). In SOD1^{G85R} mice, neuronal abnormalities are not limited to the spinal cord but also involve the brainstem (Bruijn et al., 1997, 1998).

5. Electrical properties of SOD1 motoneurons

Alterations in electrical properties of motoneurons may accompany degenerative processes before the onset of the disease. Recent studies revealed an hyperexcitability of mutant SOD1^{G93A} spinal motoneurons in culture and organotypic slice culture (Kuo et al., 2004; Pieri et al., 2003a). Mutant SOD1 cells were characterized by enhanced intrinsic excitability with a marked increase in the slope of the $F-I$ relationship (Kuo et al., 2004, 2005; Pieri et al., 2003a). It was concluded that this hyperexcitability involves Na^+ persistent current and may play a crucial role in the pathogenesis of ALS as the motoneurons were cultured for several weeks, and considered to be in a presymptomatic state.

In a recent work (Bories et al., submitted for publication), the electrical properties of SOD1 and control non transgenic lumbar motoneurons of 6–10 days old animals

have been investigated using the in vitro brain stem/spinal cord preparation. Although the characteristics of action potentials were similar in both strains, the slope of F/I curves was steeper in controls than in SOD1 motoneurons (see Fig. 1) and the mean input resistance of SOD1 lumbar motoneurons was significantly lower than that of control motoneurons, suggesting either morphological changes (larger lumbar SOD1 motoneurons) or differences in leak channel density.

These differences in input resistance and gain of motoneurons that have been observed between lumbar motoneurons of the two strains were not found between spinal interneurons recorded during the course of these experiments. These differences were therefore specific to motoneurons. Such electrical changes might be due to large dendritic extensions which have been described in abnormal conditions such as axotomy (Rose and Odlozinski, 1998).

6. Synaptic activation of SOD1 motoneurons

An alteration or dysfunction of AMPA receptors at the motoneuronal level might be detected by recordings the dorsal root-evoked excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) in motoneurons. EPSPs were studied in lumbar motoneurons following dorsal root stimulation (Bories et al., submitted for publication). No difference was observed for most EPSPs characteristics when low stimulus intensities were used. However, with higher stimulus intensity—probably activating polysynaptic pathways—the duration of dorsal root-evoked EPSPs was much longer in SOD1 mice. A prolonged synaptic potential was described in striatal neurons in presymptomatic period in Huntington's disease from transgenic mice (Klapstein et al., 2001; Laforet et al., 2001). Several hypotheses may account for the prolonged EPSP recorded in SOD1^{G85R} motoneurons. They may be due to disturbance in local circuits, “abnormal” AMPA receptor-associated channel activity (Kawahara et al., 2004; Pieri et al., 2003b), alterations in sodium or calcium persistent inward currents (Kuo et al., 2005) or to alterations of glutamate transporters (Cleveland and Rothstein, 2001). In this very early period (postnatal P6–P10), AMPA receptors seem not to be altered since monosynaptic EPSPs evoked by dorsal root stimulation were similar in control and SOD1 mice.

7. Conclusion

The earliest abnormalities observed in SOD1 mutant mice were detected in the G85R model during the maturation of motor systems. Behavioural tests showed delayed reflex responses in mutant SOD1^{G85R} mice during the first postnatal week (Amendola et al., 2004). Further investigations are needed to detect functional postural and motor deficits in the second postnatal week, when mice begin to weight-bear and walk, in order to evaluate the impact of early plasticity on the developing motor system of these

transgenic mice. The lumbar motor network seems to be affected in SOD1 mice very early since pharmacological agents known to induce fictive locomotion in normal mice are ineffective in the mutant between postnatal days P3–P6, the analyzed period (Amendola et al., 2004). We hypothesize a transient delay in the maturation of descending pathways. During normal development, the decrease of motoneuronal hyperexcitability correlates with the increases in excitatory supraspinal and segmental afferent inputs (Navarrette and Vrbova, 1993).

Alterations in electrical properties of SOD1 motoneurons when mice start to weight-bear and walk concern the input resistances and the slope of I/F relationship of the motoneurons. A lower resistance may indicate larger motoneurons. Usually, immature motoneurons are smaller and have higher input resistances. All indicate that maturation of motoneurons in SOD1 mice occurs but compensatory mechanisms may already be present locally due to spinal plasticity. The observation that polysynaptic activation present a longer duration could be signs of spinal plasticity. Interestingly, SOD1 activity has been linked to intense synapse formation (but not neural growth) during metamorphosis of the sphinx moth (Schachtner et al., 2004), suggesting a possible interaction between SOD1 activity and networks maturation. A reduced excitability of SOD1 motoneurons may reflect a protection of the motoneuron against the activity-induced toxicity during the critical period of their development (Hausmanowa-Petrusewicz and Vrbova, 2005).

At the time of development, motor axons are far from degeneration in G85R model since degenerating axons have been seen at 6.5 months of age, that is 1 month before disease onset (Bruijn et al., 1997, 1998; Williamson and Cleveland, 1999). In SOD1^{G93A} mice (with disease onset at 110–130 days), axons degenerate at around 80–100 days but neuromuscular junctions start to uncouple at around 50 days (Frey et al., 2000; Kennel et al., 1996). Sprouting at neuromuscular synaptic endings occurs in human ALS (Gordon et al., 2004; Schmied et al., 1999). It also occurs in SOD1 mice (Gurney et al., 1994) before disease onset and at relative late presymptomatic stages. This is again a compensatory mechanism to palliate for the earlier disconnection. The breaking of the tight neuromuscular junction is possibly a key to understanding the preferred motoneuron degeneration, as the muscle-nerve neurotrophic interactions are broken with the junctions. Furthermore, muscle cells of ALS patients overexpress several proteins, among which NOGO-A, an inhibitor of axonal growth (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2005). It was recently suggested that the timing of developmental changes in motoneurons and muscles is critical for their survival (Hausmanowa-Petrusewicz and Vrbova, 2005). Differences in action potential firing in motor axons may have consequences on the synapse tightening between nerve endings and muscles via the terminal Schwann cells, which are specialized glia that ensheat the synaptic junction (see Fields and Stevens-Graham, 2002).

In conclusion, our results show that SOD1^{G85R} motoneurons present very early altered electrophysiological properties which have to be decorticated and their origin to be determined. Whether or not these alterations are transient, they occur during the maturation of neuromuscular junctions and may have great importance for motor unit integrity. An early hypoexcitability in mutant motoneurons might be the counterpart of the hyperexcitability observed later in the remaining motoneurons. Indeed it is crucial to detect such very early changes in other mouse models such as the G93A where the disease appears earlier.

Many sources including repetitive motor neuron firing, increased sodium entry, AMPA receptors dysfunction and/or glutamate accumulation in the extracellular space may lead to abnormal intracellular calcium concentration. An early altered discharge firing may have implications on cytosolic free-Ca²⁺ homeostasis which is known to be an early event contributing to the pathogenesis of ALS. A number of abnormalities might be the consequences of abnormal calcium homeostasis, such as oxidative stress, reactive oxygen species production, glial glutamate transporter dysfunction, conformational changes in mutant SOD1, misfolding, aggregates formation and apoptosis with cascade of caspases leading to the death of motor neurons (Bruijn et al., 2004; Tateno et al., 2004). Signs of activation of a programmed cell death pathway were found *in vitro* (Raoul et al., 2002) and *in vivo* in a low expressor line of SOD1^{G93A} mice at 60 days of age (Wengenack et al., 2004). These very early alterations might provide a new key for the understanding of the pathogenesis of ALS. Identification of the earliest alterations in ion conductances, morphology and discharge properties of spinal motoneurons of SOD1 transgenic mice may lead to determine the origin of toxic properties responsible for the degeneration of motoneurons during the disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the Association pour la Recherche sur la Sclérose latérale amyotrophique et les maladies du motoneurone (ARS). We thank the late Professor Ingemar Engberg for valuable comments on this manuscript.

References

- Albo, F., Pieri, M., Zona, C., 2004. Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J. Neurosci. Res.* 78, 200–207.
- Amendola, J., Verrier, B., Roubertoux, P., Durand, J., 2004. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2822–2826.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., Finkbeiner, S., 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant Huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805–810.

