

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
U.F.R. DE BIOLOGIE

## THESE

Présentée par

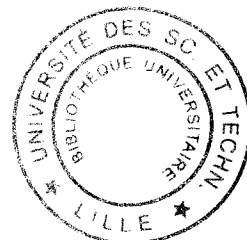
**Nicolas TREFFORT**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
Discipline : « Sciences de la Vie et de la Santé »

# INFLUENCE DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI CONSEQUENCES DE LA MICROGRAVITE SIMULEE SUR LES NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES

Présentée et soutenue publiquement  
Le 9 décembre 2005



## JURY

**Mlle Chantal Pérot**  
Professeur des Universités, Université de Compiègne

**Rapporteur**

**M Jacques Van Hoecke**  
Professeur des Universités, Université de Bourgogne

**Rapporteur**

**Mlle Dominique Desplanches**  
Chargée de Recherches CNRS, Université de Lyon I

**Examineur**

**M Julien Petit**  
Professeur des Universités, Université de Bordeaux II

**Examineur**

**M Maurice Falempin**  
Professeur des Universités, Université de Lille I

**Directeur de Thèse**

*Travail réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire,  
Université des Sciences et Technologies de Lille*

## SOMMAIRE

Remerciements .....	8
Liste des figures et tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	14
Liste des publications .....	15

<b>Avant-propos .....</b>	<b>16</b>
---------------------------	-----------

<b>Rappels bibliographiques .....</b>	<b>19</b>
---------------------------------------	-----------

<b>I LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE.....</b>	<b>20</b>
<b>A. STRUCTURE DU MUSCLE SQUELETTIQUE.....</b>	<b>21</b>
1. Description macroscopique.....	21
2. Description microscopique.....	22
<b>B. LES STRUCTURES CONTRACTILES .....</b>	<b>23</b>
1. Définition .....	23
2. Les différents types de fibres présents dans les muscles.....	23
2.1. Classification par myosine ATPase.....	23
2.2. Classification des types de fibres en fonction du métabolisme.....	24
<b>C. L'INNERVATION MOTRICE ET LA NOTION D'UNITE MOTRICE.....</b>	<b>25</b>
<b>D. LA JONCTION MYO-TENDINEUSE (JMT).....</b>	<b>28</b>
1. Organisation structurale .....	28
2. Composition.....	28
3. Le complexe muscle-tendon.....	29
<b>II L'ORGANE TENDINEUX DE GOLGI (OTG) .....</b>	<b>31</b>
<b>A. CARACTERISTIQUES DES OTG.....</b>	<b>31</b>
1. Emplacement et distribution.....	31

2. Dimensions, morphologie et structure .....	32
<b>B. L'INNERVATION DE L'OTG .....</b>	<b>34</b>
1. Innervation sensitive des OTG : la fibre afférente Ib .....	34
2. Les stimuli d'activation .....	34
2.1. Activation sur muscle entier.....	35
2.2. Activation par les unités motrices .....	35
2.3. La notion de «champ récepteur ».....	39
2.4. Le phénomène d'«unloading» .....	40
3. Naissance du message nerveux afférent.....	42
3.1. Mécanisme de transduction.....	42
3.2. Sites d'initiation du potentiel récepteur.....	43
3.3. Sites de naissance des potentiels d'action ou initiation d'influx.....	44
<b>III LA MOELLE EPINIÈRE .....</b>	<b>45</b>
<b>A. DONNEES MORPHOLOGIQUES .....</b>	<b>45</b>
1. Description .....	45
2. Lamination de la moelle épinière.....	46
<b>B. LES NEUROTRANSMETTEURS ET LEURS RECEPTEURS SYNAPTIQUES.....</b>	<b>48</b>
1. Les acides aminés neurotransmetteurs .....	48
1.1. Les neurotransmetteurs inhibiteurs .....	48
1.2. Les neurotransmetteurs excitateurs .....	49
2. Les récepteurs membranaires des acides aminés neurotransmetteurs présents au niveau post-synaptique.....	49
2.1. Le récepteur Glycine .....	49
2.2. Le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) .....	52
<b>C. LES RESEAUX INFLUENÇANT LES MOTONEURONES .....</b>	<b>53</b>
1. Les influences périphériques agissant sur les motoneurones.....	55
1.1. Circuits spinaux Ia .....	55
1.2. Circuits réflexes alimentés par les fibres Ib .....	56
1.3. Circuits réflexes alimentés par les fibres afférentes musculaires du groupe II .....	57
1.4. Voies réflexes alimentées par les afférences cutanées, articulaires et musculaires à seuils d'activations moyen et élevé .....	57
2. Les influences supraspinales agissant sur les MN .....	58

<b>IV. PLASTICITE NEUROMUSCULAIRE.....</b>	<b>60</b>
<b>A. L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE .....</b>	<b>60</b>
1. Définition .....	60
2. Moyens d'obtention et buts .....	60
3. Le modèle de Morey et coll. (1979).....	61
<b>B. PLASTICITE MUSCULAIRE .....</b>	<b>61</b>
1. Modifications des structures contractiles en situation d'hypoactivité	62
1.1. Adaptation du phénotype musculaire .....	62
1.2. Modification des propriétés mécaniques .....	63
1.3. Hétérogénéisation des UM.....	64
1.4. Modification de l'activité électromyographique (EMG).....	64
2. Modifications de la jonction myo-tendineuse et du tendon en situation	
d'HH .....	65
2.1. Changement des isoformes de collagène .....	65
2.2. Changements structuraux de la jonction myo-tendineuse (JMT).....	65
2.3. Changements des propriétés mécaniques tendineuses.....	65
<b>C. PLASTICITE DES AFFERENCES .....</b>	<b>66</b>
1. Modifications des afférences musculaires et propriétés des récepteurs	
musculaires .....	66
1.1. Les fuseaux neuromusculaires (FNM).....	66
1.2. Les OTG.....	67
2. Modifications de l'activité des afférences et des efférences .....	68
<b>D. PLASTICITE DE LA MOELLE EPINIÈRE.....</b>	<b>68</b>
1. Les modifications de la moelle épinière dues aux modifications	
environnementales .....	68
2. Les modifications du métabolisme des neurotransmetteurs .....	69
3. Modifications du seuil d'excitation des motoneurones .....	70
<b>E. PLASTICITE DU CORTEX CEREBRAL .....</b>	<b>71</b>
 <b>Position du problème .....</b>	 <b>72</b>



<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>74</b>
<b>I. CONDITIONS D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE (HH).....</b>	<b>75</b>
<b>II. MESURE DES EFFETS DE L'HH SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI (OTG) .....</b>	<b>76</b>
<b>A. ETUDES DES CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES OTG IN SITU .....</b>	<b>76</b>
<b>1. Préparation chirurgicale.....</b>	<b>76</b>
<b>2. Montage sur le dispositif d'enregistrement.....</b>	<b>77</b>
<b>3. Isolation des afférences provenant du muscle soleus.....</b>	<b>77</b>
<b>4. Identification de la fibre afférente Ib .....</b>	<b>78</b>
<b>5. Isolation des unités motrices «en-séries» .....</b>	<b>79</b>
<b>6. Protocole expérimental de stimulation .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Paramètres mesurés et enregistrés .....</b>	<b>80</b>
<i>7.1. Paramètres mécaniques musculaires .....</i>	<i>80</i>
<i>7.2. Vitesse de conduction des fibres afférentes Ib.....</i>	<i>81</i>
<i>7.3. Paramètres de décharge .....</i>	<i>82</i>
<i>7.4. Sensibilités mesurées indirectement par rapport à la décharge .....</i>	<i>83</i>
<b>B. MORPHOLOGIE DES OTG .....</b>	<b>83</b>
<b>1. Prélèvement des tissus .....</b>	<b>83</b>
<b>2. Protocole de coupe.....</b>	<b>83</b>
<b>3. Coloration par la méthode ATPase .....</b>	<b>84</b>
<i>3.1. Préparation des solutions.....</i>	<i>84</i>
<i>3.2. Coloration .....</i>	<i>84</i>
<b>4. Quantification et recueil des données .....</b>	<b>85</b>
<i>4.1. Surface des fibres musculaires .....</i>	<i>85</i>
<i>4.2. Morphologie des OTG.....</i>	<i>86</i>
<b>III. HH ET NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES .....</b>	<b>86</b>
<b>A. QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES .....</b>	<b>86</b>
<b>1. Prélèvements des tissus .....</b>	<b>86</b>
<b>2. Préparation des échantillons.....</b>	<b>87</b>
<b>3. Préparation des standards externes .....</b>	<b>88</b>

4. Chromatographie liquide de haute précision à détection ampérométrique pulsée intégrée (HPLC iPAD).....	88
5. Analyse des données .....	91
<b>B. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DES RECEPTEURS GLYCINE ET NMDA.....</b>	<b>91</b>
1. Prélèvement des tissus .....	91
2. Extraction des protéines du tissu nerveux.....	92
3. Electrophorèse dénaturante (avec Sodium-Dodécyl-Sulphate) sur Gel de PolyAcrylamide ou SDS-PAGE.....	92
3.1. Le gel de séparation.....	94
3.2. Le gel de concentration .....	95
3.3. Migration des échantillons dans le gel.....	95
4. Transfert sur membrane.....	96
5. Marquage aux anticorps.....	96
6. Analyse des films et quantification du signal des protéines .....	97
<b>IV. ANALYSES STATISTIQUES.....</b>	<b>97</b>
1. Analyses statistiques des propriétés fonctionnelles des OTG.....	98
2. Analyses statistiques des propriétés morphologiques des OTG et des fibres musculaires .....	98
3. Analyses statistiques des concentrations en acides aminés de la moelle épinière ventrale .....	98
4. Analyses statistiques de la densité de récepteur glycine et NMDA de la moelle épinière ventrale .....	99

## **Résultats ..... 100**

<b>I. EFFETS DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI .....</b>	<b>101</b>
<b>A. EFFETS DE L'HH SUR LES POIDS CORPORELS ET SUR LES MUSCLES .....</b>	<b>101</b>
1. Les poids corporels et les poids musculaires .....	101
2. Les surfaces de fibres musculaires .....	101
3. Paramètres mécaniques musculaires.....	103

<b>B. EFFETS DE L'HH SUR LES CARACTERISTIQUES DE DECHARGE DES OTG.....</b>	<b>104</b>
1. Vitesses de conduction de la fibre afférente lb.....	104
2. Paramètres électrophysiologiques .....	105
2.1. Pic dynamique (PD) .....	105
2.2. Décharge statique (DS).....	105
3. Sensibilités de l'OTG .....	107
3.1. Sensibilité dynamique (SD) .....	107
3.2. Sensibilité statique (SS) .....	109
3.2. Sensibilité statique (SS) .....	109
<b>B. EFFETS DE L'HH SUR LES PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DES OTG</b>	<b>111</b>
.....	111
<b>II. HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE ET NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES</b>	<b>113</b>
.....	113
<b>A. QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES .....</b>	<b>113</b>
1. Concentration de protéines .....	113
2. Chromatogrammes .....	113
3. Acides aminés et neurotransmetteurs.....	115
<b>B. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DES RECEPTEURS GLYCINE ET NMDA.....</b>	<b>118</b>
1. Concentration de protéines .....	118
2. Quantification de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des récepteurs glycine .....	118
3. Quantification de l'expression des sous unités NR1 et NR2A des récepteurs NMDA.....	119
 <b>Discussion.....</b>	 <b>120</b>
<b>I. EFFETS DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI .....</b>	<b>121</b>
<b>A. COMPARAISON DES PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DES OTG ....</b>	<b>121</b>
<b>B. EFFETS DE L'HH SUR LES CARACTERISTIQUES DE DECHARGES DES OTG.....</b>	<b>123</b>

1. Les mesures directes : pic dynamique et décharge statique .....	123
2. La sensibilité dynamique (SD) .....	123
3. La sensibilité statique (SS) .....	124
C. BILAN DES EFFETS DE L'HH SUR LES OTG .....	125
II. HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE ET NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES .....	126

## **Conclusion et perspectives .....131**

## **Références bibliographiques .....134**

## **Annexes .....163**

---

## Remerciements

Je voudrais ces remerciements sincères et non simplement comme une épreuve de style ou un passage obligé. Je n'ai jamais connu de doctorant, quelque soit la discipline, qui ne me dise que sa thèse n'a pas été une épreuve. Pour moi comme pour les autres, elle s'est déroulée avec son lot de difficultés et de mauvais moments, mais elle m'a permis de me construire. Et quoi qu'en disent certains, personne ne se construit tout seul. Pour ma part, j'exprime ma gratitude à ceux qui y ont participé de très près ou de loin.

Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur Maurice Falempin pour son accueil dans le laboratoire et pour la direction de cette thèse. Bien qu'il se défende de tout paternalisme, il veille avec bienveillance sur ses étudiants.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Yvonne Mounier pour m'avoir parrainé auprès du CNES et m'avoir fait profiter de son expérience de la recherche.

Je remercie tous les membres de mon jury pour avoir accepté d'être soit rapporteur soit examinateur de mon travail, Mademoiselle le Professeur Chantal Pérot, Mademoiselle le Docteur Dominique Desplanches, Monsieur le Professeur Julien Petit, Monsieur le Professeur Jacques Van Hoecke.

Le Docteur Florence Picquet pour son encadrement non officiel et pour avoir été là dans les bons moments de la thèse comme dans les mauvais

Le Docteur Marie Hélène Canu, pour son calme en toute circonstance aussi bien pour prélever le cortex que pour un « shomen uchi ».

Le Docteur Laurent De-Doncker, pour son aide lors de mon début de thèse, sa précision et sa connaissance de la dissection et mon intégration dans le laboratoire.

Le Professeur Laurence Stevens et le Docteur Bruno Bastide pour leurs disponibilités et leurs conseils.

Le Docteur Guy Dubreucq, le chercheur qui allie classe vestimentaire et compétences techniques (en biochimie, en golf et au Sherwood).

---

Le Docteur Yann Guérardel et Monsieur Yves Leroy et Monsieur le Professeur Joël Mazurier, merci les biochimistes de m'avoir sorti de la mélasse.

Laëtitia, Françoise et Valérie, que dire sinon tout le bien que je pense de vous trois. Vous assurez tout le travail préliminaire à toutes manips, voire la manip complète. Vous êtes les magiciennes de la paillasse.

Jean-Pierre Noël, dit « JP », le plus fort des ingénieurs-mécanicien-de-recherche-ancien-body-builder, pour cette capacité à résoudre tous les problèmes, relever tous les défis avec une rapidité digne de Lucky Luke et une passion pour le travail soigné.

Michèle et François pour leur soutien logistique au cours de ces années.

André Bous pour son aide technique et « électronique » lors des manip électrophysiologiques

Monsieur le Professeur Didier Vieau, le Docteur Gilles VanCamp pour la « bataille de l'HPLC ».

Toutes les personnes, statutaires ou étudiantes, qui sont passées au laboratoire au cours de ces 3 dernières années, Charline, Mounir, Julie, Fatima et en particulier ceux qui ont séjourné dans le bureau 8b : Thomas, Clothilde, Gwénaél « doc » Raoul, Olivier le surfeur fou et j'en oublie malheureusement.

Le Docteur Erwan Dupont pour toutes les idées et conseils qu'il a pu me prodiguer.

Le Docteur Cyrille Bozzo, que dire du roi de la 2D.

Serge et en particulièrement Daniel pour avoir veillé consciencieusement sur mes malchanceuses petites victimes à pelages blancs et pour nos petites discussions matinales précédant l'effervescence de la journée.

Loïc Brunet et Gilles Courtand, les « pros » du C.C.M.I.C., qui se sont creusés les méninges dans tous les sens pour résoudre tous les défis que je leur ai posés

---

Les Professeurs et les Maîtres de Conférences du bâtiment SN4 pour nos discussions informelles sur des sujets scientifiques ou non.