- Ascherio, A., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E.J., Jacobs, E.J., McCullough, M.L., Calle, E.E., Cudkovic, M., Thun, M.J., 2005. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 57, 104–110.
- Azzouz, M., Krezel, W., Dolle, P., Vodouhe, C., Warter, J.M., Poindron, P., Borg, J., 1999. Compensatory mechanism of motor defect in SOD1 transgenic mice by overactivation of striatal cholinergic neurons. *Neuroreport* 10, 1013–1018.
- Bories, C., Amendola, J., Lamotte d'Incamps, B., Durand, J., submitted for publication. Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.
- Brown, W.F., Doherty, T.J., Chan, M., Andres, A., Provost, S.M., 2000. Human motor units in health and disease. *Muscle Nerve Suppl.* 9, 17–18.
- Brujin, L.I., Cleveland, D.W., 1996. Mechanisms of selective motor neuron death in ALS: insights from transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 373–387.
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327–338.
- Brujin, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., Cleveland, D.W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851–1854.
- Brujin, L.I., Miller, T.M., Cleveland, D.W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723–749.
- Canton, T., Pratt, J., Stutzmann, J.M., Imperato, A., Boireau, A., 1998. Glutamate uptake is decreased tardily in the spinal cord of FALS mice. *Neuroreport* 9, 775–778.
- Cazalets, J.R., Gardette, M., Hilaire, G., 2000. Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *J. Neurophysiol.* 83, 2468–2470.
- Charcot, J.M., 1865. Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière chez une femme hystérique, atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris [Second series]* 2, 24–35.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113–117.
- Cleveland, D.W., Liu, J., 2000. Oxidation versus aggregation—how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat. Med.* 6, 1320–1321.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–819.
- Coffman, C.J., Horner, R.D., Grambow, S.C., Lindquist, J., 2005. Estimating the occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War (1990–1991) veterans using capture–recapture methods. *Neuroepidemiology* 24, 141–150.
- Couratier, P., Hugon, J., Sindou, P., Vallat, J.M., Dumas, M., 1993. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341, 265–268.
- Cox, P.A., Sacks, O.W., 2002. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58, 956–959.
- Cuadra, A.E., Kuo, S.H., Kawasaki, Y., Bredt, D.S., Chetkovich, D.M., 2004. AMPA receptor synaptic targeting regulated by stargazin interactions with the Golgi-resident PDZ protein nPIST. *J. Neurosci.* 24, 7491–7502.
- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., et al., 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 10, 358–365.
- Durham, H.D., Roy, J., Dong, L., Figlewicz, D.A., 1997. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 523–530.
- Ferri, A., Nencini, M., Casciati, A., Cozzolino, M., Angelini, D.F., Longone, P., Spalloni, A., Rotilio, G., Carri, M.T., 2004. Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells. *Faseb. J.* 18, 1261–1263.
- Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002. New insights into neuron–glia communication. *Science* 298, 556–562.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., Caroni, P., 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J. Neurosci.* 20, 2534–2542.
- Fukada, K., Nagano, S., Satoh, M., Tohyama, C., Nakanishi, T., Shimizu, A., Yanagihara, T., Sakoda, S., 2001. Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur. J. Neurosci.* 14, 2032–2036.
- Garruto, R.M., Yanagihara, R., Gajdusek, D.C., 1985. Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* 35, 193–198.
- Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D., Elliott, J.L., 2000. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J. Neurosci.* 20, 660–665.
- Gordon, T., Hegeudus, J., Tam, S.L., 2004. Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol. Res.* 26, 174–185.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Haley, R.W., 2003. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 61, 750–756.
- Hamson, D.K., Hu, J.H., Krieger, C., Watson, N.V., 2002. Lumbar motoneuron fate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 13, 2291–2294.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I., Vrbova, G., 2005. Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis. *Neuroreport* 16, 657–661.
- Horner, R.D., Kamins, K.G., Feussner, J.R., Grambow, S.C., Hoff-Lindquist, J., 2003. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 61, 742–749.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1604–1609.
- Jehle, T., Bauer, J., Blauth, E., Hummel, A., Darstein, M., Freiman, T.M., Feuerstein, T.J., 2000. Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1227–1234.
- Jiang, Z., Carlin, K.P., Brownstone, R.M., 1999. An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Res.* 816, 493–499.
- Johnston, J.A., Dalton, M.J., Gurney, M.E., Kopito, R.R., 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12571–12576.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Pradat, P.F., Dupuis, L., Echaniz-Laguna, A., 2005. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann. Neurol.* 57, 553–556.
- Julien, J.P., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104, 581–591.
- Kawahara, Y., Kwak, S., Sun, H., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.Y., Kanazawa, I., 2003. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.* 85, 680–689.
- Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., Kwak, S., 2004. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427, 801.

- Kennel, P.F., Finiels, F., Revah, F., Mallet, J., 1996. Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *Neuroreport* 7, 1427–14231.
- Klapstein, G.J., Fisher, R.S., Zanjani, H., Cepeda, C., Jokel, E.S., Chesselet, M.F., Levine, M.S., 2001. Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurophysiol.* 86, 2667–2677.
- Kostic, V., Gurney, M.E., Deng, H.X., Siddique, T., Epstein, C.J., Przedborski, S., 1997. Midbrain dopaminergic neuronal degeneration in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 41, 497–504.
- Kullander, K., Butt, S.J., Lebet, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydstrom, A., Klein, R., Kiehn, O., 2003. Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* 299, 1889–1892.
- Kuner, R., Groom, A.J., Bresink, I., Kornau, H.C., Stefovskaja, V., 2005. Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5826–5831.
- Kunst, C.B., Mezey, E., Brownstein, M.J., Patterson, D., 1997. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat. Genet.* 15, 91–94.
- Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N., Fu, R., Bar, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J., Kroese, A.B., 2004. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.* 91, 571–575.
- Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R., Heckman, C.J., 2005. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol.* 563, 843–854.
- Laforet, G.A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F.M., 2001. Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 21, 9112–9123.
- Lino, M.M., Schneider, C., Caroni, P., 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.* 22, 4825–4832.
- Lowry, K.S., Murray, S.S., McLean, C.A., Talman, P., Mathers, S., Lopes, E.C., Cheema, S.S., 2001. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord.* 2, 127–134.
- Majoor-Krakauer, D., Mulder, P.G., Rowland, L.P., Ottman, R., 2005. A link between ALS and short residence on Guam. *Neurology* 64, 1819–1820.
- Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., Dal Canto, M.C., 1996. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5472–5477.
- Navarrette, R., Vrbova, G., 1993. Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: their role in the development of the motor unit. *Prog. Neurobiol.* 41, 93–124.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S., Zona, C., 2003a. Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 351, 153–156.
- Pieri, M., Gaetti, C., Spalloni, A., Cavalcanti, S., Mercuri, N., Bernardi, G., Longone, P., Zona, C., 2003b. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in spinal cord motor neurons are altered in transgenic mice overexpressing human Cu,Zn superoxide dismutase (Gly93 → Ala) mutation. *Neuroscience* 122, 47–58.
- Plaitakis, A., 1991. Altered glutamatergic mechanisms and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: possible role of glycine. *Adv. Neurol.* 56, 319–326.
- Puttapparthi, K., Wojcik, C., Rajendran, B., DeMartino, G.N., Elliott, J.L., 2003. Aggregate formation in the spinal cord of mutant SOD1 transgenic mice is reversible and mediated by proteasomes. *J. Neurochem.* 87, 851–860.
- Raoul, C., Estevez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., de Lapeyriere, O., Henderson, C.E., Haase, G., Pettmann, B., 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35, 1067–1083.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43–47.
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., Gordon, J.W., 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 689–693.
- Rose, M.R., 2003. Gulf War service is an uncertain trigger for ALS. *Neurology* 61, 730–731.
- Rose, P.K., Odlozinski, M., 1998. Expansion of the dendritic tree of motoneurons innervating neck muscles of the adult cat after permanent axotomy. *J. Comp. Neurol.* 390, 392–411.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W., 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73–84.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggeli, C., Huang, Y.H., 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73–77.
- Roy, J., Minotti, S., Dong, L., Figlewicz, D.A., Durham, H.D., 1998. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* 18, 9673–9684.
- Schachtner, J., Huetteroth, W., Nighorn, A., Honegger, H.W., 2004. Copper/zinc superoxide dismutase-like immunoreactivity in the metamorphosing brain of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 469, 141–152.
- Schmied, A., Pouget, J., Vedel, J.P., 1999. Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 110, 960–974.
- Shibata, N., Asayama, K., Hirano, A., Kobayashi, M., 1996. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev. Neurosci.* 18, 492–498.
- Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., Seeburg, P.H., 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11–19.
- Spalloni, A., Albo, F., Ferrari, F., Mercuri, N., Bernardi, G., Zona, C., Longone, P., 2004. Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93 → ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture. *Neurobiol. Dis.* 15, 340–350.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237, 517–522.
- Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.M., 2004. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2183–2196.
- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown Jr., R.H., Hediger, M.A., 1999. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci.* 2, 848.
- Urbani, A., Belluzzi, O., 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3567–3574.
- Valentine, J.S., Hart, P.J., 2003. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3617–3622.
- Van Damme, P., Leyssen, M., Callewaert, G., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., 2003. The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs

- survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 343, 81–84.
- Wang, J., Xu, G., Borchelt, D.R., 2002. High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol. Dis.* 9, 139–148.
- Wang, J., Slunt, H., Gonzales, V., Fromholt, D., Coonfield, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Borchelt, D.R., 2003. Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2753–2764.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., Rothstein, J.D., 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* 8, 933–941.
- Weisskopf, M.G., O'Reilly, E.J., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., Cudkowicz, M., Ascherio, A., 2005. Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology* 64, 32–37.
- Wengenack, T.M., Holasek, S.S., Montano, C.M., Gregor, D., Curran, G.L., Poduslo, J.F., 2004. Activation of programmed cell death markers in ventral horn motor neurons during early presymptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Brain Res.* 1027, 73–86.
- Whelan, P., Bonnot, A., O'Donovan, M.J., 2000. Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J. Neurophysiol.* 84, 2821–2833.
- Williamson, T.L., Cleveland, D.W., 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 50–56.
- Williamson, T.L., Bruijn, L.I., Zhu, Q., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Julien, J.P., Cleveland, D.W., 1998. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9631–9636.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., Price, D.L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105–1116.
- Wooley, C.M., Sher, R.B., Kale, A., Frankel, W.N., Cox, G.A., Seburn, K.L., 2005. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32, 43–50.
- Zang, D.W., Cheema, S.S., 2002. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 332, 99–102.
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1997. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J. Cell Biol.* 139, 1307–1315.

ANNEXE V : *Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis*

POSTNATAL ELECTRICAL AND MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES IN LUMBAR MOTONEURONS FROM TRANSGENIC MOUSE MODELS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

J. AMENDOLA, J.P. GUERITAUD, B. LAMOTTE D'INCAMPS¹, C. BORIES,
S. LIABEU, C. ALLENE, A. PAMBO-PAMBO, AND J. DURAND

*Laboratoire de Plasticité et Physio-Pathologie de la Motricité, UMR 6196 CNRS, Aix-Marseille Université,
31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France, 1 Laboratoire de Neurophysique et
Physiologie, UMR 8119, CNRS, Université René Descartes, Paris, France*

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a human neurodegenerative disease characterized by a selective loss of motor neurons in spinal cord, brainstem and motor cortex. Mutation of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) is one proven cause of familial ALS (25). Although more than 110 mutations in the SOD1 gene are known to be responsible for ALS, only a subset of familial ALS cases is related to dominant missense mutations of SOD1 gene. However, sporadic and familial forms of the disease are clinically indistinguishable suggesting that they may share common mechanisms (7, 9). The initial mechanisms underlying the progressive degeneration of motoneurons and the disconnection between motor axons and muscular fibres can be studied in transgenic mouse models of ALS (7, 9, 12). We have detected early abnormalities during the maturation of motor systems in the SOD1^{G85R} transgenic mouse model (1, 11). Further, we have recently shown that the mean input resistance of motoneurons from SOD1^{G85R} mice was lower than that of wild type animals whereas their membrane capacitance was increased, suggesting a larger size of SOD1^{G85R} motoneurons (3). In the present work, we tested this hypothesis using intracellular staining. On the other hand, the gain of lumbar motoneurons from SOD1^{G85R} mouse pups was found to be lower than that of WT pups (3). It has been well established that activation of persistent inwards currents influence the gain of motoneurons (13, 19). Furthermore, an intrinsic hyperexcitability of mutant spinal motoneurons has been described in culture and organotypic slice culture derived from embryonic or neonate SOD1^{G93A} mice (17, 18, 23). An increased persistent sodium inward current was involved in this hyperexcitability (18). Thus, we are studying the repetitive firing of the developing motoneurons and we report the effects of Riluzole, a blocker of persistent inward sodium current (26), on the discharge properties of motoneurons from SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} mice.

Corresponding Author: J. Durand same address Tel.: 33 4 9116 4650; fax 33 4 9177 5084
E mail: durand@dpm.cnrs-mrs.fr

METHODS

All surgical and experimental procedures were in conformity with the European Communities council directive (86/609/EEC). Some of the experimental procedures were described previously (1, 3). The SOD1^{G85R}, line 148 (6, 7, 27), SOD1^{G93A}-low expressor line (10), Hb9-eGFP (14) and double SOD1^{G93A}/Hb9-eGFP transgenic mice were generously provided by U382 INSERM-Marseille. The same length of gestation was observed for wild type and transgenic mice. Postnatal day 0 (P0) was defined as the first 24 hrs after birth.

Isolated brainstem spinal cord preparation of neonate mice

Briefly, pups at postnatal days (P3-P10) were anesthetized by hypothermia. They were then decerebrated at a post-collicular level, eviscerated and pinned down onto a Petri dish. Dorsal craniotomy and laminectomy were performed, allowing the spinal cord and brainstem to be removed, placed in a recording chamber, and perfused with an artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing in mM: NaCl, 130; KCl, 4; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 4; NaH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; glucose, 30; oxygenated with a 95% O₂-5% CO₂ mixture, adjusted to pH 7.4. The temperature of bath solution was kept at 24°C by a servo-controller (Harvard TC-202A).

Slice preparation

Following the isolation of the spinal cord in the dissecting artificial cerebrospinal fluid as described above, the lumbar enlargement was then isolated and placed in a block of agar (2%) and mounted in a vibrating microtome (Leica 1000 VT). Slices (350-400 µm thick) were cut and placed in a recovery ACSF for 30 min. Individual slices were then transferred to a recording chamber, continuously perfused with recording ACSF. Motoneurons were visualized using infrared differential interference contrast microscopy with an Olympus BX51 upright microscope and a Hamamatsu camera. In the case of double transgenic SOD1^{G93A}/Hb9-eGFP mice, motoneurons were identified with GFP epifluorescence.

Electrophysiology

In the entire isolated spinal cord preparation, micropipettes for intracellular recording were filled with potassium acetate 2M and their resistances ranged between 80 and 130 Mohms.

The motoneurons were identified by their antidromic action potential evoked following the electrical stimulation of the cut ventral root L5. The fifth lumbar root has been chosen because it concerns fewer pools (thus less heterogeneous populations) compared to L1-L4 lumbar roots in the mouse (21). Motoneurons were impaled using the same angle and depth of penetrations (150-450 µm) from the ventral cord surface corresponding to the caudal part of the fifth lumbar segment. Thus, motoneuronal pools of the intrinsic musculature of the foot were particularly targeted (21). However, the nature (extensor or flexor) of the innervated muscles could not be determined in our experiments. Intracellular potentials were amplified with an Axoclamp-2B in current clamp (Bridge or DCC modes) and digitized at 10 kHz by A/D converter. The discharge of motoneurons was studied using current ramp protocols (slope: 0.22 – 1.47 nA/s; duration: 5.4 – 10.8 s).