Tous les thésards ou DEA du bâtiment SN4 qui ont partagés les galères de la thèse, Hélène, Adeline, Nicolas, Jérôme, Guitou (désolé pour tes articulations que j'ai si souvent malmenées), Olivier, Vincent, Sylvain, Laëtitia, Pascal, Simon, Bérengère, Marion et Delphine.

J'aurais également une pensée pour le Professeur Jean-Marc Péquignot qui a été le premier a me montré que la recherche et la thèse pouvaient rester quelque chose de merveilleux si l'on se donnait la peine d'y croire un peu et de faire fi de l'adversité et des difficultés...

Tous mes ami(e)s lillois, qui ont transformés mon passage dans le Nord, que les oubliés me pardonnent...

Philippe Monnier, Eric Baux et Benoît Mabire, mes sensei lillois.

Damien, Pauline, Sébastien et Candie tout simplement parce que vous êtes vous et que malgré les distances, le temps qui passe et l'espacement de nos rencontres vous êtes toujours restés les plus proches. « ...le temps renforce les amitiés ». J'aurais aussi une pensée pour le petit Léo, le nouveau venu dans la bande.

Les membres de ma famille, ma mère et mon père, mes 2 sœurs, Christelle et Anne-Sophie, mes grands parents maternels, ma grand-mère paternel, pour leurs soutiens moraux et financiers

Ce travail réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire a reçu le soutien financier du Centre National d'Etudes Spatiales.

**Liste des figures et tableaux**

Figure 1 : Représentation de la structure du muscle squelettique : du muscle entier aux filaments contractiles .....	21
Figure 2 : Répartition au sein du muscle des différentes fibres musculaires appartenant à une même unité motrice .....	26
Figure 3 : Propriétés mécaniques des différents types d'unités motrices .....	27
Figure 4 : Photographie en microscopie électronique d'une jonction myo-tendineuse de soleus de rat .....	28
Figure 5 : Modélisation du complexe muscle-tendon .....	29
Figure 6 : Représentation schématique d'un OTG et de fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles» .....	32
Figure 7 : Réponse d'une fibre afférente Ib à une secousse musculaire et à la contraction tétanique d'une UM.....	36
Figure 8 : Représentation schématique de 2 possibilités d'effet « unloading » exercé par des fibres musculaires «en-séries» .....	40
Figure 9 : Représentation schématique de l'effet « unloading » exercé par des fibres musculaires «en-parallèles» .....	41
Figure 10 : Représentation de la moelle épinière de rat .....	45
Figure 11 : Représentation schématique en coupe transverse de la moelle épinière au niveau segmentaire L <sub>5</sub> .....	47
Figure 12 : Récepteur glycine ionotropique.....	49
Figure 13 : Représentation schématique de la colocalisation des récepteurs glycine et GABA <sub>A</sub> en liaison avec la protéine géphyrin .....	51
Figure 14 : Représentation du récepteur ionotropique NMDA .....	52
Figure 15 : Schéma des différentes influences que peuvent recevoir les motoneurones .....	59
Figure 16 : Position des muscles soleus, tibialis anterior et extensor digitorum longus lors de la suspension des membres postérieurs de rat.....	61
Figure 17 : Représentation schématique du modèle de Morey.....	75
Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental d'enregistrement des OTG in situ en réponse à la contraction tétanique d'une UM «en-séries» .....	78
Figure 19 : Paramètres mécaniques d'une contraction en secousse musculaire .....	80
Figure 20 : Représentation des caractéristiques de décharges des OTG .....	82
Figure 21 : Photographie d'un dispositif d'HPLC iPAD .....	88
Figure 22 : Exemple d'intégration d'un pic extrait d'un chromatogramme .....	91
Figure 23 : Histogramme des CSA des différents types de fibres musculaires pour les groupes CONT et HH .....	102



Figure 24 : Exemples de contractions téaniques d'une UM «en-série» contrôle et d'une UM «en-série» HH et les décharges des OTG contrôle et HH qui leurs sont liées ..	106
Figure 25 : Histogrammes de répartition de la sensibilité dynamique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 20 et 40 Hz. ....	107
Figure 26 : Histogrammes de répartition de la sensibilité dynamique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 80 et 100 Hz. ....	108
Figure 27 : Histogrammes de répartition de la sensibilité statique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 20 et 40 Hz .....	109
Figure 28 : Histogrammes de répartition de la sensibilité statique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 80 et 100 Hz .....	110
Figure 29 : Photographies en microscopie optique de coupes transversales sériées dans la partie médiane d'un OTG CONT et d'un OTG HH .....	111
Figure 30 : Exemples d'un chromatogramme pour les groupes CONT, HH7 et HH14 .....	114
Figure 31 : Evolution des concentrations normalisées des neurotransmetteurs contenus dans deux niveaux segmentaires pour les groupes CONT, HH7 et HH14.....	117
Figure 32 : Expression des protéines de la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur glycine sur SDS PAGE.....	118
Figure 33 : Expression des protéines des sous-unités $\epsilon 1$ et $\xi 1$ du récepteur NMDA sur SDS PAGE.....	119
Figure 34 : Bilan schématique des connaissances des effets de l'HH sur les OTG, le muscle et la jonction myo-tendineuse .....	125

Tableau 1 : Coloration histologique par la méthode ATPase des fibres musculaires en fonction de leur typologie.....	24
Tableau 2 : Protocole de coloration par la méthode ATPase.....	85
Tableau 3 : Conditions de gradient des différents éluents de la phase mobile.....	90
Tableau 4 : Composition des gels de séparation de 8 et 15 %.....	94
Tableau 5 : Composition du gel de concentration.....	95
Tableau 6 : Composition du tampon de migration.....	95
Tableau 7 : Composition du tampon de transfert.....	96
Tableau 8 : Propriétés contractiles du muscle soleus et des UM «en-séries».....	103
Tableau 9 : Paramètres morphologiques du muscle soleus et des OTG pour les groupes CONT et HH.....	112
Tableau 10 : Valeurs des concentrations normalisées des acides aminés qui varient entre les niveaux segmentaires L <sub>4</sub> et L <sub>5</sub> et les groupes CONT, HH7 et HH14.....	115

---

## Liste des abréviations

**OTG** : organe tendineux de Golgi

**UM** : unité motrice

**JMT** : jonction myo-tendineuse

**CONT** : groupe contrôle

**HH** : hypodynamie-hypokinésie

**FNM** : fuseau neuromusculaire

**PPSE** : potentiel post-synaptique exciteur

**PAD** : primary afferent depolarization

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**AMPA** : acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique ou  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid en anglais

**GABA** : acide-  $\gamma$ -amino-butérique ou  $\gamma$ -amino-butyrac acid en anglais

**CC** : composante contractile

**CES** : composante élastique série

**CEP** : composante élastique parallèle

**P<sub>t</sub>** : force développée par une contraction en secousse simple ou peak twitch en anglais

**TC ou TTP** : temps de contraction ou time-to-peak en anglais

**T<sub>1/2</sub>R ou HRT** : temps de demi relaxation ou half-relaxation time en anglais

**P<sub>20</sub>** : force tétanique pour une fréquence 20 Hz

**P<sub>0</sub>** : force tétanique maximale

**PD** : pic dynamique

**DS** : décharge statique

**SD** : sensibilité dynamique

**SS** : sensibilité statique

**MN** : motoneurone

**HPLC** : Chromatographie liquide de haute performance ou High performance liquid chromatography en anglais

**BW** : masse corporelle ou body weight en anglais

**MWW** : masse musculaire ou muscle wet weight en anglais

**CSA** : surface en coupe transversale ou cross sectional area en anglais

**S** : type lent ou slow twitch en anglais

**FR** : type résistante rapide ou fast resistant en anglais

**FI** : type intermédiaire ou fast intermediate en anglais

**FF** : type fatigable rapide ou fast fatigable en anglais

**EMG** : activité électromyographique

**MyHC** : chaîne lourde de myosine ou myosin heavy chain en anglais

---

## Liste des publications

Ce travail a donné lieu aux présentations et publications scientifiques suivantes :

### *Communications scientifiques lors de congrès*

Treffort N., Picquet F., Petit J. et Falempin M.

Effets de l'hypodynamie-hypokinésie sur les caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques des organes tendineux de Golgi du muscle soleus de rat.

21<sup>ème</sup> Congrès du Club Locomotion et Motricité Rythmique, Beaune, septembre 2004.

Treffort N., Picquet F., Petit J. et Falempin M.

Effets de l'hypodynamie-hypokinésie sur les caractéristiques de décharges et la morphologie des organes tendineux de Golgi.

4<sup>ème</sup> Colloque de l'Ecole Doctorale de Biologie et de Santé de Lille, septembre 2004.

Falempin M., Treffort N. and Picquet F.

Effects of hypodynamia-hypokinesia on the Golgi tendon organ characteristics.

35<sup>ème</sup> Congrès de l'IUPS, San Diego, USA, avril 2005.

Treffort N., Dubreucq G., Picquet F., Canu M.H. , Guérardel Y. and Falempin M.

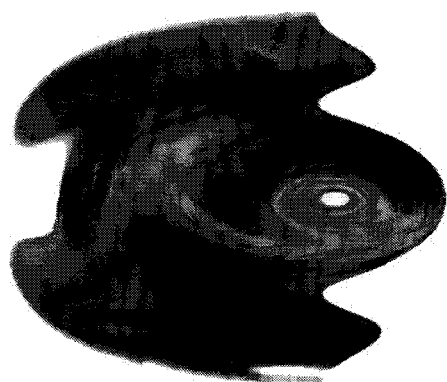
Variations des acides aminés neurotransmetteurs dans la moelle épinière ventrale de rat consécutives à une diminution d'informations afférentes

7<sup>ème</sup> Congrès de la société française de Neurosciences, Lille, mai 2005

### *Publications scientifiques*

**Treffort, N., Picquet, F., Petit, J. and Falempin, M.** (2005) The structure and response properties of Golgi tendon organs after hindlimb suspension in rats. *Exp. Neurol.* **195**, 313-321

**Treffort, N., Dubreucq, G., Canu, M.H. , Guérardel, Y., Falempin, M. and Picquet, F.** (2005) Variations in amino acid neurotransmitters in the rat ventral spinal cord after hindlimb unloading. *Soumis à FEBS Letter.*



## Avant-propos

A la question que l'on me posait régulièrement ces trois dernières années : « que fais-tu dans la vie ? » et à laquelle je répondais : « je suis étudiant en thèse de biologie », j'entendais systématiquement une réponse du style de la suivante : « Aah c'est bien ! Et tu travailles sur quoi ? »

A partir de cet instant les complications commençaient, en effet comment expliquer simplement au profane ce que je faisais tous les jours au laboratoire. Dans le meilleur des cas, mon interlocuteur voyait dans la globalité de quoi il retournait mais la plupart du temps, les tenants et les aboutissants restaient cachés sous l'obscur manteau de la Science qui à elle seule et en elle-même, justifiait toutes les manips et les sacrifices. Mes premières réponses à la question de mon sujet de thèse étaient donc assez vagues.

Comment expliquer que je travaillais dans un labo qui étudiait, entre autres, les effets de l'atrophie musculaire sur le système nerveux et sur les informations afférentes. Que l'apesanteur déclenchait une atrophie musculaire et que je suspendais des rats par la queue pour mimer les effets de l'apesanteur au niveau musculaire.

Petit à petit, à mesure que ma compréhension et que ma vision de ce que je pouvais observer au niveau expérimental, s'éclaircissaient, il devenait plus simple de parler de mes manips.

A l'aide de ces années de réflexion, je vais tenter de vous présenter l'objectif de cette thèse. En condition d'hypodynamie (absence de charge corporelle) et d'hypokinésie (réduction de l'activité motrice), le tissu musculaire s'atrophie et/ou présente une modification phénotypique. Les facteurs de déclenchement de l'atrophie ne sont pas connus. Plusieurs origines possibles sont avancées, avec chacune des données pour les appuyer. Notre travail s'inscrit dans la recherche de modification d'origine neurogène menant au déclenchement de l'atrophie. En effet, après une période d'hypodynamie-hypokinésie (HH), les informations afférentes issues des fuseaux neuromusculaires (FNM), des récepteurs cutanés plantaires, de l'appareil vestibulaire sont modifiées. Ne possédant aucune donnée après une période d'HH, sur les informations issues de l'organe tendineux de Golgi (OTG), l'autre mécanorécepteur musculaire avec le FNM, nous lui avons consacré la première partie de ce travail. La fonction de l'OTG est de signaler au système nerveux central, les variations de contraction musculaire. Les changements musculaires observés en situation d'HH suggèrent une activation modifiée des OTG. Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés de décharges et à la morphologie des OTG après une période d'HH.

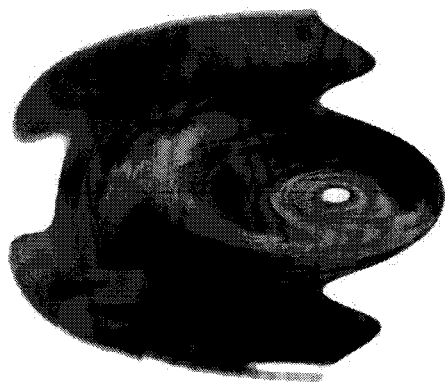
Consécutivement à l'observation des effets de l'HH sur les OTG additionnés aux connaissances déjà acquises sur l'évolution des informations afférentes provenant des divers récepteurs périphériques, nous avons ensuite étudié les effets de l'HH sur la neurotransmission au niveau de la partie ventrale de la moelle épinière lombaire.

**La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue bibliographique.** Dans le *chapitre I*, nous présenterons le muscle, en décrivant brièvement sa composition. Dans le *chapitre II*, nous développerons les données acquises sur la morphologie, la structure et le fonctionnement de l'OTG. Le *chapitre III* décrira la structure de la moelle épinière, les réseaux neuronaux influençant les motoneurones, les acides aminés neurotransmetteurs et certains des récepteurs canaux qui leurs sont liés. Enfin dans le *chapitre IV*, nous aborderons les effets de plusieurs situations expérimentales d'HH sur le muscle, les OTG et la moelle épinière.

**La seconde partie de ce manuscrit présentera en détail les matériels et méthodes utilisés pour l'ensemble des études expérimentales que nous avons menées.** Le *chapitre I* décrira le modèle d'HH utilisé. Le *chapitre II* abordera les moyens d'étude des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des OTG. Enfin, le *chapitre III* traitera des techniques utilisées pour l'étude de la neurotransmission médullaire.

**La troisième partie de ce manuscrit exposera l'ensemble de nos résultats.** Le *chapitre I* des résultats détaillera les données obtenues sur les OTG de Rats soumis à une période d'HH. Le *chapitre II* énumérera les résultats obtenus sur les neurotransmetteurs de la partie ventrale de la moelle épinière lombaire de Rats soumis à deux périodes d'HH.

Enfin, **la quatrième partie de ce manuscrit discutera des mécanismes pouvant expliquer les résultats obtenus.** La discussion générale est, comme la partie résultat, scindée en deux chapitres. Le *chapitre I* traitera des causes et des conséquences possibles des modifications observées concernant les OTG. Dans le *chapitre II*, nous exposerons les causes et les conséquences des changements impliquant les neurotransmetteurs.



# Rappels bibliographiques



## I LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

Nous allons décrire dans cette partie, le muscle dans son ensemble fonctionnel : insertion tendineuse, structures contractiles et jonction myo-tendineuse.