In slice preparation, whole cell patch-clamp recordings were made from GFP positive motoneurons or presumed motoneurons (large cells in the ventro-lateral region of spinal cord) or. Patch electrodes (resistance 5-6 MΩ) were pulled on a Sutter P97 puller (Sutter Instrument company, CA, USA). Signals recorded using whole cell patch-clamp techniques were amplified and filtered using an Axoclamp 2B (Axon Instruments, CA, USA). Amplified signals were acquired at 10 kHz using a digidata 1322A converter and pClamp softwares (Axon Instruments).

Morphology

Motoneurons intracellularly recorded in the entire brainstem/spinal cord preparation were stained using electrodes filled with 2M-K-acetate and 4% neurobiotin. One to two hours after labelling of the motoneuron, the spinal cord was immersed in fixative (4% paraformaldehyde) overnight at 4°C and the blocks were then rinsed with PBS (pH 7.4). Each block was placed on a

sliding microtome and cut in the transversal plane at 75 μm thickness. Sections were mounted on slides and air-dried overnight. Neurobiotin was visualized using a standard avidin-HRP-diaminobenzidine staining procedure. Labelled motoneurons were reconstructed from serial sections (75 μm thick) first on a microscope equipped with camera lucida attachment and then on a microscope equipped with a computer interfaced motorized stage and z-axis optical encoder using NeuroLucida software. The boundaries of transversal spinal cord sections were also traced as illustrated in Fig. 2.

For statistical analysis, non-parametric exact tests (permutation with general scores test) or the non parametric Mann-Whitney U test were used (StatXact 7.0 software). Unless otherwise stated, the results are expressed as mean \pm sd.

RESULTS

Morphology of mutant motoneurons

Intracellular labelling with neurobiotin were obtained from antidromically identified lumbar motoneurons (n=17) on *in vitro* neonatal entire brainstem/spinal cord preparation. Each motoneuron was characterized by its electrical and morphological properties (fig. 1A-1E₂). The large motoneurons were targeted since motoneurons with low input resistances (< 15 M Ω) were preferentially impaired in the transgenic animals (3) and that fast-fatigable motoneurons are first affected in both SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} mice (24).

The position and dendritic extension of labelled motoneurons relative to the ventral horn in the transversal plane was thus precisely determined as illustrated in figure 1E₂. The labelled motoneurons were located within the same ventro-lateral region and directions of the dendrites depend on the precise location of the cell bodies. The dendrites mainly projected in three directions (dorsal, dorso-lateral and median) when the soma was in close proximity to the ventral horn boundary (Fig. 2A and 2C) whereas dendrites also extend ventrally when the soma was located in a central location within the pool (Figs. 2B and 2D).

In the transversal plane, the dendritic arborizations extended up to the ventro-lateral borders of the cord; some dendritic terminations were found near the middle line and others in a distant dorsal region of the spinal cord. In the rostro-caudal plane, the labelled motoneurons were reconstructed from six to ten sections corresponding to a rostrocaudal extension of 450 to 750 μm .

The soma size, number and diameter of primary dendrites were comparable in WT (n=9) and SOD1^{G85R} (n=8) motoneurons. For the WT motoneurons, the soma diameter ($30.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$), soma area ($742 \pm 178 \mu\text{m}^2$), the estimated membrane surface area ($\text{P.D}^2=2967 \pm 711 \mu\text{m}^2$), the number of primary dendrites (7.33 ± 1.32) and their mean diameter ($4.99 \pm 1.17 \mu\text{m}$) were similar to those already published for developing lumbar motoneurons in mice (20). These values were not significantly different from those obtained from SOD1^{G85R} motoneurons: soma diameter ($28.84 \pm 6.51 \mu\text{m}$), soma area ($682 \pm 305 \mu\text{m}^2$), estimated membrane surface area ($\text{P.D}^2= 2729 \pm 1221 \mu\text{m}^2$), number of primary dendrites (7.13 ± 1.45) and mean diameter of stem dendrites ($5 \pm 1.1 \mu\text{m}$).

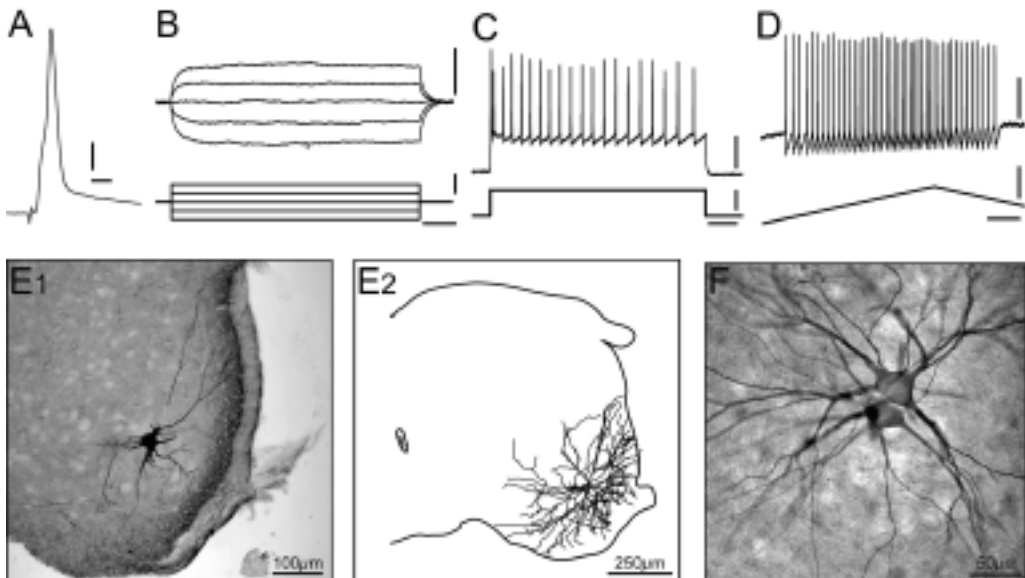


Fig. 1. - Electrical and morphological characterization of identified lumbar motoneurons recorded from postnatal mice.

A-E, all the data were obtained from the same motoneuron recorded from a P9 WT mouse.

A: Antidromic action potential (AP) elicited by the ventral root stimulation of the fifth lumbar segment (L5). Scale bars 1ms and 10mV. Resting membrane potential, $V_m = -65$ mV.

B: Voltage deflections (top traces) recorded in response to a 350 ms test-pulse (-0.4 to 0.4 nA). No sag was observed in this range of current intensity. Only five traces derived from current steps of 0.05nA are illustrated. For this motoneuron, R_{in} was of 10.7 M Ω . Scale bars 5mV, 0.4nA and 50ms.

C: Firing pattern obtained in response to long lasting (800ms) pulse of current (2.4 nA). The gain of this motoneuron was of 13.3 Hz.nA⁻¹ and the maximum firing frequency was 38.8 Hz. Scale bars 20mV, 2nA and 100ms.

D: Firing pattern elicited by triangular ramp stimulation. Note the firing rate adaptation on the descending phase indicating a clock-wise hysteresis (see fig. 4A). Scale bars 20mV, 1nA and 250ms.

E₁: Digital image from a transverse section of 75 μ m thick containing the soma filled with neurobiotin after electrophysiological recordings. Motor axon is not visible within this focal plane.

E₂: Transversal view of the digitized reconstruction of the same motoneuron showing the dendritic trees. Note the ventro-lateral location of the motoneuron also illustrated at a larger scale in fig. 2B.

F: Example of motoneurons coupled by gap junction and shown in a transverse section obtained from P8 SOD1^{G85R} mouse. In some cases, a single intracellular injection of neurobiotin gave rise to several stained motoneurons precluding the 3D reconstruction. For these cells only the soma and primary dendrite diameters were obtained. Obj: 20x. Numerical zoom: 2x.