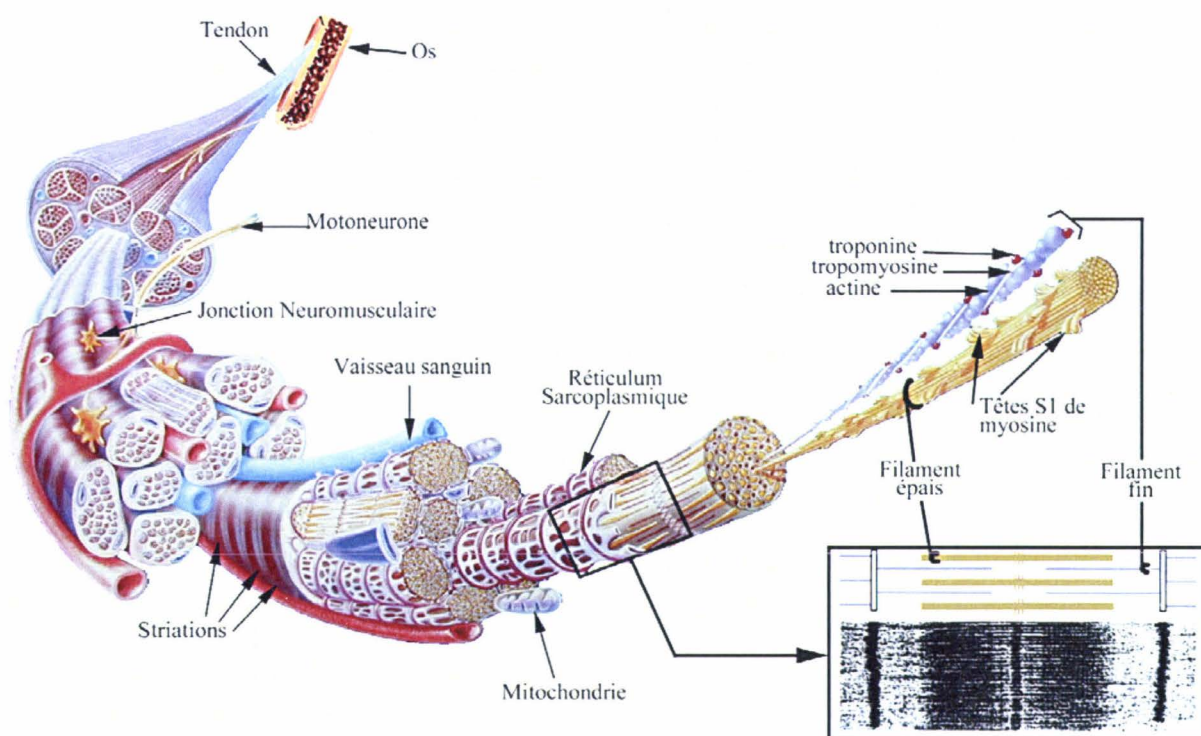
Les muscles squelettiques peuvent être différenciés en considérant soit leur fonction (posturale ou phasique), soit leur action (abducteur, adducteur), soit leurs différentes propriétés mécaniques (force et cinétique de contraction), biochimiques (voie métabolique prédominante, équipement enzymatique, types de fibres musculaires ou de protéines contractiles) et selon leur anatomie (fusiforme ou multipennée).

Les muscles posturaux, sont impliqués dans les mouvements lents et le maintien de la posture. Ils ont un rôle antigravitaire et développent des contractions lentes, peu puissantes mais très résistantes dans le temps créant ce que l'on appelle le tonus musculaire. Ce sont des muscles très richement vascularisés.

Les muscles qui ne sont pas principalement impliqués dans la posture, participent davantage à l'organisation de mouvements volontaires de plus ou moins grande finesse. Ces muscles développent des contractions rapides, puissantes sur de courtes durées. Ils sont peu vascularisés et donc peu résistants à la fatigue.

## A. STRUCTURE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

### 1. Description macroscopique



**Figure 1** : Représentation de la structure du muscle squelettique : du muscle entier aux filaments contractiles.

Les muscles squelettiques (**figure 1**) sont constitués par un ensemble de faisceaux musculaires entourés d'une enveloppe aponévrotique commune, l'épimysium. Ces faisceaux se terminent à leurs deux extrémités par un tendon. Le faisceau musculaire est individualisé par une enveloppe commune à toutes ses fibres : le péri-mysium. Chaque faisceau musculaire est constitué de fibres musculaires, chacune entourée d'une gaine conjonctive appelé endomysium. Toutes ces enveloppes se rejoignent aux extrémités du muscle pour constituer le tendon. Chaque muscle squelettique s'insère sur l'os par l'intermédiaire d'un tendon, qui assure la transmission de la force développée pendant la contraction. La force contractile produite par les muscles fait pivoter les segments squelettiques autour de leurs articulations, assurant le maintien de la posture et/ou la production de mouvement.

Le muscle est fixé à l'os par des faisceaux de fibres de collagène et des tendons, situés à chaque extrémité du muscle. Certains tendons sont très longs et le site d'attachement du tendon à l'os se situe très loin de l'extrémité du muscle. Un tendon peut supporter des charges de plus de  $500 \text{ kg/cm}^2$ .

L'os est un tissu de soutien hautement spécialisé, caractérisé par sa rigidité et sa dureté. La conformation extérieure des os est variée et irrégulière ; on peut distinguer trois types principaux : les os longs, les os courts et les os plats.

## 2. Description microscopique

Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont des éléments polynucléés de grande dimension (jusqu'à plusieurs centimètres de longueur et entre 20 et 150  $\mu\text{m}$  de diamètre). Le volume de la fibre musculaire est essentiellement occupé par les myofibrilles qui forment l'appareil contractile. Le réticulum sarcoplasmique occupe le reste du volume de la fibre musculaire. Il est en relation avec le sarcolemme (membrane plasmique). Le sarcolemme véhicule l'influx électrique musculaire nécessaire à la contraction musculaire. La fibre musculaire renferme dans son sarcoplasme des protéines contractiles comme l'actine (filament fin), la myosine (filament épais), et un complexe de protéines régulant la contraction par l'intermédiaire du filament fin, la tropomyosine et les troponines. La tropomyosine permet la fixation du filament d'actine au complexe des troponines. Le complexe des troponines est constitué d'une molécule de troponine C (TnC), une molécule de troponine I (TnI) et une molécule de troponine T (TnT). La TnC possède 4 sites de fixation pour le calcium. Au repos, la TnI masque le site de fixation de l'actine à la myosine. La TnT permet l'ancrage du complexe des troponines à la tropomyosine. L'ensemble de ces protéines est organisé en sarcomère. La myofibrille est une succession de sarcomères et chaque fibre musculaire est composée de plusieurs centaines à plusieurs milliers de myofibrilles.

## **B. LES STRUCTURES CONTRACTILES**

### **1. Définition**

Comme nous l'avons défini précédemment, les structures contractiles musculaires correspondent à l'ensemble des protéines musculaires qui, de par leur organisation, sont à l'origine du développement de la contraction musculaire.

On peut distinguer deux fonctions aux structures contractiles. Elles sont intimement liées à la position du muscle et elles vont influencer toutes les propriétés évoquées précédemment.

### **2. Les différents types de fibres présents dans les muscles**

Les propriétés d'un muscle dépendent des différents types de fibres qui le composent. Ces propriétés sont influencées par la fonction du muscle. Par conséquent, la majorité des fibres musculaires présentes dans un muscle sera en rapport avec cette même fonction.














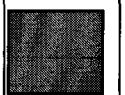
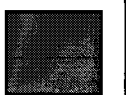

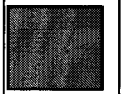
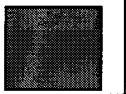
#### *2.1. Classification par myosine ATPase*

La distinction des différents types de fibres musculaires repose sur le polymorphisme des chaînes lourdes de myosine contenues dans ces fibres (Hamalainen et Pette 1993). La myosine est une molécule de grande taille composée de deux chaînes lourdes (MyHC, Myosin Heavy Chain, poids moléculaire 200 kDa) et de quatre chaînes légères (MLC, Myosin Light Chain, poids moléculaire de 15 à 30 kDa). C'est au niveau des chaînes lourdes que se trouve l'enzyme adénosine triphosphatase qui permet l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. L'activité ATPasique désigne l'activité de l'enzyme adénosine triphosphatase. Jusqu'à présent, 10 isoformes différentes de MyHC ont été identifiées (Hamalainen et Pette 1995, Pette et Staron 1990). Les quatre principaux isoformes adultes sont l'isoforme lent MyHC I et les isoformes rapides MyHC IIA, MyHC IIX (ou MyHC IID) et MyHC IIB.

La technique histochimique développée par Guth et Samaha (1969) et Brooke et Kaiser (1970) permet de distinguer les différents types de fibres musculaires présents dans un muscle. Cette technique repose sur la stabilité de l'activité enzymatique ATPasique des

différents isoformes de MyHC. Ajoutée à cette méthode, l'utilisation d'anticorps permet de mieux rendre compte de l'expression des différents isoformes de myosine présents dans une fibre donnée (Schiaffino et Reggiani 1994).

Les colorations issues de l'activité ATPasique des différents types de fibres musculaires sont illustrées dans le **tableau 1**.

Fibres	pH acide 4,3		pH acide 4,45		pH basique 10,4	
Type I	Noire		Noire		Blanche	
Type IC	Noire		Noire		Grise	
Type IIC	Grise		Noire		Noire	
Type IIA	Blanche		Blanche		Noire	
Type IID/IIX	Blanche		Grise		Grise	
Type IIB	Blanche		Grise		Grise	

**Tableau 1** : Coloration histologique par la méthode ATPase des fibres musculaires en fonction de leur typologie (d'après Brooke et Kaiser 1970 et Guth et Samaha 1969).

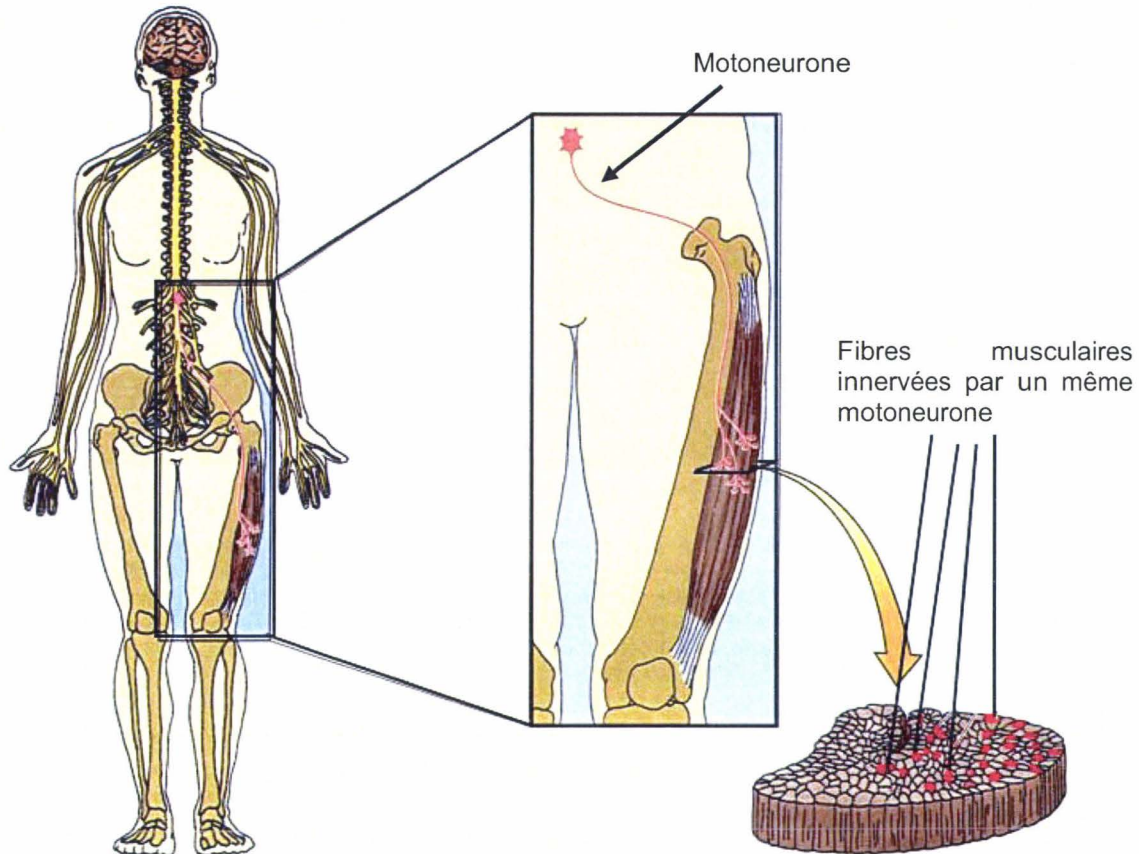
## 2.2. Classification des types de fibres en fonction du métabolisme

Il est aussi possible de distinguer les fibres musculaires en fonction de leur métabolisme énergétique. Les fibres de type I à contraction lente sont nombreuses dans les muscles posturaux et/ou lents. Très vascularisées, ces fibres contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène (métabolisme oxydatif). L'activité de la succinate déshydrogénase (SDH), enzyme caractéristique du métabolisme oxydatif, est très souvent utilisée pour déterminer le type de fibre musculaire. Les fibres de type I (activité SDH élevée) sont peu fatigables et sont surtout recrutées lors d'exercices peu intenses et de longue durée (mouvements lents, posture). En revanche, les fibres de type II (activité SDH faible) ou fibres à contraction rapide sont localisées dans les muscles rapides. Elles sont peu vascularisées

et pauvres en mitochondries, mais très riches en glycogène (métabolisme glycolytique). Les fibres de type IIA (activité SDH élevée) sont des fibres intermédiaires, résistantes à la fatigue et possédant un métabolisme oxydo-glycolytique. Les fibres rapides de type IIB (activité SDH faible) ont un métabolisme exclusivement glycolytique et sont peu résistantes à la fatigue. Les fibres de type IIX possèdent des propriétés intermédiaires entre les fibres IIA et les fibres IIB. Le pourcentage de ces différents types de fibres varie selon les types de muscles et les individus (pour revue Monti et coll. 2001).