The total number of fully reconstructed cells (n=9 out of 17) was limited due to multiple staining indicating the presence of gap junctions (see Fig. 1F). The maximum difference of input resistances between WT and SOD1^{G85R} motoneurons was found during P8-P9 period (3). We thus focused on the comparison of morphological properties during this period. At postnatal days 8-9 (P8-P9), full reconstructions using neuroLucida were made in four cases (2 WT and 2 SOD1^{G85R}, see Fig. 2). These motoneurons have a comparable number of primary dendrites (n=8 in the two SOD1^{G85R} motoneurons, n=7 and n=9 for the WT cases), similar mean diameters of primary dendrites and same dendritic projections according to the position of the

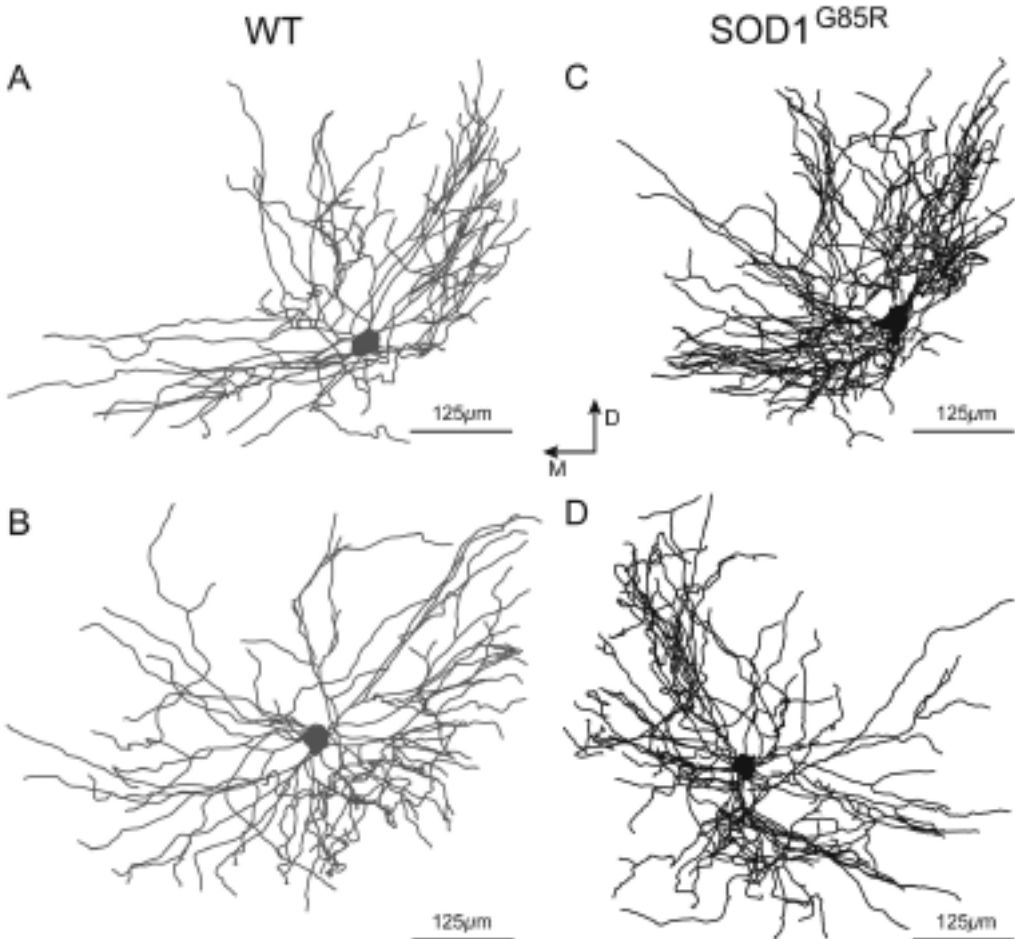


Fig. 2. - *Morphological differences between lumbar motoneurons from WT and SOD1^{G85R} mice.*

A, B, C and D are two-dimensional projections of 4 digitized and fully reconstructed motoneurons. All the motoneurons were localized in the lateral part of the ventral horn (see fig. 1F). Same scale bars for all motoneurons, 125 μm .

A, B: Motoneurons obtained from WT mice (P9 and P8, respectively for A and B). Total dendritic length: 16771 μm and 13762 μm . Total dendritic membrane surface: 39978 μm^2 and 32653 μm^2 . Numbers of branching points: 83 and 92. Numbers of terminals: 93 and 103 respectively for A and B.

C, D: Motoneurons obtained from SOD1^{G85R} mice (P8 and P9, respectively for C and D). Total dendritic length: 20682 μm and 25262 μm . Total dendritic membrane surface: 39593 μm^2 and 46589 μm^2 . Numbers of branching points: 147 and 154. Numbers of terminals: 162 and 172 respectively for C and D.

Note that for comparable morphology in term of dendrites directions and projections (A vs C, and B vs D), metric and topologic parameters were higher in SOD1^{G85R} motoneurons.

soma in the nucleus. The longest dendritic path from soma to termination was similar in SOD1^{G85R} ($653 \pm 52 \mu\text{m}$) and WT motoneurons ($649 \pm 116 \mu\text{m}$). However differences were found between WT and SOD1^{G85R} dendritic trees for most others metric and topologic parameters (Table 1).

Table 1. - Comparison of morphometric parameters in P8-9 motoneurons

	Total Dendritic Path length	Total Dendritic membrane Surface	Total branching points	Total terminations	Maximum branch order
WT	15267 ± 2128 μm	36316 ± 5180 μm ²	88 ± 6	98 ± 7	9 ± 1
SOD1^{G85R}	22972 ± 3239 μm	43091 ± 4947 μm ²	151 ± 5	167 ± 7	15 ± 4

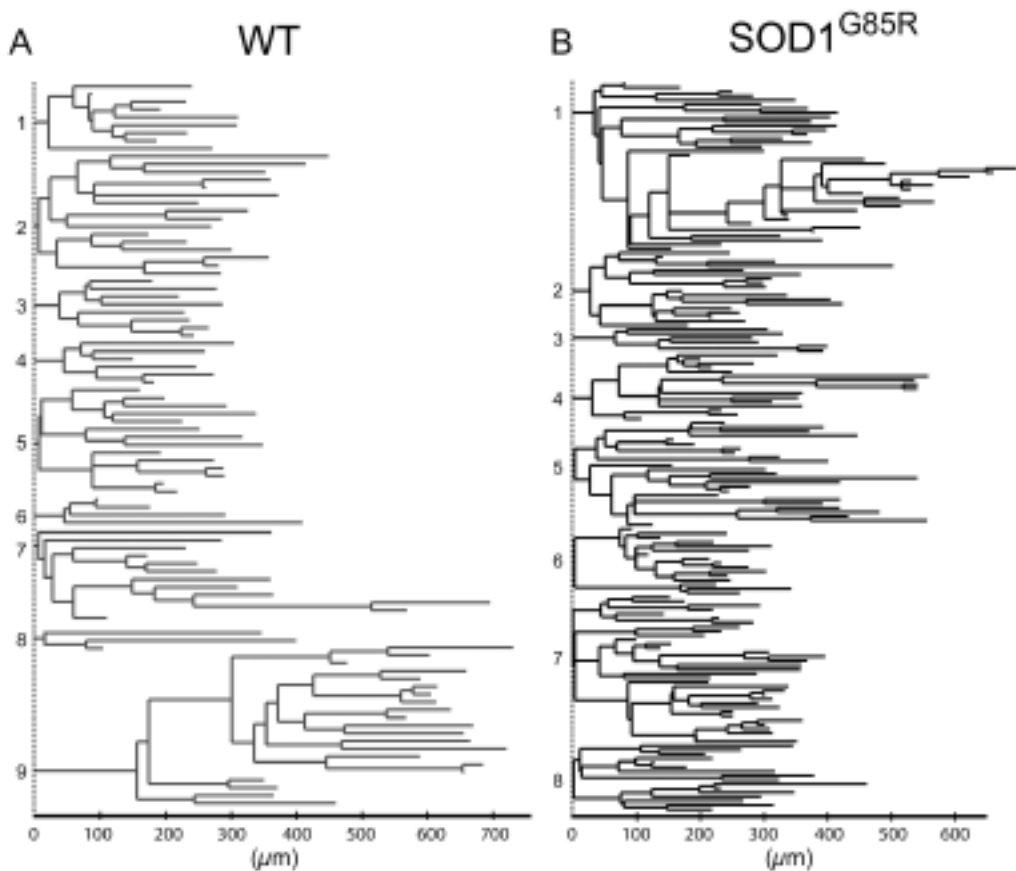


Fig. 3. - Dendrites from SOD1^{G85R} lumbar motoneurons were more develop and more complex compared to WT during the P8-P9 period.