## C. L'INNERVATION MOTRICE ET LA NOTION D'UNITE MOTRICE

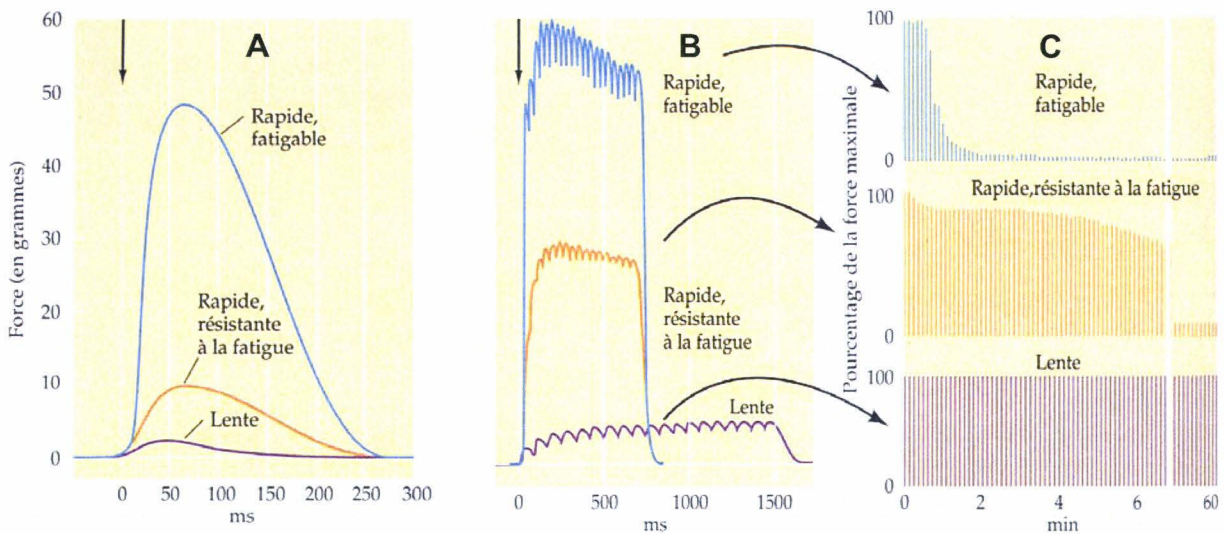
Les neurones dont les axones innervent les fibres musculaires squelettiques portent le nom de motoneurones  $\alpha$  (neurones efférents somatiques). Le corps cellulaire de ces motoneurones (MN) est situé dans le tronc cérébral ou dans la moelle épinière. Les axones des MN sont myélinisés. Chez le Rat, ce sont les axones de l'organisme qui ont le plus gros diamètre, de 5 à 6,5  $\mu\text{m}$  (Roy et coll. 1983). Ils sont donc capables de propager les potentiels d'action à de très grandes vitesses, permettant ainsi la transmission des signaux du système nerveux central aux fibres musculaires squelettiques dans des délais courts. Quand l'axone d'un motoneurone atteint un muscle, il se divise en plusieurs branches. Chaque branche établit une seule jonction avec une seule fibre musculaire. Ainsi, un seul motoneurone innerve un grand nombre de fibres musculaires. Un motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve constituent une unité motrice (UM). Les fibres musculaires d'une même unité motrice sont dispersées dans le muscle comme le montre la **figure 2**. L'UM est le plus petit élément contractile que le système nerveux puisse mettre en jeu (Henneman et coll. 1965). La classification établie par Burke et coll. (1973) et Burke et Tsairis (1973) permet de distinguer différentes catégories d'UM. Cette classification repose sur plusieurs paramètres : i) la vitesse de contraction, ii) la force développée, iii) la résistance à la fatigue et iv) la présence ou l'absence d'un « sag » (fléchissement) de la force développée lors d'une stimulation téτανique non fusionnée. Sur la base de ces paramètres, 4 types d'UM peuvent être distingués : les UM de type S (Slow Twitch) à contraction lente de faible amplitude et résistantes à la fatigue, les UM de type FR (Fast Resistant) à contraction rapide d'amplitude élevée et résistantes à la fatigue, les UM de type FF (Fast Fatigable) à contraction très rapide d'amplitude très élevée et peu résistantes à la fatigue et les UM de type FI (Fast Intermediate) dont les propriétés mécaniques sont intermédiaires entre les unités FR et FF.



**Figure 2 :** Répartition au sein du muscle des différentes fibres musculaires appartenant à une même unité motrice (d'après Purves et coll., Neurosciences, DeBoeck Université, 1999). Ces fibres sont colorées en rouge sur la coupe présentée.

Les propriétés contractiles des principaux types d'UM enregistrées chez le Chat sont illustrées sur la **figure 3**. Sont représentées en **A**, leurs réponses mécaniques à la suite d'une stimulation en choc simple ; en **B** leurs réponses mécaniques suite à une stimulation tétonique ; en **C** sont illustrés leurs comportements au cours d'un test de fatigue. Cette classification fut ensuite utilisée par de nombreux auteurs (Burke 1999, Celichowski 2000, Chamberlain et Lewis 1989, Clamann 1993).





**Figure 3 :** Propriétés mécaniques des différents types d'unités motrices (d'après Purves et coll., Neurosciences, DeBoeck Université, 1999).

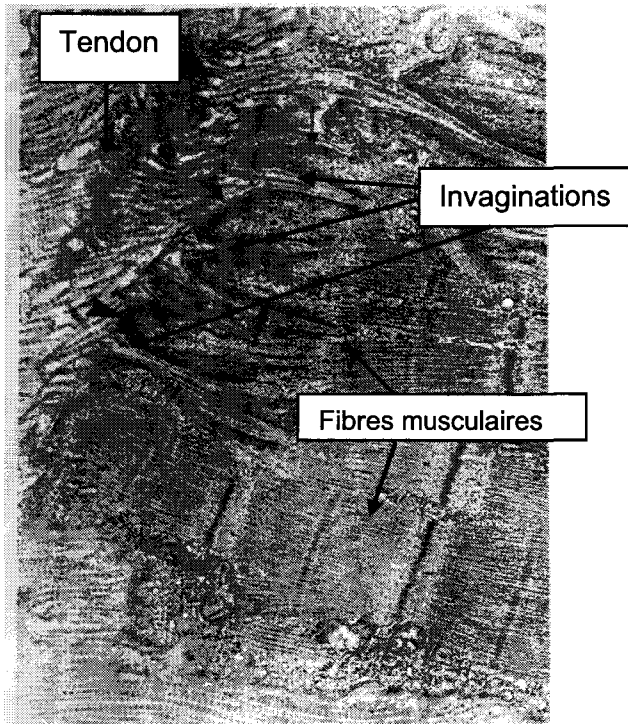
Afin de mettre en relation propriétés mécaniques et histologiques d'une UM, la technique de marquage ATPasique est couplée à la technique de déplétion glycolytique (Kugelberg 1976). Cette méthode montre qu'il existe une bonne corrélation entre les propriétés mécaniques contractiles d'une UM et le type de fibres musculaires qui la composent. En effet, les UM de type S sont composées de fibres lentes de type I, les UM de type FR sont composées de fibres rapides de type IIA, et les UM de type FF contiennent des fibres rapides de type IIB (Monti et coll. 2001, Nemeth et coll. 1986). On peut penser que les UM de type FI sont composées de fibres de type IIX.

L'ordre de recrutement des UM dépend de la taille du corps cellulaire des motoneurones qui les innervent (Henneman et coll. 1965) et de la force développée par les UM. Il est à noter que la force isométrique d'une fibre musculaire est fonction de la surface transversale (CSA) de cette fibre musculaire (Close 1972). Les UM, innervées par des MN dont le corps cellulaire est de petite taille, sont des UM de type S et sont recrutées en premier. Les UM innervées par des MN dont le corps cellulaire est de plus grande taille (UM de types FR, FF) développent des forces puissantes et sont recrutées au fur et à mesure de la nécessité de l'augmentation de la force de contraction (Cope et Pinter 1995). Classiquement, l'ordre de recrutement des UM est le suivant : S > FR > FI > FF (quand le paramètre « force croissante » est utilisé).



## D. LA JONCTION MYO-TENDINEUSE (JMT)

### 1. Organisation structurale



**Figure 4 :** Photographie en microscopie électronique d'une jonction myo-tendineuse de soleus de rat (d'après Roffino et coll. 1998).

L'extrémité de la fibre musculaire n'est pas en contact direct avec les fibres de collagène du tendon. A son extrémité, la fibre musculaire s'effile et le sarcolemme forme de très nombreux replis qui sont tapissés par la lame basale. Les fibres tendineuses de collagène s'insèrent dans la lame basale par le biais d'un réseau très dense de fibres de réticuline (Tidball et Daniel 1986, Zamora et coll. 1995). Ce réseau pénètre la lame basale et entre également en contact avec les intégrines du sarcolemme, elles-mêmes en connexion avec le cytosquelette de la cellule musculaire. La jonction myo-tendineuse présente donc une surface d'insertion considérablement élargie, grâce aux invaginations, comme illustrée sur la **figure 4**, et qui réduit d'autant l'intensité de la traction par unité de surface membranaire.

### 2. Composition

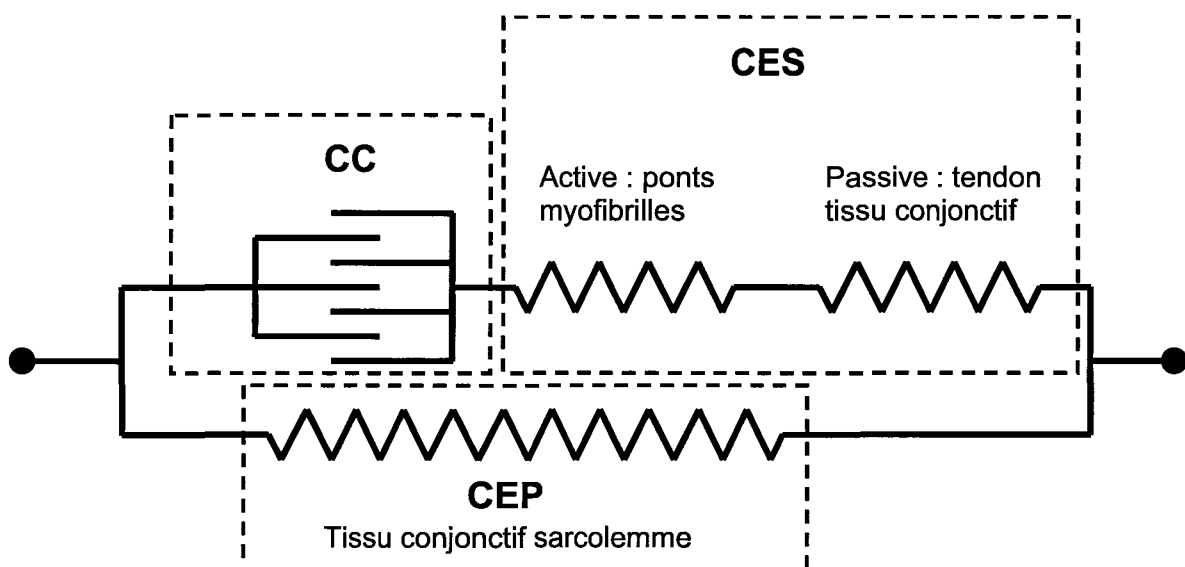
Les isoformes de collagène présents dans un muscle sont hautement corrélés avec la raideur de ce même muscle (Kovanen et coll. 1984). La raideur est l'inverse de l'élasticité (ou compliance) musculaire. Les isoformes de collagènes de type I et III sont les principaux isoformes présents dans le muscle strié squelettique. Le collagène de type I est associé à une plus grande raideur musculaire que le collagène de type III qui est plus compliant (Burgeson 1987).

Les proportions des deux isoformes présents dans un muscle sont fonction de plusieurs facteurs dont le phénotype musculaire et le patron (pattern en anglais) d'activité du

muscle, qui peut être phasique ou tonique. Le collagène de type I est associé avec les fibres musculaires de type I et un patron d'activité tonique. Le collagène de type III est associé avec les fibres musculaires de type II et un patron d'activité phasique (Burgeson 1987, Kovanen 1980, 1984). De plus, Petit et coll. (1990) ont montré que les fibres musculaires de type I sont plus raides que les fibres musculaires de type II. Donc les isoformes de collagène les plus compliants sont associés aux types de fibres les plus compliantes et vice versa.

### 3. Le complexe muscle-tendon

La modélisation du complexe muscle-tendon (**figure 5**) fut introduite par Hill (1938), puis reprise et modifiée par Shorten (1987).



**Figure 5** : Modélisation du complexe muscle-tendon (d'après Shorten 1987).

Un muscle est donc constitué de 3 composantes : i) une composante contractile (CC) qui génère la force et correspond aux ponts actine-myosine des fibres musculaires, ii) une composante élastique série (CES) qui peut être subdivisée en une partie active (ponts actine-myosine) et une partie passive (tendons) et iii) une composante élastique parallèle (CEP) localisée au niveau du sarcolemme, du tissu conjonctif (endomysium, pérимysium, épимysium) et de la titine (protéine de liaison entre la myosine et la strie Z d'un sarcomère). Les propriétés fonctionnelles de ces deux composantes sont différentes. La CES est sollicitée lors de contraction musculaire et a pour rôle de transmettre la force développée par la CC aux articulations. La CEP est mise en jeu lorsqu'un muscle inactivé est étiré. Elle rend compte de l'extensibilité passive des muscles squelettiques, c'est-à-dire de la capacité des muscles à s'étirer sans activation musculaire (Gajdosik 2001, Goubel et Lenseil-Corbeil 1998).

## II L'ORGANE TENDINEUX DE GOLGI (OTG)

La régulation de l'activité musculaire lors de mouvements volontaires ou de mouvements réflexes nécessite pour le système nerveux central d'avoir une vue d'ensemble précise de toutes les actions musculaires. Pour remplir cette fonction, les muscles disposent de deux propriocepteurs, le fuseau neuromusculaire et l'organe tendineux de Golgi. Le fuseau neuromusculaire est spécifique des variations de l'étirement musculaire (longueur et vitesse). L'organe tendineux de Golgi code les variations de tension active du muscle. Dans cette seconde partie, nous nous intéresserons uniquement à ce dernier. Les plupart des études fonctionnelles sur les OTG ont été réalisées chez le Chat. Mais les données ultrastructurales sur les OTG de Rats (Merrillees 1962, Zelena et Soukup 1983) et de Chats (Schoultz et Swett 1972, Sklenska 1973) présentent des similitudes entre les espèces, laissant supposer des fonctionnements similaires.

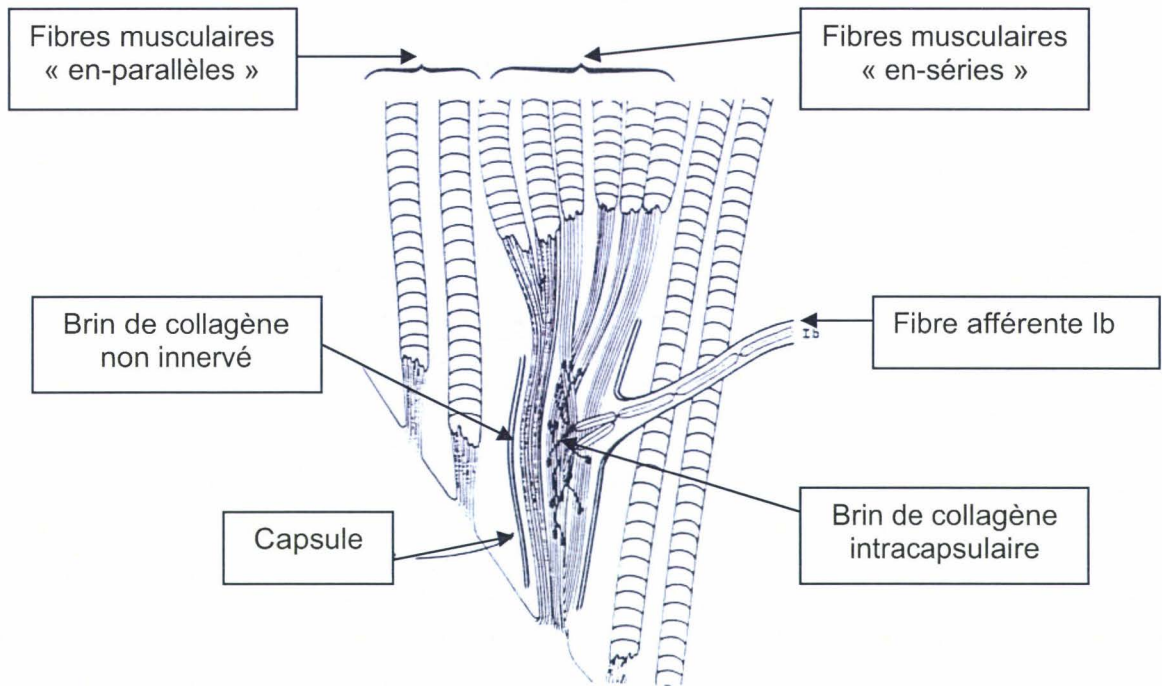
### A. CARACTERISTIQUES DES OTG

#### 1. Emplacement et distribution

Les OTG sont situés à la jonction myo-tendineuse ou à la jonction myo-aponévrotique. Cependant, une faible proportion de la population totale des OTG, 7,6 % d'après l'étude de Pang (cité par Barker 1974), est purement tendineuse. Leur fonction demeure encore inconnue. A l'autre extrémité, ils sont connectés au tendon du muscle ou à l'aponévrose (Regaud 1907). Ils sont donc placés en série avec les fibres musculaires, les autres fibres s'insérant autour sont dites «en-parallèles» (**figure 6**).