These dendrograms (bidimensional schematic representation) reveals that the dendrites are more complex in SOD1^{G85R} motoneuron than in WT. Each dendrite was plotted as a function of the distance from the soma (in μm).

A, B: Dendrograms of the motoneurons shown in figure 2A and 2C. Note that for the WT motoneuron the mean length of dendritic trees was lower compared to SOD1^{G85R} motoneurons as well as the number of branching nodes and terminals. Note that the number of primary dendrites was comparable (n=9 and n=8) as well as the maximal extension of the longest dendrites.

A highly complex morphology of dendrites was found in SOD1^{G85R} compared to the WT motoneurons as shown in Figs. 2 and 3. Dendrograms in Fig. 3 A, B illustrate examples to emphasize the differences in the complexities of dendritic trees between WT and SOD1^{G85R} motoneurons. Thus, the morphology of motoneurons from SOD1^{G85R} mice displays important modifications at the postnatal period when we have found differences in input resistances (3).

Electrical properties of postnatal motoneurons during ramp current injection

Another difference in electrical properties concerned the lower gain of SOD1^{G85R} motoneurons (3). In this set of experiments, we compared the electrical properties of WT and SOD1^{G85R} motoneurons during ramp current injection.

Four different patterns of discharge were recorded in response to current ramp stimulation both for WT (n=19) and SOD1^{G85R} (n=19) motoneurons. Since developmental changes are likely to occur during the time period we investigated (P3-P10), recordings were obtained from WT and SOD1^{G85R} mice from similar numbers of motoneurons at the different ages, P3-P6: n=12 (WT) and n=10 (SOD1); P7-P10: n=7 (WT) and n=9 (SOD1). Figure 4 illustrates the different types of discharge that were recorded (left), with their corresponding F-I curves plotted for the depolarizing (filled triangles; up) and repolarizing (empty triangles, down) phases of the ramp. A clockwise hysteresis as shown by F-I curve (Fig. 4A) was observed in 8 WT and 5 SOD1^{G85R} motoneurons whereas a counter-clockwise (Fig. 4D) was seen in 5 WT and 4 SOD1^{G85R} motoneurons. Concerning the linear patterns of discharge (Fig. 4 B and C), they were obtained from 6 WT (3 with sustained firing) and 10 SOD1^{G85R} motoneurons (2 with sustained firing). The different patterns of discharge were equally distributed in both WT and SOD1^{G85R} motoneurons in our experimental conditions.

Effect of Riluzole on the discharge pattern of SOD1 lumbar motoneurons

In this set of experiments, we compared the effects of Riluzole on SOD1^{G85R} (n=5) and SOD1^{G93A} (n=2) motoneurons recorded in slices and submitted to two different stimulus protocols: a fast depolarizing constant current step (duration: 1s) inducing a continuous discharge of the motoneuron and a slow progressive depolarizing and repolarizing current (ramp protocol) lasting four seconds each way, allowing for spike frequency adaptation processes. This procedure was used to study the response of SOD1^{G85R} (Fig 5) and SOD1^{G93A} / Hb9-eGFP (Fig 6) motoneurons during bath application of Riluzole.

At low doses (5 μ M, Fig 5), Riluzole induced a reversible reduction of the adapted discharge frequency induced by the depolarizing step (Fig. 5, A2 and C). The ramp protocol (Fig. 5, D1-D3) showed a progressive inactivation of spiking, starting with the maximum current values, extending progressively to the repolarization phase until a complete blockade was obtained 30 minutes after the start of the perfusion. At this stage, the membrane potential time-course was not ohmic and displayed a rounded shape probably due to an unaffected underlying membrane current. After

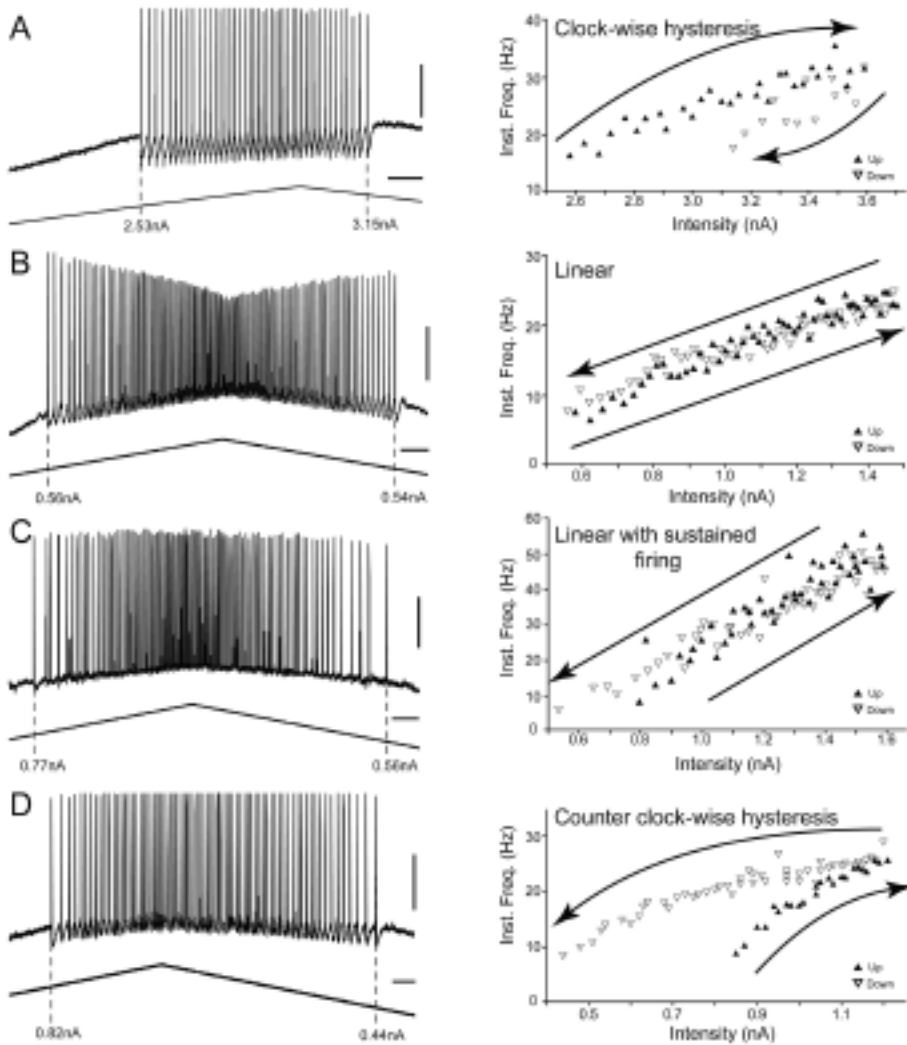


Fig. 4. - Four patterns of discharge were recorded in response to current ramp stimulation both for WT and *SOD1^{G85R}* motoneurons.

A-D: Responses of 4 motoneurons (top traces) to a ramp current injections (bottom traces). Currents at spike recruitment and derecruitment are given under the dotted-lines. Graphs on the right part are plots of the instantaneous firing frequency as a function of the intensity of the injected current.

A: Clock-wise hysteresis pattern recorded from a P9 motoneuron; note the firing rate adaptation on the descending phase. Scale bars, 250ms and 20mV. Ramp duration 8.1 s, maximal intensity of injected current 3.6 nA.

B: Linear F-I relationship recorded from a P7 motoneuron; note the firing frequency curves that overlap on the ascending and descending phases. Scale bars, 500ms and 20mV. Ramp duration 10.8 s, maximal intensity of injected current 1.5 nA.