Les OTG sont présents dans la plupart des muscles des mammifères (Barker 1962, Devananda et coll. 1983, Goldfinger et Fukami 1982, Merrillees 1962), notamment ceux des membres postérieurs (Schoultz et Swett 1972, Scott et Young 1987, Zelena et Soukup 1983) et il semble qu'il y ait une grande variabilité interindividuelle du nombre d'OTG présents dans un muscle donné (Jami 1992).

Le rapport entre les UM et les OTG semble le plus significatif d'un point de vue fonctionnel que le simple nombre d'OTG d'un muscle. En effet, les OTG contrôlent la contraction des unités motrices, donc plus ce rapport est faible plus la contraction d'une unité motrice est contrôlée par l'activation d'un nombre important d'OTG (Jami 1992).



**Figure 6 :** Représentation schématique d'un OTG et de fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles» (d'après Zelena et Soukup 1983).

Pour l'instant, ce rapport, ajouté au fait qu'il y a entre 5 et 10 fibres musculaires «en-séries» avec un OTG (Spielmann et Stauffer 1986, Zelena et Soukup 1983), permet d'affirmer que chaque UM possède au moins une fibre musculaire en série avec un OTG (Reinking et coll. 1975).

Une seule UM peut activer plusieurs OTG (Jami et Petit 1976a). De plus, les OTG sont activés par des unités motrices des trois différents types, S, FR et FF, établis d'après la classification de Burke et coll. (1973).

## 2. Dimensions, morphologie et structure

La taille des OTG varie pour un même individu en fonction des muscles étudiés (Pang cité par Barker 1974). Il est même possible d'observer des variations de taille dans un même muscle (Scott et Young 1987). Chez le Rat, les OTG mesurent en moyenne 500  $\mu\text{m}$

de longueur et 60  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le muscle soleus de Rat contient en moyenne 16 OTG, sur lesquels viennent s'insérer les tendons de 5 à 10 fibres musculaires (Zelena et Soukup 1983).

La majorité des OTG a une capsule fusiforme, mais une partie de la population des OTG peut être de forme différente avec deux ou trois chefs à l'une ou aux deux extrémités (Pang cité par Barker 1974). Cette configuration a été décrite chez le Rat dans le soleus et dans l'extensor digitorum longus (Soukup 1983).

La composante principale de l'OTG est une tresse allongée de brins de collagène attachés à l'extrémité d'un tendon de fibres musculaires (Zelena et Soukup 1983), cette disposition est commune avec les faisceaux de collagène composant les tendons. Le corps de l'OTG est enfermé dans une capsule lamellaire qui consiste en 5 couches de lamelles de cellules capsulaires (3 à 12  $\mu\text{m}$ ) (Zelena et Soukup 1983). La capsule est continue avec la gaine périneurale qui innerve l'axone Ib. Elle est composée de 5 à 20 couches concentriques de cellules, laissant aux brins de collagènes, un espace étroit, appelé lumen, (Schoultz et Swett 1972). La capsule serre les brins de collagène. Entre les couches de lamelles, il y a des fibrilles de collagène, des microfibrilles et des capillaires. L'espace intracapsulaire est divisé longitudinalement en compartiments par des lamelles septales provenant des cellules capsulaires internes. Les lamelles septales sont discontinues permettant la communication entre les compartiments. Il y a trois types de compartiments suivant leur contenu ; le compartiment neural, contenant les axones myélinisés et les branches des axones ; le compartiment neuro-tendineux, contenant les brins de collagène et les terminaisons sensorielles non myélinisées ; et le compartiment tendineux, contenant en général peu ou pas d'innervation, et servant d'« ancrage » à la tresse de collagène (Nitatori 1988, Schoultz et Swett 1972, Zelena et Soukup 1983).

## B. L'INNERVATION DE L'OTG

### 1. Innervation sensitive des OTG : la fibre afférente Ib

Chez le Chat, le trajet de la fibre afférente Ib issue des OTG des membres postérieurs, entre dans la moelle épinière et se divise en branches ascendantes et descendantes qui projettent des collatérales sur plusieurs niveaux segmentaires. Les branches ascendantes projettent dans la colonne dorsale jusqu'aux cellules à l'origine de la voie dorsale cérébrospinale (DSCT) de la région lombaire supérieure (Hongo et coll. 1987). Chez le Chat, chaque axone intraspinal donne 5 à 11 branches collatérales séparées de 100 à 2600  $\mu\text{m}$ . Ces branches collatérales se projettent dans la partie la plus ventrale de la corne dorsale jusqu'à leurs arborisations terminales situées dans les lames V, VI et VII (Brown 1981). Dans les segments lombaires supérieurs, de vastes terminaisons ramifiées ont été trouvées dans la colonne de Clarke, mais quelques terminaisons sont présentes jusqu'aux lames VII et VIII. La localisation des différentes lames est détaillée dans la **partie III** (page 45). Les afférences des muscles de la partie proximale des membres postérieurs ont davantage d'arborisations terminales hors de la colonne de Clarke que les afférences des muscles de la partie distale, suggérant une organisation somatotopique des terminaisons des fibres Ib (Hongo et coll. 1987).

### 2. Les stimuli d'activation

La méthodologie que nous avons utilisée a été celle introduite par Hunt et Kuffler (1951) et consiste en l'isolation et en l'enregistrement « in situ » de la décharge de fibre afférente Ib consécutivement à la stimulation d'une UM «en-série». Par souci de clarté, nous ne reporterons dans les parties consacrées à la contraction (**paragraphes 2.1.2., 2.2.**), que les réponses obtenues en conditions isométriques. La majeure partie des données présentées ne concerne que les réponses obtenues suite à une stimulation sur une UM isolée. De même, nous nous sommes focalisés sur les contractions téaniques fusionnées.

## 2.1. Activation sur muscle entier

### 2.1.1. Réponse à l'étirement

Il a longtemps été supposé que l'OTG était un récepteur à l'étirement avec un seuil élevé de détection (Matthews 1933). Il a fallu attendre les études de Houk et Henneman (1967) pour rejeter cette idée.

Les organes tendineux peuvent être réactifs à un étirement passif à l'intérieur des limites physiologiques de la longueur musculaire. D'autres (en nombre moins important), sont spontanément actifs à de courtes longueurs où il n'y a pas de tension passive, c'est-à-dire des longueurs inférieures à la longueur à laquelle le muscle développe sa force maximale isométrique (pour revue Jami 1992).

La conclusion définitive de la non implication des OTG dans la détection des changements de longueurs musculaires a été apportée par l'étude de Houk et coll. (1971). Ces auteurs ont démontré in situ, que les OTG qui réagissaient aux étirements musculaires n'avaient pas de persistance de leur décharge lorsque l'étirement était maintenu pendant une minute comme on aurait pu l'attendre de la part d'un récepteur spécifique de la contraction. De plus, les OTG ayant des décharges de base ne voyaient leur fréquence de décharge augmentée avec l'étirement qu'au-delà des limites physiologiques de longueur musculaire.

### 2.1.2. Réponse à la contraction

Le stimulus spécifique de l'OTG est la contraction musculaire (Houk et Henneman 1967, Jansen et Rudjord 1964). Les réponses des afférences Ib à des contractions actives sont supérieures à celles des tensions passives (étirements) (Stephens et coll., 1975).

La fibre afférente Ib transmet des potentiels d'action (« spike » en anglais) lors de la phase ascendante de la secousse musculaire. Une stimulation téτανique évoque une réponse maintenue des fibres afférentes Ib.

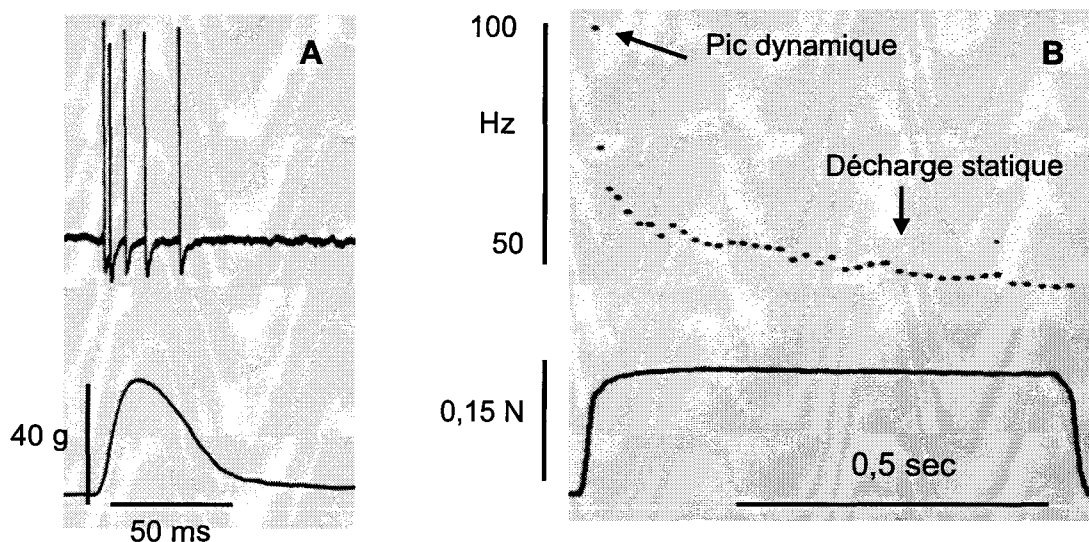
## 2.2. Activation par les unités motrices

### 2.2.1. Activation par une seule UM

De par sa localisation et sa structure, l'OTG est donc un mécanorécepteur sensible à la contraction des fibres musculaires «en-séries». Il a été démontré que la contraction



d'une seule UM, donc que la force développée par une ou deux fibres musculaires «en-séries» constitue un stimulus suffisant pour l'activation d'un OTG (Houk et Henneman 1967, Reinking et coll. 1975, Stauffer et Stephens 1975, Stephens et coll. 1975, Stuart et coll. 1972).



**Figure 7 :** A : Réponse d'une fibre afférente Ib à une secousse musculaire (d'après Gregory et Proske 1979) et B : Réponse à une contraction tétonique d'une UM (d'après Davies et coll. 1995).

Les UM lentes produisent souvent des contractions en secousse développant de faible tension mais qui sont très efficaces pour activer un OTG avec lequel elles ont une ou plusieurs fibres musculaires «en-séries», comme illustré sur la **figure 7A**. Ceci est vrai pour une durée de secousse musculaire plus longue concernant une UM lente par rapport à une UM rapide, mais exprimée en fréquence instantanée, les deux UM activent l'OTG avec des fréquences similaires (Gregory et Proske 1979). Il n'en reste pas moins qu'en terme de potentiels d'action, la contraction de l'UM lente plus faible est mieux signalée au système nerveux central (SNC) que la contraction de l'UM rapide plus puissante.

La fréquence de décharge des OTG dépend de l'UM qui est «en-série» avec lui. Pour les UM dites lentes, la fréquence de fusion du tétonus est plus faible que pour les UM rapides. Cette fréquence de décharge ne dépend donc pas de l'OTG en lui-même, car plusieurs UM de types différents activent un même OTG de façon différente. Lors d'une

contraction tétanique fusionnée d'une UM «en-série», la réponse d'un OTG comporte un pic dynamique lors de la phase ascendante du tétanos et une décharge dite statique lors de la phase de plateau de la force tétanique (*figure 7B*).

La réponse de l'OTG est influencée par une multitude de facteurs. Par exemple, l'orientation des fibres musculaires par rapport au tendon (pennation), la localisation des fibres musculaires «en-parallèles» par rapport à l'OTG, l'insertion de l'OTG et son angle par rapport au tendon ou à l'aponévrose. Il faut également prendre en compte le fait qu'une UM «en-série» comporte des fibres musculaires «en-parallèles» et des fibres musculaires «en-séries». En effet, le rapport entre le nombre de fibres musculaires «en-parallèles» et «en-séries» va influencer la réponse de l'OTG. Un autre facteur intervient, c'est la plus ou moins grande proximité de l'insertion des fibres musculaires «en-parallèles» par rapport à l'OTG qui vont influencer sur le phénomène d'« unloading », que nous définirons dans la *partie 2.4*. Ces nombreux facteurs peuvent expliquer les différents seuils d'activation d'un même OTG par différentes UM (Jami et Petit 1976a, Stuart et coll. 1972). Ils peuvent aussi expliquer pourquoi la réponse de l'OTG est plus élevée pour la contraction d'une seule UM «en-série» (Binder 1981, Houk et Henneman 1967, Jami et Petit 1976b, Stauffer et Stephens 1975, Stuart et coll. 1972) que pour la contraction du muscle entier (Alnaes 1967, Jansen et Rudjord 1964).

Cette multitude de facteurs explique aussi les réponses très disparates qui peuvent être observées dans les réponses des OTG (Jami et Petit 1976a). L'absence de relation simple entre fréquence de décharge de l'OTG et force mesurée au niveau du tendon rend difficile l'interprétation des résultats des études « in situ » réalisées sur l'OTG. Il est possible de parler indirectement de la décharge de l'OTG en la ramenant aux paramètres musculaires mesurés correspondants comme la vitesse d'établissement de la contraction ou encore la valeur absolue de la force. Ainsi, on obtient deux sensibilités.

La première est la **sensibilité dynamique** qui est le rapport entre la variation de la fréquence de décharge de l'OTG et la variation de force initiale au cours du même intervalle de temps (Davies et coll. 1995). La sensibilité dynamique possède deux composantes : la composante initiale qui nous intéresse particulièrement puisque sa mesure débute avec le pic dynamique, et la seconde composante qui correspond au rapport entre l'atteinte du plateau tétanique et la décharge. Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement la composante initiale qui sera simplement appelée, par souci de clarté, « sensibilité

dynamique » dans le reste du manuscrit. Ce choix repose sur le fait que cette composante tient réellement compte des variations de force et des paramètres cinétiques de la contraction qui sont modifiés dans notre modèle expérimental. La mesure de la sensibilité dynamique est détaillée dans la **partie Matériel et Méthodes**. La sensibilité dynamique des OTG est très élevée puisqu'ils sont capables de capter les variations de contractions d'une seule UM «en-série» (Horcholle-Bossavit et coll. 1989). Les OTG ont une sensibilité dynamique plus élevée pour les UM «en-séries» lentes, qui développent une force moindre et qui ont des taux de développement de contraction les plus faibles (Davies et coll. 1995).

Le second type de sensibilité est la **sensibilité statique** qui est le rapport de la fréquence de décharge sur la force au moment de la phase de plateau de la contraction tétanique (Petit et coll. 1994). La mesure de la sensibilité statique est détaillée dans la **partie Matériel et Méthodes**. La sensibilité statique est plus élevée lorsque les UM «en-séries» sont plus faibles. Elle aurait pour rôle de refléter le niveau des forces contractiles produites par le muscle.

Ces paramètres sont importants dans l'étude des OTG puisqu'ils permettent de normaliser leurs réponses (Davies et coll. 1995, Petit et coll. 1994) et de comparer les différents couples OTG/UM.

Il a déjà été reporté une activation d'OTG en réponse à la stimulation de MN  $\beta$  (innervant à la fois des fibres musculaires intra et extrafusales) mais uniquement pour des fréquences de stimulation faibles pour lesquelles les fuseaux neuromusculaires ne répondent pas (Emonet-Denand et coll. 1975). En revanche, bien qu'il ait déjà été montré que des fibres musculaires intrafusales pouvaient s'insérer en série avec des OTG (Barker et coll. 1977), il n'a jamais été décrit jusqu'à présent l'allure d'une décharge d'OTG en réponse à la stimulation de MN  $\gamma$  (innervant les fibres musculaires intrafusales).

### 2.2.2. Activation par plusieurs UM

Plusieurs UM activant simultanément un OTG produisent plus de changements dans la décharge que les variations de force développées par une seule UM. De manière générale, il n'y a pas de sommation algébrique des fréquences de décharge d'un même

OTG, comme cela a été décrit concernant la sommation des forces de ces différentes UM «en-séries» (Houk et Henneman 1967). Ce phénomène est en partie expliqué par le fait que deux UM différentes activeraient un même brin de collagène intracapsulaire. Lors de l'activation des deux UM la contrainte au niveau du brin de collagène ne serait donc pas l'addition des deux contraintes séparées. L'absence de sommation des décharges n'est pas toujours vraie pour la composante statique de la décharge alors qu'elle se vérifie toujours pour la réponse dynamique (Jami 1992).

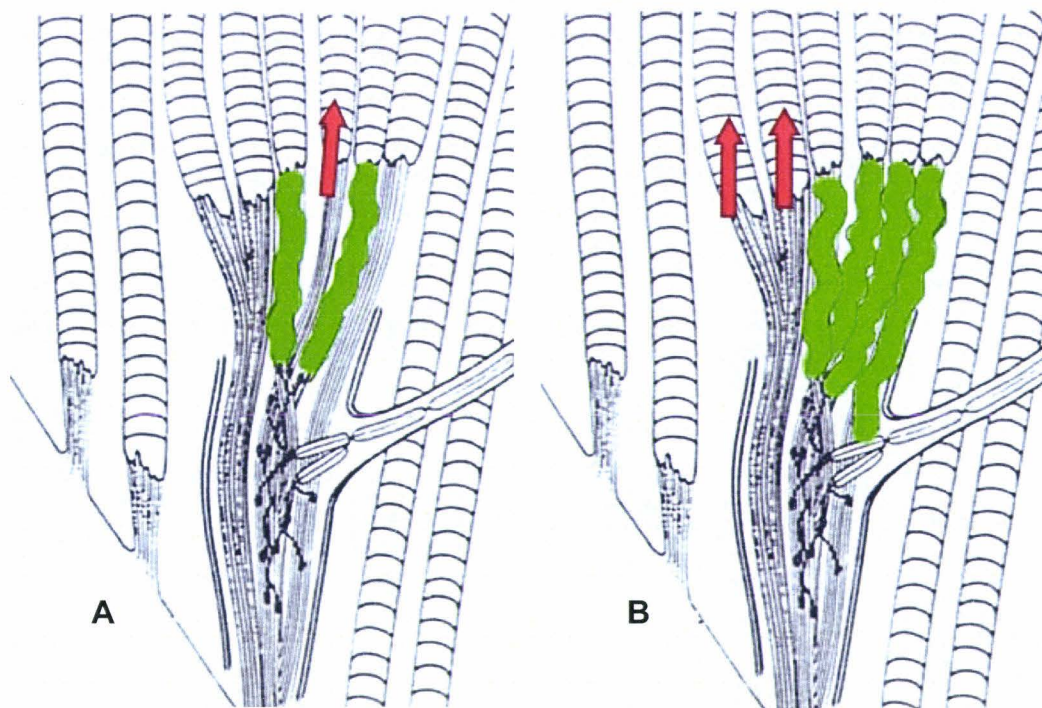
### 2.3. La notion de «champ récepteur»

La population d'UM en rapport avec un OTG forme un «champ récepteur» (Binder 1981, Houk et Henneman 1967). Il est représentatif de la population des UM du muscle (Gregory et Proske 1979, Horcholle-Bossavit et coll. 1990, Jami et coll. 1985, Jami et Petit 1976a, Proske 1981, Reinking et coll. 1975). La taille des «champs récepteurs» est sensiblement la même d'un muscle à l'autre quand elle est exprimée en nombre d'UM. En revanche, ramenée au nombre d'UM total du muscle, on obtient un pourcentage dont la valeur la plus faible montrerait la capacité de l'OTG à contrôler finement l'activité des UM d'une grande partie d'un muscle (Binder et Osborn 1985, Gregory et Proske 1979, Horcholle-Bossavit et coll. 1988, Horcholle-Bossavit et coll. 1989, Jami 1989, Jami et coll. 1985, Jami et Petit 1976a, Proske 1981, Stuart et coll. 1972). Les petites UM lentes activent un voire deux OTG alors que les puissantes UM activent plusieurs OTG. Le nombre d'OTG activé par une UM ne semble pourtant pas être en relation avec la force de l'UM. La raison pour laquelle les grandes UM activent davantage d'OTG ne semble pas connue (Horcholle-Bossavit 1990).

## 2.4. Le phénomène d'«unloading»

Ce phénomène correspond à une diminution de la tension exercée sur le récepteur et se traduit par une diminution de la décharge. Il existe plusieurs types d'effet «unloading» en fonction de leur cause.

### 2.4.1. Effet «unloading» lié aux fibres «en-séries»



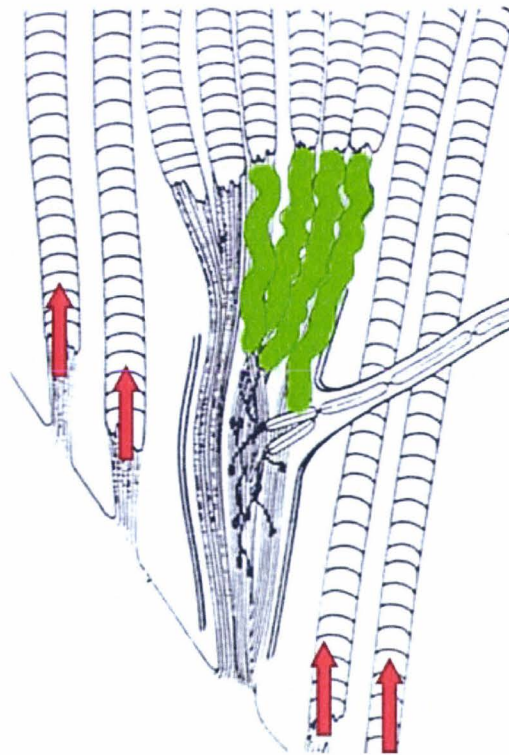
**Figure 8 :** Représentation schématique de 2 possibilités d'effet « unloading » exercé par des fibres musculaires «en-séries». **A :** 2 UM «en-séries» différentes sont activées, la tension de la première (en rouge) diminue la tension (en vert) exercée par la seconde sur l'OTG. **B :** 1 UM «en-séries» est activée, mais elle exerce une tension sur un brin de collagène dépourvu d'innervation ou sur la capsule de l'OTG.

Le recrutement de plusieurs UM «en-séries» déclenche un effet «unloading» et réduit la décharge d'un OTG en dépit de l'augmentation de la force contractile (**figure 8A**). Ainsi, plus une UM délivre de force et moins elle active l'OTG. L'activation de deux UM diminue la décharge de l'OTG. Ceci est montré par une fréquence de décharge plus basse que la fréquence de décharge maximale d'une des deux UM. Cet effet « unloading » peut être le fait de l'UM la plus faible (Horcholle-Bossavit et coll. 1989).



L'« unloading » (**figure 8B**) peut aussi être la conséquence de la contraction d'une UM «en-série» dont une des fibres musculaires qui s'insère sur l'OTG exerce une tension sur la partie externe de la capsule (Spielmann et Stauffer 1986) ou sur un brin de collagène dépourvu de terminaisons nerveuses (Zelena et Soukup 1977).

#### 2.4.2. Effets «unloading» liés aux fibres «en-parallèles»



**Figure 9 :** Représentation schématique de l'effet « unloading » (relâchement en vert) exercé par des fibres musculaires «en-parallèles» (tension en rouge). Ces fibres «en-parallèles» peuvent aussi bien appartenir à des UM «en-parallèles» qu'à des UM «en-séries».

La contraction d'une UM «en-parallèle» diminue la décharge d'un OTG lorsqu'elle se contracte en même temps que l'UM «en-série» qui active l'OTG. La tension exercée par les fibres «en-séries» est diminuée par la tension exercée par les fibres «en-parallèles» (**figure 9**). L'effet «unloading» lié aux fibres «en-parallèles» peut encore se manifester sous la forme d'une interruption de la décharge de base du récepteur lorsqu'il y en a une, suite à

la contraction d'une UM (Houk et Henneman 1967). Les fibres «en-parallèles» provoquant un effet «unloading» peuvent également appartenir à une UM «en-série» (Spielmann et Stauffer 1986).

La signification fonctionnelle de l'«unloading» serait une limitation de décharge de l'ensemble des fibres afférentes Ib lors de la contraction du muscle. De cette façon, le recrutement progressif des UM lors des mouvements naturels n'est pas empêché par l'inhibition autogénique (Horcholle-Bossavit et coll. 1989).

### **3. Naissance du message nerveux afférent**

L'approche électrophysiologique consiste, en l'enregistrement de fibres afférentes Ib isolées issues d'OTG de différents muscles. La confrontation des résultats de cette approche, des données fournies par les études ultrastructurales (Zelena et Soukup 1977, 1983) et des études sur récepteur isolé (Fukami et Wilkinson 1977, Fukami 1980) permet de suggérer le fonctionnement intrinsèque de l'OTG. Par souci de clarté, nous ne décrivons ici que les étapes principales.

L'explication actuellement retenue pour expliquer la naissance du message nerveux afférent, ou transduction, est décomposée en 3 étapes, qui sont les suivantes. C'est la transformation d'un signal mécanique en un signal nerveux. La première étape est mécanique, la force développée est transmise aux terminaisons sensorielles. La seconde étape est la transduction proprement dite : chaque déformation est traduite en un potentiel récepteur. La troisième étape est l'encodage : chaque information contenue dans le potentiel récepteur (pente, amplitude, durée) est transformée en fréquence de décharge.

#### **3.1. Mécanisme de transduction**

La contraction des fibres musculaires disposées «en-séries» avec un OTG produit un stimulus exerçant une contrainte spécifique sur les brins de collagène.

Cette contrainte provoque une déformation des terminaisons sensorielles produisant un changement de conductance de leurs membranes (Fukami et Wilkinson

1977). La naissance du signal intervient dans le compartiment neurotendineux entre les fibres non myélinisées et les filaments de collagène (Fukami et Wilkinson 1977). L'étirement des filaments produit une compression latérale et/ou longitudinale des terminaisons nerveuses. La déformation n'est pas restreinte à ces terminaisons. Les distensions de membrane touchent d'autres ramifications axonales qui reçoivent le volume d'axoplasme chassé des terminaisons compressées.

Ce sont les données structurales qui ont suggéré les hypothèses de l'étape mécanique de transduction (Bridgman 1968, Swett et Schoultz 1975, Zelena et Soukup 1983).

Les propriétés mécaniques des OTG sont définies par le rapport de son diamètre sur sa longueur. Mais d'autres facteurs tels le stress (variation de force) et la contrainte (variation de longueur) interviennent également (Fukami et Wilkinson 1977, Lanir 1978). Les caractéristiques (amplitude et durée) des variations de force reflètent les caractéristiques de la force longitudinale. En revanche, les variations de force latérale sont mal captées par les terminaisons.

Un autre paramètre fonctionnel important est la raideur. En effet le seuil de décharge et sa sensibilité à la force isométrique sont inversement reliés à la raideur de l'OTG. Il existe des variabilités des propriétés mécaniques en condition dynamique. Différents OTG peuvent signaler la même contraction avec différentes décharges, dépendant de la raideur individuelle du récepteur (Bridgman 1970).

### *3.2. Sites d'initiation du potentiel récepteur*

Il y a peu de données sur les mécanismes sous-tendant la génération et la propagation des potentiels récepteurs. Le potentiel récepteur est proportionnel à la durée du changement de longueur. En isométrie, l'amplitude du potentiel récepteur est fonction de la force contractile. Pour des grands étirements, des distorsions apparaissent dans la forme du potentiel récepteur et le gain diminue. Les propriétés mécaniques de la structure peuvent partiellement expliquer dans une certaine limite la baisse de la sensibilité du potentiel récepteur. La sensibilité dynamique apparaît à la seconde étape de la transduction, qui dépendrait de la conductance ionique dans les membranes terminales (Fukami 1980, Fukami et Wilkinson 1977).



### 3.3. Sites de naissance des potentiels d'action ou initiation d'influx

La localisation du site d'initiation de l'influx de l'OTG n'est pas connue. On ne sait pas non plus si il y a un ou plusieurs sites. Le compartiment neural de la capsule contient des fibres myélinisées qui sont des ramifications de la fibre afférente Ib. Les terminaisons sensorielles non myélinisées génèrent et transmettent le potentiel récepteur, tandis que les fibres myélinisées conduisent les potentiels d'action. Théoriquement, la naissance des potentiels d'action à partir du potentiel récepteur doit se produire entre la membrane terminale non myélinisée et la branche myélinisée. La densité mitochondriale importante dans cette zone renforce cette hypothèse (Zelena et Soukup 1977). L'étude de Gregory et Proske (1979) abonde dans ce sens puisqu'elle suggère l'existence de plusieurs sites d'initiation d'influx.

Une autre hypothèse a été avancée : la propagation électrique du potentiel récepteur atteint les branches myélinisées de l'axone Ib, transmettant l'information de toutes les terminaisons à un seul site d'intégration où naîtraient les potentiels d'action (Fukami 1981).

Pour l'instant aucune de ces hypothèses n'a pu être confirmée.

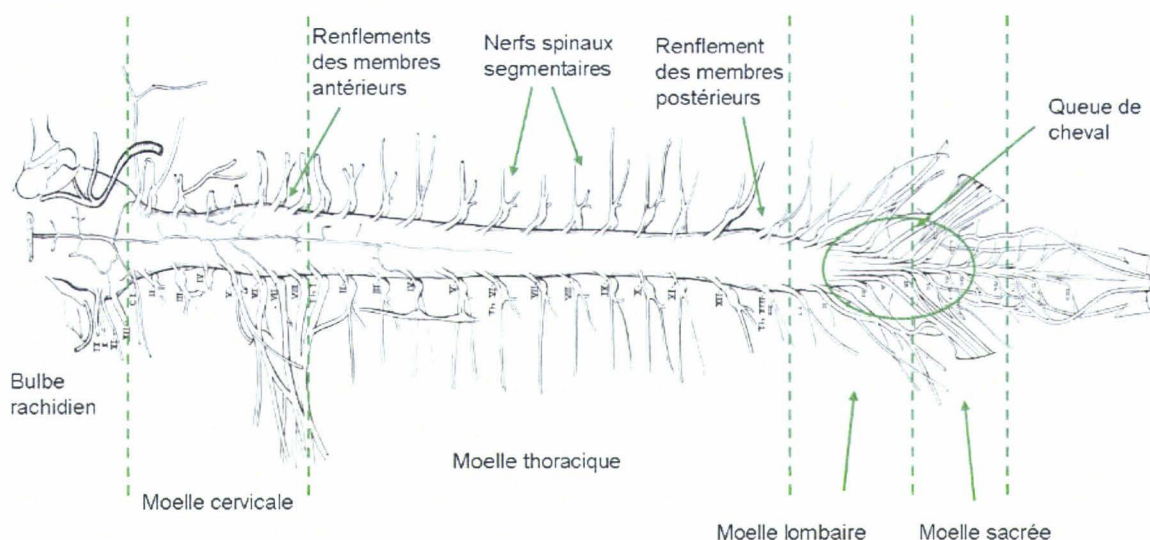
En conclusion, en prenant en considération le nombre d'OTG présent dans un muscle, ajouté au fait qu'il est admis que chaque UM est connectée à un OTG (Jami et Petit 1976a, Reinking et coll. 1975), il est possible de supposer que toutes les contractions de toutes les UM sont transmises au niveau de moelle épinière (Binder et coll. 1977) que nous allons présenter dans la **partie III**.