C: Linear F-I relationship with sustained firing on the descending part recorded from a P5 motoneuron. Scale bars, 250ms and 20mV. Ramp duration 5.4 s, maximal intensity of injected current 1.45 nA.

D: Counter clock-wise hysteresis pattern recorded from a P9 motoneuron. Note the acceleration of firing frequency on the descending part compared to the ascending one. Scale bars, 250ms and 20mV. Ramp duration 8.1 s, maximal intensity of injected current 1.15 nA.

washing, instantaneous firing frequency returned to control values but the motoneuronal response to the same current pulse started and terminated earlier even after 1 h washout (Fig. 5, D3).

Similar results were observed on WT (n=7) and SOD1^{G93A} / Hb9-eGFP (n=2). As shown on fig 6C, the motoneurons in the lateral part of the ventral horn can be unambiguously identified by the presence of green fluorescent protein (GFP). Applying larger doses of Riluzole (10 μ M) resulted in a fast (less than 3 minutes) and complete blockade of both the pulse (Fig. 6A) and the ramp (Fig. 6D) responses. In the case of the ramp response, the membrane potential time course after spike blockade was strictly ohmic (Fig. 6, D2), indicating a complete blockade of depolarizing (inward) membrane currents. Returning to standard perfusion medium induced partial recovery of the continuous discharge. The instantaneous firing frequency remained much lower than control values during both pulse and ramp stimulations. Furthermore, the

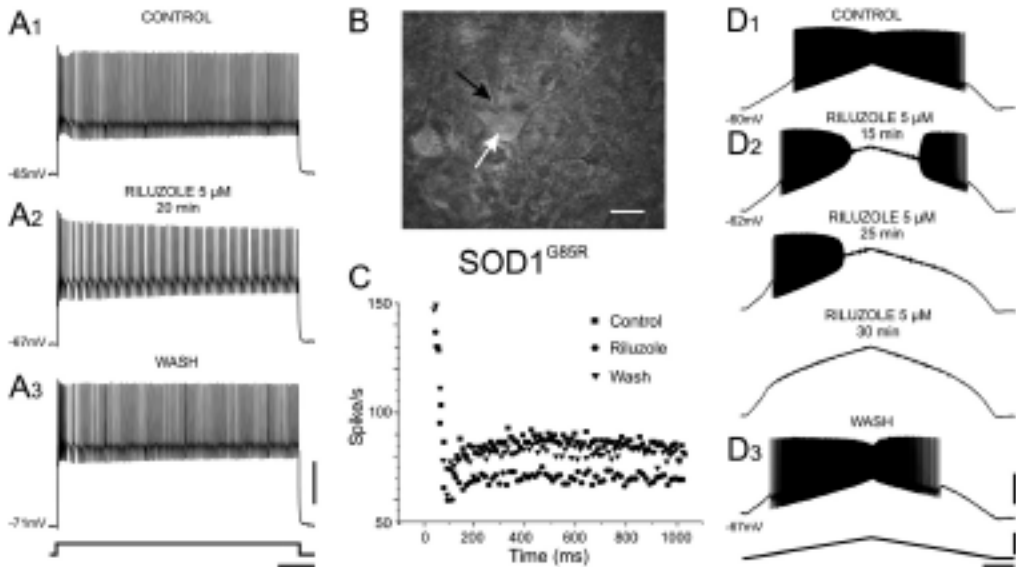


Fig. 5. - Effects of Riluzole on the repetitive discharge of a SOD1^{G85R} motoneuron.

A1-A3: Repetitive firing of a SOD1^{G85R} motoneuron (P8) in response to a pulse of current (2.5nA - 1s, bottom trace), before (A1), during (A2) and after (A3) the application of Riluzole (5 μ M). Scale bars, 150ms and 30mV.

B: DIC infrared red photomicrograph of the recorded motoneuron (40x). The patch electrode (black arrow) was placed in contact to the soma of the motoneuron (white arrow).

C: Analysis of the instantaneous spike discharge frequency during the pulse of current illustrated in A. The instantaneous frequency of discharge was plotted as a function of time. Note that Riluzole application lowers the spike frequency revealing the implication of persistent Na⁺ conductances in the repetitive firing.

D1-D3: Effect of Riluzole (same application than in A) on the motoneuron submitted to current ramp protocol. Note that the blockade of spiking was progressive and thorough. The fact that spiking was completely abolished suggests that Riluzole has also affected the Na⁺ voltage sensitive channels. Scale bars, 1s, 4nA and 30mV.

discharge, which was symmetrical on control recordings, became assymetrical with sustained firing during the repolarizing phase (Fig. 6, C and D3).

DISCUSSION

The passive and active electrical properties of motoneurons from $SOD1^{G85R}$ mice were previously compared to those of wild type animals (3, 11). On the basis of electrical data on input resistance and membrane time constant measurements, we hypothesized that motoneurons from transgenic animals should be larger than that of WT, at the beginning of the second postnatal week (3). In the present work we found that the soma size, number and mean diameter of primary dendrites was comparable in both samples of motoneurons ($n=9$ for WT and $n=8$ for $SOD1^{G85R}$). However, the full 3D reconstructions of two motoneurons in each sample at postnatal ages P8-9

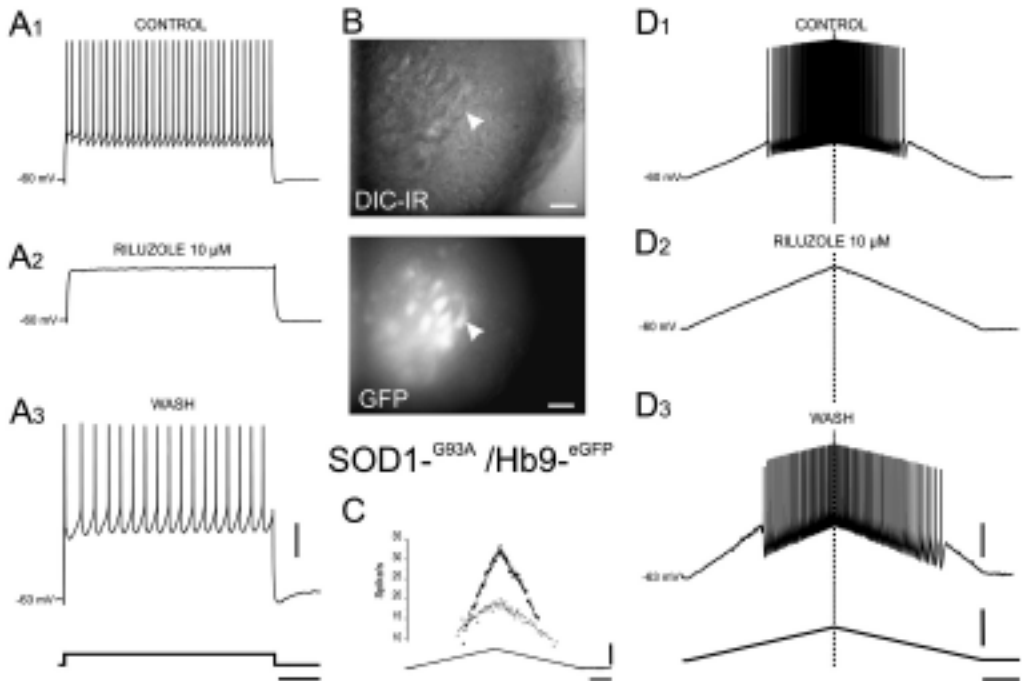


Fig. 6. - Effects of Riluzole on the repetitive discharge of a $SOD1^{G93A}/Hb9-eGFP$ motoneuron.

A1-A3: Repetitive firing of the motoneuron in response to a pulse of current (1nA- 1sec, bottom trace), before (A1), after 3 minutes of perfusion of Riluzole 10 μ M (A2) and after returning to standard perfusion (A3). Note the quick and complete blockade of discharge by Riluzole in A2. Calibration bars: 20 mV; 200 ms.

B: Photomicrographs of the recorded motoneuron (40x) with DIC infrared optics (upper) and with GFP fluorescence (lower). The recorded motoneuron is indicated with an arrowhead. Calibration bars: 50 μ m.