### III LA MOELLE EPINIÈRE

#### A. DONNEES MORPHOLOGIQUES

##### 1. Description

La moelle épinière établit un lien entre les deux structures hautement plastiques et actives que sont les centres nerveux supérieurs et le système musculaire. Elle est située dans le canal vertébral et s'étend de la première vertèbre cervicale jusqu'au niveau de la deuxième vertèbre lombaire. Colonne vertébrale et moelle épinière sont divisées en régions : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et caudale. Les nerfs périphériques, qui innervent la plus grande partie du corps, sont issus chez le Rat, des 34 paires de nerfs spinaux segmentaires émergeant de la moelle épinière.



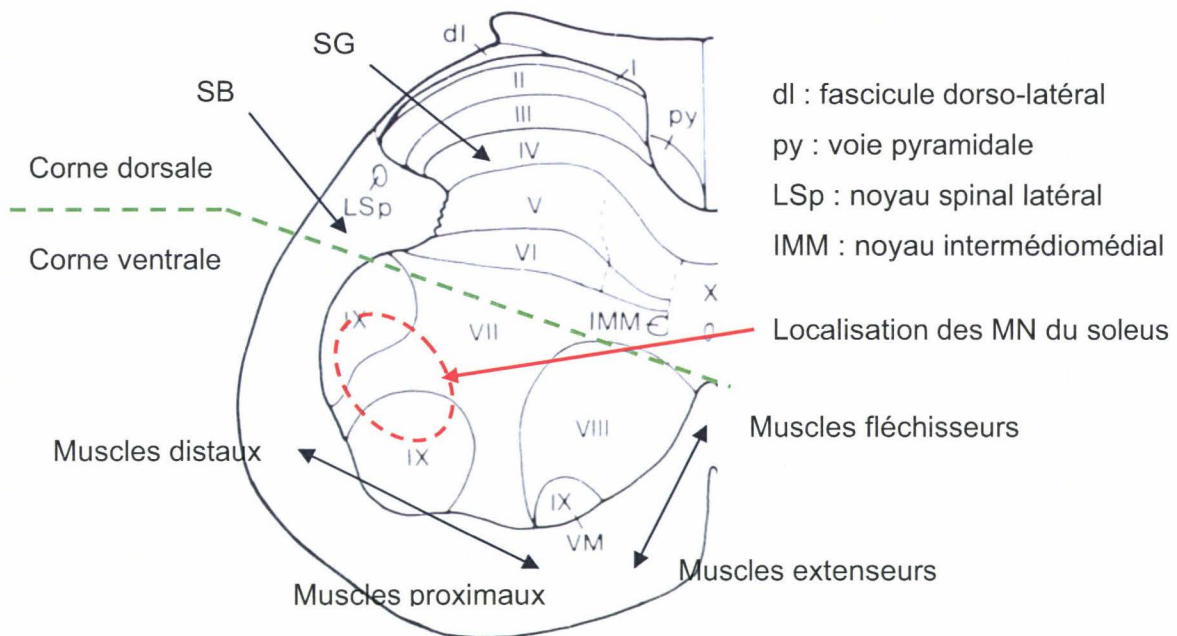
**Figure 10** : Représentation de la moelle épinière de rat (d'après Greene, *The anatomy of the rat*, Hafner éd., 1968).

Les informations sensorielles, qui empruntent les fibres afférentes des nerfs périphériques, entrent dans la moelle par les racines dorsales ; les commandes motrices, qui empruntent les fibres efférentes, quittent la moelle par les racines ventrales. Les racines se rejoignent ensuite et les fibres sensibles et motrices se retrouvent ensemble dans les nerfs

segmentaires spinaux. Les nerfs segmentaires quittent le canal vertébral par le foramen (trou), situé à côté du corps vertébral de même numéro. La région cervicale de la moelle donne naissance à 8 paires de nerfs cervicaux (C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), la région thoracique à 13 paires de nerfs thoraciques (T<sub>1</sub>-T<sub>13</sub>), la région lombaire à 6 paires de nerfs lombaires (L<sub>1</sub>-L<sub>6</sub>), la région sacrée à 4 paires de nerfs sacrés (S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub>) et la région caudale à 3 paires de nerfs caudaux (**figure 10**) (Greene, The anatomy of the Rat, Hafner éd., 1968). La moelle épinière étant nettement plus courte que la colonne vertébrale, les nerfs lombaires et sacrés parcourent quelque distance dans le canal vertébral avant leur émergence ; ils forment, un paquet de filets nerveux auquel on a donné le nom de « queue de cheval ». Deux régions de la moelle présentent un renflement dû au surcroît de cellules nerveuses et de connexions qu'exige le traitement des informations concernant les membres antérieurs ou postérieurs. Aux niveaux des nerfs destinés aux membres antérieurs, cette expansion, appelée renflement cervical, inclut les segments spinaux C<sub>4</sub>-T<sub>1</sub>; au niveau des nerfs destinés aux membres postérieurs, le renflement lombaire inclut les segments T<sub>12</sub>-L<sub>1</sub> (Greene, The anatomy of the Rat, Hafner éd., 1968).

## 2. Lamination de la moelle épinière

La substance grise de la moelle épinière est divisée en dix régions cytoarchitectoniques : lames I à IX et une aire autour du canal central (aire X). Cette classification, illustrée par la **figure 11**, a été établie par Rexed en 1954 chez le Chat et confirmée chez le Rat (Fukuyama 1955, Molander et coll. 1984, 1989). Tout d'abord, les lames I à VI constituent la corne dorsale de la moelle épinière. Ces lames comportent des interneurones et des neurones de projection ascendante qui relaient des informations sensorielles vers les centres supérieurs du système nerveux. Ensuite, la lame VII correspond à la zone intermédiaire de la moelle épinière. Elle reçoit les projections des nerfs associés aux muscles. Enfin, les lames VIII et IX constituent la corne ventrale. Elles sont composées d'interneurones et de MN qui contrôlent les muscles du tronc et des membres. L'aire X entoure le canal central de la moelle épinière. Elle est composée de petites cellules de différentes formes qui se projettent sur le tronc cérébral, l'hypothalamus et le thalamus. Le tissu nerveux est aussi divisé en substance grise (SG) et en substance blanche (SB). La SG contient les voies d'intégration et la SB les voies de conduction et les tissus de soutien.



**Figure 11** : Représentation schématique en coupe transverse de la moelle épinière au niveau segmentaire L<sub>5</sub> (d'après Paxinos, *The rat nervous system*, seconde édition, Academic Press, 1996).

Les MN contrôlant un même muscle sont localisés dans la même zone de la corne ventrale. Les différentes populations de motoneurones sont placées les unes par rapport aux autres suivant une organisation somatotopique. Cette organisation est représentée par les deux axes de la **figure 11** au niveau de la corne ventrale. Ainsi, les MN du soleus sont localisés dans la zone marquée en rouge sur la **figure 11**.



## B. LES NEUROTRANSMETTEURS ET LEURS RECEPTEURS SYNAPTIQUES

### 1. Les acides aminés neurotransmetteurs

Les neurones communiquent entre eux en libérant des substances chimiques appelées neurotransmetteurs. Les principaux neurotransmetteurs régulant l'activité motrice au niveau des corps cellulaires des MN  $\alpha$  sont des acides aminés (Fonnum 1984).

#### 1.1. Les neurotransmetteurs inhibiteurs

Glycine (Gly) ou glycoColle, ou acide  $\alpha$ -amino-acétique. C'est le plus simple des acides aminés. La glycine est l'agoniste du récepteur ionotropique glycine (pour revue Legendre 2001), mais elle a aussi un rôle de neuromodulateur puisqu'elle peut se lier au récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Kleckner et Dingledine 1988).

$\gamma$ -amino butyric acid (GABA). Le GABA est synthétisé à partir d'une décarboxylation du glutamate via la glutamate décarboxylase (GAD), dont il existe deux isoformes encodées par des gènes différents et de poids moléculaire différent. L'isoforme de 67 kDa est prédominant dans la corne ventrale de la moelle épinière par rapport à l'isoforme de 65 kDa (Mackie et coll. 2003). Le GABA est l'agoniste des récepteurs inhibiteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. Le récepteur GABA<sub>A</sub> fait partie de la super famille des récepteurs ionotropiques ligand. Le récepteur GABA<sub>B</sub> fait partie de la famille des récepteurs dont l'action est médiée par une protéine G (Shimizu et coll. 2004). Il est à noter que le GABA et la glycine sont coexprimés dans les neurones de la moelle épinière (Jonas et coll. 1998).

Sérine (Ser) ou acide  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxy-propionique. La sérine est un agoniste du récepteur glycine et son métabolisme est lié au sien (Legendre 2001).

Alanine (Ala) ou acide  $\alpha$ -amino-propionique. C'est l'homologue supérieur de la glycine, c'est-à-dire qu'il possède un groupement carbone en plus, et est donc aussi un agoniste du récepteur glycine (Legendre 2001).

Taurine. La taurine est un agoniste du récepteur glycine (Legendre 2001) et est synthétisée à partir de la décarboxylation de l'acide cystéique.

## 1.2. Les neurotransmetteurs excitateurs

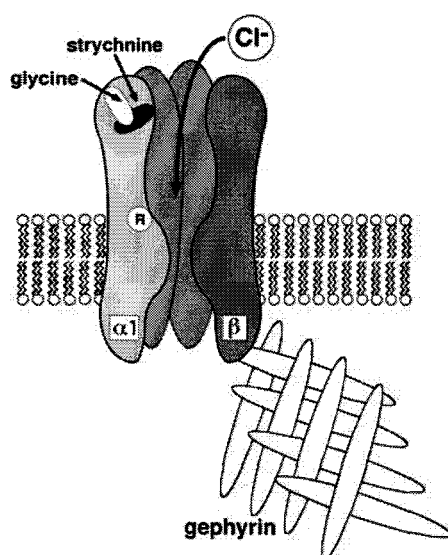
Acide glutamique ou glutamate (Glu) ou acide  $\alpha$ -amino-glutarique. Le glutamate est un agoniste du récepteur ionotropique NMDA mais aussi des récepteurs à l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et kaïnate (Dingledine et coll. 1990a et b, Kalb et coll. 1992). Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du SNC (Johnson 1972).

Acide aspartique ou aspartate (Asp) ou acide amino-succinique. L'aspartate est exclusivement un agoniste du récepteur NMDA (Patneau et Mayer 1990).

Glutamine (Gln). C'est la  $\gamma$ -amide du glutamate, elle est à la fois son précurseur et son métabolite (Balazs et coll. 1970). Bien que la glutamine ne soit pas considérée comme ayant un rôle de neurotransmetteur, elle est néanmoins étroitement liée au métabolisme du glutamate.

## 2. Les récepteurs membranaires des acides aminés neurotransmetteurs présents au niveau post-synaptique

### 2.1. Le récepteur Glycine



**Figure 12** : Récepteur glycine ionotropique, on distingue le site d'action de la glycine sur la sous-unité  $\alpha$  (d'après [www.biochem.uni-erlangen.de](http://www.biochem.uni-erlangen.de)).

### 2.1.1. Structure

Le récepteur ionotropique glycine, illustré par la **figure 12**, est un récepteur pentamérique. Il a été le premier récepteur protéique à être isolé dans un cerveau de mammifère (Pfeiffer et coll. 1982). Il fait partie de la famille des récepteurs canaux ligand. Le récepteur est constitué de deux types de sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement de poids moléculaire 48 kDa et 56 kDa (Langosch et coll. 1988). Le séquençage des deux sous-unités montre qu'elles partagent des similarités dans leur structure primaire (Grenningloh et coll. 1987, 1988). L'assemblage des sous-unités est constant à l'âge adulte, puisqu'il y a systématiquement 3 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\beta$  (Langosch et coll. 1988).

Le site d'action de la glycine se situe sur la sous-unité  $\alpha$ , du côté de la partie N-terminal (Leite et coll. 2000). Il a également pour agoniste la taurine et la  $\beta$ -alanine.

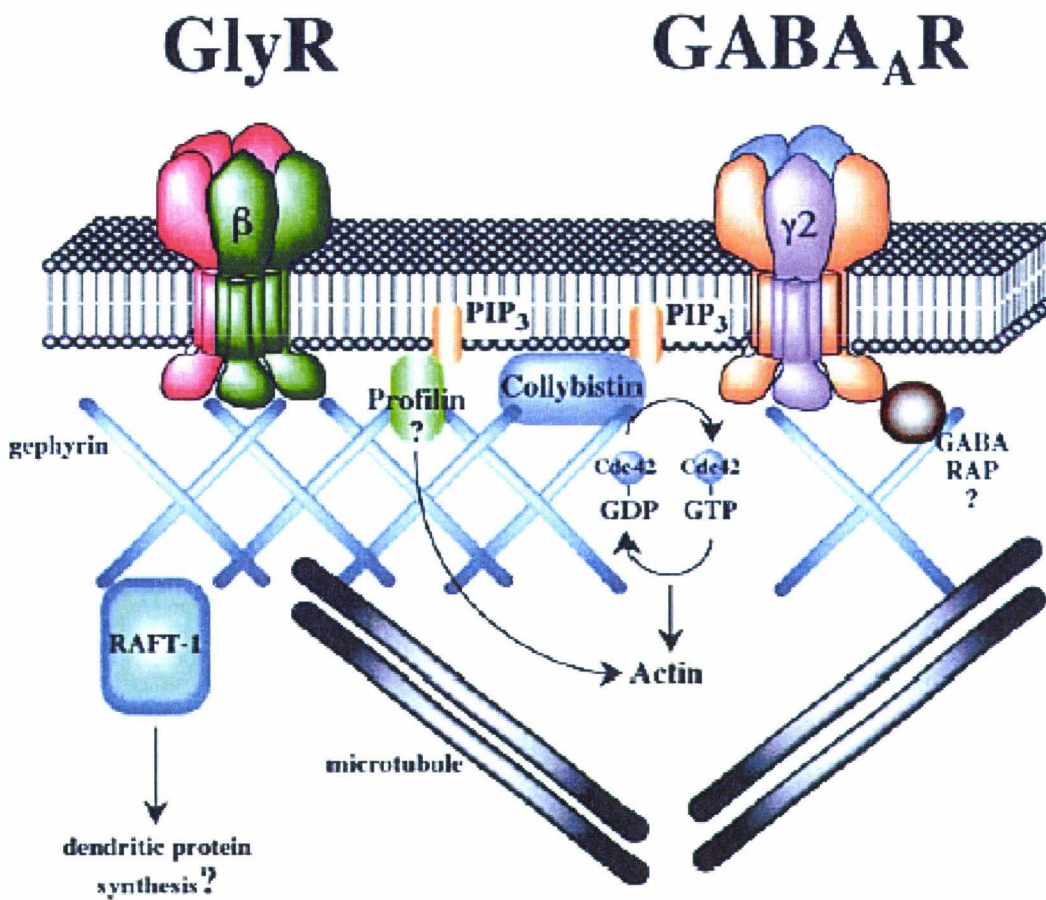
La protéine géphyrin est une protéine de structure de 93 kDa. Elle est spécifique au récepteur glycine et permet son ancrage au cytosquelette, via la sous-unité  $\beta$  (Prior et coll. 1992, Schmitt et coll. 1987). La géphyrin semble nécessaire au clustering. Le clustering est un processus dynamique créant un déplacement des récepteurs canaux membranaires des neurones vers les zones de largage des neurotransmetteurs en fonction de l'affinité neurotransmetteur/récepteur. En effet, chez des souris transgéniques dont le gène codant la géphyrin est éteint, il n'y a aucune formation de cluster au niveau post-synaptique (Feng et coll. 1998, Kirsch et coll. 1993). Cependant, ceci est remis en question, puisqu'il a été montré récemment que le récepteur glycine homomérique, ne contenant donc pas de sous-unité  $\beta$ , pouvait être synaptiquement activé et former des clusters de récepteurs (Legendre 1997, Meier et coll. 2000a et b). Selon ces auteurs, la géphyrin intervient donc dans l'ancrage du récepteur au cytosquelette, mais ne semble pas directement impliquée dans le processus de formation de clusters.