C: Graphs of the instantaneous spike frequencies plotted as a function of time corresponding to the responses illustrated in D1 and D3. Same ramp as in D (1 nA; 1 s).

showed that dendritic trees in motoneurons from SOD1^{G85R} mice had more branching nodes and terminals. They were also larger in terms of dendritic length and membrane surface area confirming the previous hypothesis. Whether these morphological alterations are due to a delayed maturation of supraspinal descending pathways or to a peripheral perturbation at the neuromuscular junction have yet to be determined. Whatever their origin, such morphological modifications like the higher number of branching nodes in the dendrites may have important functional implications for the motoneuron electrical behaviour (4, 15, 16).

Concerning the electrophysiological recordings, our results show that developing lumbar motoneurons from both WT and SOD1^{G85R} mice displayed the four types of frequency vs intensity (F-I) relationships, as described in adult animals (2, 8). Furthermore, two types of discharge among them (counter clockwise and linear with sustained firing) suggest the presence of persistent inward currents (2, 8). The gain of motoneurons from SOD1^{G85R} mice was affected in this postnatal period (3). Since activation of persistent inward currents modulate the slope of the (F-I) relationship (13, 19) and that the sodium persistent inward current has been involved in the toxicity of motoneurons in ALS models (18), we compared the effects of Riluzole on the discharge properties of WT, SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} motoneurons. No differences were seen with Riluzole during this postnatal period between the different groups of motoneurons in our experimental conditions. The blocking effect of Riluzole on the discharge of motoneurons was similar to that already described (22). We are now investigating whether the persistent inward calcium currents through the L-type calcium channels may be involved in the lower gain of motoneurons in SOD1 mouse pups. The present results confirm previous studies (1, 3, 11) that the maturation of lumbar motoneurons is altered by the SOD1 mutations linked to ALS.

SUMMARY

Antidromically identified lumbar motoneurons intracellularly recorded in the entire brainstem/spinal cord preparation isolated from SOD1^{G85R} postnatal mice (P3-P10) were labelled with neurobiotin and fully reconstructed in 3D from serial sections in order to analyse their morphology. This staining procedure revealed differences between WT and SOD1^{G85R} dendritic trees for most metric and topologic parameters analyzed. A highly complex morphology of SOD1^{G85R} motoneurons dendrites (increased number of branching points and terminations) was found and the dendritic trees were longer compared to the WT motoneurons. These morphological changes observed in P8-P9 motoneurons mice occurred concomitantly with a decrease in the input resistance and gain. During electrophysiological recordings, four patterns of discharge were observed in response to ramp stimulations, that were equally distributed in WT and SOD1^{G85R} motoneurons. In slice preparation, whole cell patch-clamp recordings made from developing motoneurons in SOD1^{G85R} and double transgenic SOD1^{G93A}/Hb9-eGFP mice showed that Riluzole, a blocker of per-

sistent inward sodium conductance, altered the repetitive firing in a similar way for the 2 strains.

These results show that the SOD1 mutations linked to familial ALS alter the development of the electrical and morphological properties of lumbar motoneurons.

Acknowledgements. - This research was supported by CNRS and a grant from The Association Française contre les Myopathies (AFM). J. A. received a doctoral fellowship from AFM. We thank Dr Brigitte Pettmann for the gift of double-transgenic SOD1-G93A/Hb9-eGFP mice and Dr Wilfrid Casseron for genotyping.

REFERENCES

1. AMENDOLA, J., VERRIER, B., ROUBERTOUX, P., and DURAND, J. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.*, **20**: 2822-2826, 2004.
2. BENNETT, D.J., LI, Y., SIU, M. Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *J. Neurophysiol.*, **86**: 1955-71, 2001.
3. BORIES, C., AMENDOLA, J., LAMOTTE D'INCAMPS, B., and DURAND, J. Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis *Europ. J. Neurosci.*, In press., 2006.
4. BRAS, H., GOGAN, P., and TYC-DUMONT, S. The dendrites of single brain-stem motoneurons intracellularly labelled with horseradish peroxidase in the cat. Morphological and electrical differences. *Neuroscience*, **22**: 947-70, 1987.
5. BRUIJN, L.I., BECHER, M.W., LEE, M.K., ANDERSON, K.L., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., SISODIA, S.S., ROTHSTEIN, J.D., BORCHELT, D.R., PRICE, D.L. and CLEVELAND, D.W. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, **18**: 327-338, 1997.
6. BRUIJN, L.I., HOUSEWEART, M.K., KATO, S., ANDERSON, K.L., ANDERSON, S.D., OHAMA, E., REAUME, A.G., SCOTT, R.W. AND CLEVELAND, D.W. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild type SOD1. *Science*, **281**: 1851-1854, 1998.
7. BRUIJN, L.I., MILLER, T.M. and CLEVELAND, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**: 723-749, 2004.
8. BUTTON, D.C., GARDINER, K., MARQUESTE, T., GARDINER, P.F. Frequency-current relationships of rat hindlimb alpha-motoneurons. *J Physiol., Lond.*, **573**: 663-77, 2006.
9. CLEVELAND, D.W. and ROTHSTEIN, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**: 806-819, 2001.
10. DAL CANTO, M.C., and GURNEY, M.E. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **93**: 537-50, 1997.
11. DURAND, J., AMENDOLA, J., BORIES, C. and LAMOTTE D'INCAMPS, B. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol., Paris*, **99**: 211-220, 2006.
12. GURNEY, M.E., PU, H., CHIU, A.Y., DAL CANTO, M.C., POLCHOW, C.Y., ALEXANDER, D.D., CALIENDO, J., HENTATI, A., KWON, Y.W., DENG, H.X. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, **264**: 1772-5, 1994.

13. HOUNSGAARD, J, and MINTZ, I. Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *J. Physiol., Lond.*, **398**: 591-603, 1988.
14. JESSELL, T.M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.*, **1**(1): 20-9, 2000.
15. KOROGOD, S.M., KULAGINA, I.B., HORCHOLLE-BOSSAVIT, G., GOGAN, P., TYC-DUMONT, S. Activity-dependent reconfiguration of the effective dendritic field of motoneurons. *J. Comp. Neurol.*, **422**: 18-34, 2000.
16. KOROGOD, S.M., KULAGINA, I.B., KUKUSHKA, V.I., GOGAN, P. and TYC-DUMONT, S. Spatial reconfiguration of charge transfer effectiveness in active bistable dendritic arborizations. *Eur. J. Neurosci.*, **16**: 2260-70, 2002.
17. KUO, J.J., SCHONEWILLE, M., SIDDIQUE, T., SCHULTS, A.N., FU, R., BAR, P.R., ANELLI, R., HECKMAN, C.J. and KROESE, A.B. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.*, **91**: 571-5, 2004.
18. KUO, J.J., SIDDIQUE, T., FU, R., and HECKMAN, C.J. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol., Lond.*, **563**: 843-54, 2005.
19. LI, Y., BENNETT, D.J. Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J. Neurophysiol.*, **90**(2): 857-69, 2003.
20. LI, Y., BREWER, D., BURKE, R.E., ASCOLI, G.A., Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J. Comp. Neurol.* **483**(3): 304-17, 2005.
21. MCHANWELL, S., and BISCOE, T.J., The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **293**: 477-508, 1981.
22. MILES, G.B., DAI, Y., and BROWSTONE, R.M. Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J. Physiol. Lond.*, **566**:519-32, 2005.
23. PIERI, M., ALBO, F., GAETTI, C., SPALLONI, A., BENGTON, C.P., LONGONE, P., CAVALCANTI, S. and ZONA, C. Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, **351**: 153-56, 2003.
24. PUN, S., SANTOS, A.F., SAXENA, S., XU, L., and CARONI, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci.* **9**, 408-19, 2006.
25. ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D.A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J.P., DENG, H.X. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**: 59-62, 1993.
26. URBANI, A., and BELLUZZI, O. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **12**: 3567-74, 2000.
27. WILLIAMSON, T.L., and CLEVELAND, D.W. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.*, **2**: 50-6, 1999.