Une autre particularité intéressante de la protéine géphyrin, est qu'elle est également colocalisée avec uniquement le récepteur GABA<sub>A</sub> portant les sous-unités  $\gamma 2$  et  $\gamma 3$  (Baer et coll. 1999, Essrich et coll. 1998, Giustetto et coll. 1998, Kneussel et coll. 1999, Sassoe-Pognetto et coll. 2000, Todd et coll. 1996) comme montré sur la **figure 13**. Ceci implique donc, que les synapses glycinergiques sont souvent également GABAergiques (Jonas et coll. 1998).

D'autres protéines comme la collybistine (Kins et coll. 2000), la profiline (Mammoto et coll. 1998) et RAFT 1 (Sabatini et coll. 1999) participent aussi à la structuration post-synaptique du complexe associé au récepteur glycine. Ces trois protéines interviennent à des niveaux différents dans la régulation de l'agrégation des récepteurs glycine au niveau du cytosquelette.

2.1.2. Fonctionnement

La fixation de la glycine au récepteur entraîne une ouverture du canal qui permet l'entrée des ions chlore ( $\text{Cl}^-$ ), créant une hyperpolarisation inhibitrice du neurone (Legendre 2001). Les autres principaux neurotransmetteurs agonistes, in vitro du récepteur glycine, sont la taurine, l'alanine (Rajendra et coll. 1995), la sérine et le GABA (Legendre 2001). Mais, il n'a jamais été démontré une activation synaptique avec la sérine et l'alanine (Legendre 2001).



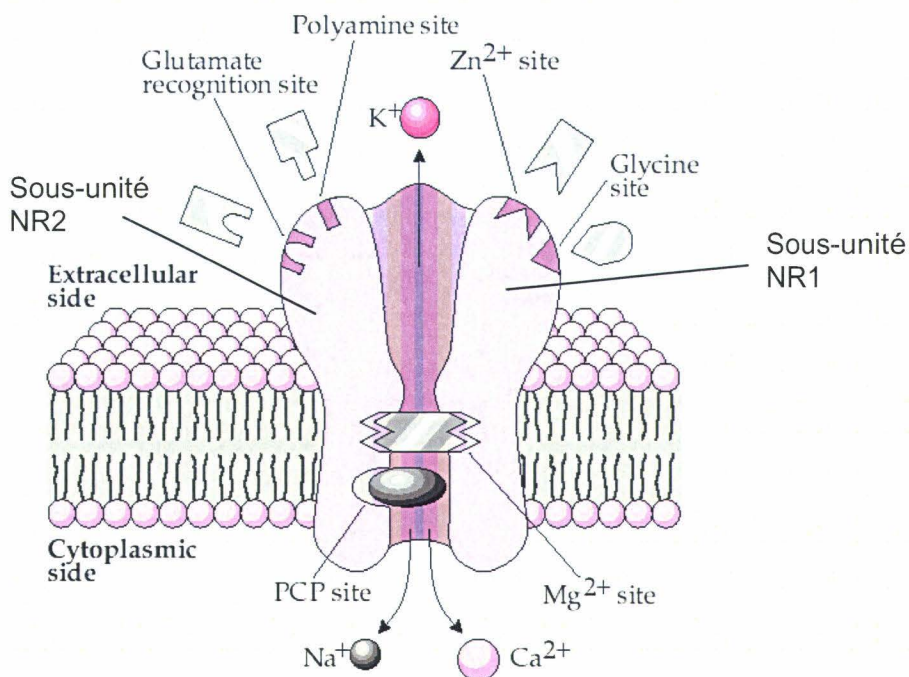
**Figure 13 :** Représentation schématique de la colocalisation des récepteurs glycine et GABA<sub>A</sub> en liaison avec la protéine géphyrin (d'après Legendre 2001).



## 2.2. Le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA)

### 2.2.1. Structure

Le récepteur NMDA est, (**figure 14**), un récepteur ligand ionotropique de structure pentamérique. Il fait partie de la famille des récepteurs canaux et de la famille des récepteurs au glutamate, comme les récepteurs AMPA et kaïnate. Il est composé d'un assemblage hétéro-oligomérique de sous-unités NR1, NR2 et parfois de sous-unités NR3 (pour revue Dingledine et coll.1999). Le site de fixation du glutamate se trouve sur la sous-unité NR2. Il a aussi pour agoniste l'aspartate (Patneau et Mayer 1990). La glycine a également un site de fixation sur la sous-unité NR1 du récepteur NMDA et se révèle donc être un coagoniste du récepteur (Kleckner et Dingledine 1988). L'hypothèse de l'activation par la glycine seule n'a pu être confirmée ou repoussée (pour revue Dingledine et coll.1999). Chaque sous-unité possède plusieurs isoformes (Hollmann et Heinemann 1994) de trois domaines transmembranaires et un segment inclus dans la membrane plasmique. Le récepteur est donc composé de 5 sous-unités qui forment un canal qui peut-être hétérodimérique ou homomérique (Bennet and Dingledine 1995, Hollmann et Heinemann 1994, Nakanishi 1992).



**Figure 14 :** Représentation du récepteur ionotropique NMDA (d'après [www.chemistry.emory.edu](http://www.chemistry.emory.edu)).

Les sous-unités NR1 et NR2A sont les principaux isoformes présents dans les MN de la moelle épinière lombaire de Rat adulte (Marvizon et coll. 2002, Stegenga et Kalb 2001). L'expression de NR2 est un facteur limitant pour un récepteur NMDA fonctionnel (Myers et coll. 1999). En effet, l'ouverture du canal plus importante pour les récepteurs hétéromériques composés d'une sous-unité NR1 et de 4 sous-unités NR2. (pour revue Mori et Mishina 1995). Ainsi, les changements dans la synthèse de NR2A peuvent moduler l'activité du récepteur NMDA (Wood et coll. 1996).

### 2.2.2. Fonctionnement

Les mécanismes intrinsèques de régulation du récepteur NMDA ainsi que le contrôle du diamètre du pore du récepteur sont des processus complexes impliquant la boucle membranaire M2 de la sous-unité NR1, et sont donc sous la dépendance de la glycine (pour revue Dingledine et coll. 1999). Le récepteur NMDA permet l'entrée dans la cellule des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et la sortie des ions potassium ( $\text{K}^+$ ). Il permet surtout l'entrée des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la cellule sous la dépendance du type de sous-unité NR2 (Burnashev et coll. 1995, Stern et coll. 1992). L'entrée massive du  $\text{Ca}^{2+}$  permet à son tour la dépolarisation du neurone. La dépolarisation consécutive à l'ouverture du pore est plus importante avec le glutamate qu'avec le NMDA (pour revue Mori et Mishina 1995). L'ion zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), ainsi que les polyamines sont des modulateurs allostériques du récepteur NMDA, c'est-à-dire que leurs concentrations physiologiques empêchent une sur-activation des récepteurs NMDA, potentiellement nuisibles à la cellule (Hollmann et Heinemann 1994). Les polyamines peuvent également être activatrices (Rock et McDonald 1995). De même, l'ion magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), bloque également le pore du récepteur empêchant l'entrée du calcium et ce, plus efficacement que le  $\text{Zn}^{2+}$  (Mayer et coll. 1989). Un récepteur NMDA fonctionnel nécessite l'assemblage d'une sous-unité NR1, avec le site de fixation de la glycine, et une sous-unité NR2, avec le site de fixation du glutamate (Marvizon et coll. 2002).

## C. LES RESEAUX INFLUENÇANT LES MOTONEURONES

Comme nous l'avons décrit précédemment, les fibres musculaires squelettiques sont, à l'âge adulte, innervées, par un seul motoneurone (MN). Cet ensemble, MN et fibres musculaires, constitue l'unité motrice (UM). Les propriétés des fibres musculaires d'une

même UM sont liées aux messages nerveux envoyés par le MN. Les messages nerveux envoyés par un MN sont fonction de paramètres propres soit au MN (taille du corps cellulaire et diamètre de l'axone), soit au muscle (fonction du muscle). Les propriétés du muscle et du MN sont dépendantes des différentes influences des réseaux neuronaux eux-mêmes influencés par l'environnement extérieur.

Ces variations se manifestent par des informations de deux origines. La première origine possible, est périphérique et provient directement des différents récepteurs périphériques de l'organisme. Ces informations sont véhiculées par des fibres sensibles caractérisées par des vitesses de conduction différentes. La seconde source d'information est d'origine centrale et provient des aires corticales et des structures cérébrales dédiées au maintien de la posture et à l'organisation de la locomotion et des mouvements. Ces informations influencent des réseaux neuronaux, qui influent à leur tour sur les MN. La transmission des informations d'un neurone à un autre est permise par les neurotransmetteurs.

Au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière, d'une façon générale, les deux principaux neurotransmetteurs excitateurs sont le glutamate et l'aspartate (et les molécules qui leurs sont liées). Les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs sont la glycine et le GABA (et les molécules qui leurs sont liées) (Hirayama et coll. 1990). Ceci implique donc qu'une voie désignée comme étant GABAergique ou glycinergique présente une affinité avec trois autres neurotransmetteurs inhibiteurs, la sérine, l'alanine et la taurine. Cette affinité est cependant moindre.

## 1. Les influences périphériques agissant sur les motoneurones

La plupart des études citées ci-après ont été réalisées chez le Chat. Ces données sont applicables au Rat puisqu'il a été décrit une organisation similaire au niveau de la moelle épinière entre ces deux espèces (Riddell et Hadian 1998).

### 1.1. *Circuits spinaux la*

Les fibres la sont issues des fuseaux neuromusculaires. Les terminaisons la possèdent une sensibilité dynamique, elles signalent donc les changements de longueur musculaire ainsi que les vitesses de ces changements de longueur (Gioux et coll. 1991). L'action excitatrice qui s'en suit au niveau médullaire est appelée potentiel post-synaptique excitateur (P.P.S.E.). Les liaisons excitatrices liant les fibres afférentes la et les MN, sont très largement dépendantes de l'activité des neurotransmetteurs et des récepteurs qui leurs sont liés. Chez le Rat, Peshori et coll. (1998) ont en effet montré, que la liaison des afférences la avec les MN était complètement facilitée ou diminuée par l'utilisation de deux composés respectivement antagoniste et agoniste du récepteur GABA<sub>B</sub>. Ceci suppose donc que les neurotransmetteurs GABA et glycine sont efficaces dans les liaisons des afférences la et des MN.

Les projections des fibres la sont de plusieurs types. Elles peuvent s'exercer monosynaptiquement sur les MN homonymes et hétéronymes (Eccles et coll. 1957a, Eccles et Lundberg 1958, Fritz et coll. 1978, Laporte et Lloyd 1952, Lloyd 1943, Lloyd 1946, Willis et coll. 1966).

Les afférences la peuvent également exciter les MN  $\alpha$  par des voies plus longues dites polysynaptiques (di- ou trisynaptiques) (Hultborn et Wigström 1980, Jankowska et coll. 1981, Schomburg et Berhends 1978, Watt et coll. 1976). Les interneurons de cette voie polysynaptique segmentaire intègrent à la fois des afférences cutanées inhibitrices et des voies descendantes sérotoninergiques activatrices de l'excitation polysynaptique la (Hultborn et coll. 1975, Hultborn et Wigström 1980). Jankowska et coll. (1981) ont montré que les MN étaient excités polysynaptiquement, non seulement par les fibres la, mais aussi par les fibres lb. Ces auteurs ont suggéré une convergence des deux catégories de fibres sur des interneurons communs. Les interneurons influencés par les fibres la et lb semblent aussi largement dépendre de l'action de la noradrénaline et de la sérotonine (Jankowska et coll.

2000). En effet, l'action des différentes populations d'interneurones est facilitée dans la zone intermédiaire (parties des lames VI et VII) lors de l'application de ces deux monoamines, alors que dans la corne dorsale leur action est inhibée par l'application de ces deux monoamines. Ceci permet de supposer des rôles fonctionnels différents parmi les populations d'interneurones qui reçoivent des informations des afférences primaires.

Il existe cependant des boucles de rétrocontrôle des voies excitatrices Ia, en effet l'action synaptique des terminaisons des fibres Ia peut être diminuée par l'inhibition pré-synaptique avant d'atteindre les MN (Eccles et coll. 1962). Cette inhibition s'exerce au niveau de synapses axo-axoniques, et s'accompagne d'une diminution des P.P.S.E. évoqués par les fibres Ia. Elle est attribuée à la diminution de la quantité de neurotransmetteurs excitateurs libérée au niveau pré-synaptique à la suite de leur dépolarisation par les synapses axo-axoniques inhibitrices. La dépolarisation des terminaisons des fibres Ia est connue sous le nom de PAD (Primary Afferent Depolarisation) (Schmidt 1971). Cette PAD semble largement dépendante du GABA (Enriquez-Denton et coll. 2004).

Les fibres Ia ont également une action inhibitrice. Cette action inhibitrice est appelée inhibition réciproque Ia des muscles antagonistes. Les fibres Ia, qui excitent les MN  $\alpha$  homonymes et synergistes, ont des projections inhibitrices sur les MN  $\alpha$  des muscles antagonistes (Lloyd 1946). Cette inhibition est disynaptique : elle agit sur les MN par l'intermédiaire d'un interneurone (Eccles et coll. 1956). Elle est régulée par le GABA et la glycine (Peshori et coll. 1998).

### *1.2. Circuits réflexes alimentés par les fibres Ib*

Les fibres Ib ont simultanément une action inhibitrice et une action excitatrice. En effet, la contraction d'un muscle active les fibres Ib qui par voie réflexe déclenche, l'inhibition des MN du muscle se contractant. Ce phénomène, nommé « inhibition autogénique » (Granit 1950) a été attribué aux fibres innervant les organes tendineux de Golgi. Laporte et Lloyd (1952) ont constaté une inhibition, non seulement des MN homonymes, mais aussi des synergistes. Les mêmes fibres sont facilitatrices pour les MN antagonistes. Cependant, il existe des mécanismes capables de diminuer l'inhibition autogénique Ib (Eccles 1964, Lafleur et coll. 1992, Schmidt 1971). Ces mécanismes pourraient contribuer à favoriser le recrutement de nouvelles unités motrices, en particulier pour renforcer la contraction. Ces

deux types de mécanisme d'inhibition sont sous la dépendance de la glycine et du GABA (Lamotte d'Incamps et coll. 1998, 1999).

### *1.3. Circuits réflexes alimentés par les fibres afférentes musculaires du groupe II*

Le groupe des fibres II est constitué principalement par des fibres afférentes fusoriales provenant des FNM. Les interneurons du groupe II sont activés principalement par les afférences du groupe II provenant des muscles extenseurs et fléchisseurs (Edgley et Jankowska 1987a, Fukushima et Kato 1975, Lundberg et coll. 1987a, Yates et coll. 1988, 1989). Ils reçoivent des connexions excitatrices d'autres systèmes afférents comme les fibres afférentes du groupe I (Ia et Ib), les nerfs articulaires, cutanés ou interosseux (Behrends et coll. 1983, Edgley et Jankowska 1987a et b, Kirkwood et coll. 1987, Kniffki et coll. 1981, Lundberg et coll. 1987b). L'action inhibitrice des afférences du groupe II est due à des voies sérotoninergiques (Aggelopoulos et coll. 1996). Du fait d'un lien existant avec les voies sérotoninergiques, les voies aminergiques influencent les afférences du groupe II. Cependant, il faut signaler qu'elles peuvent être également interdépendantes de l'action des voies GABAergiques (Baba et coll. 2000).

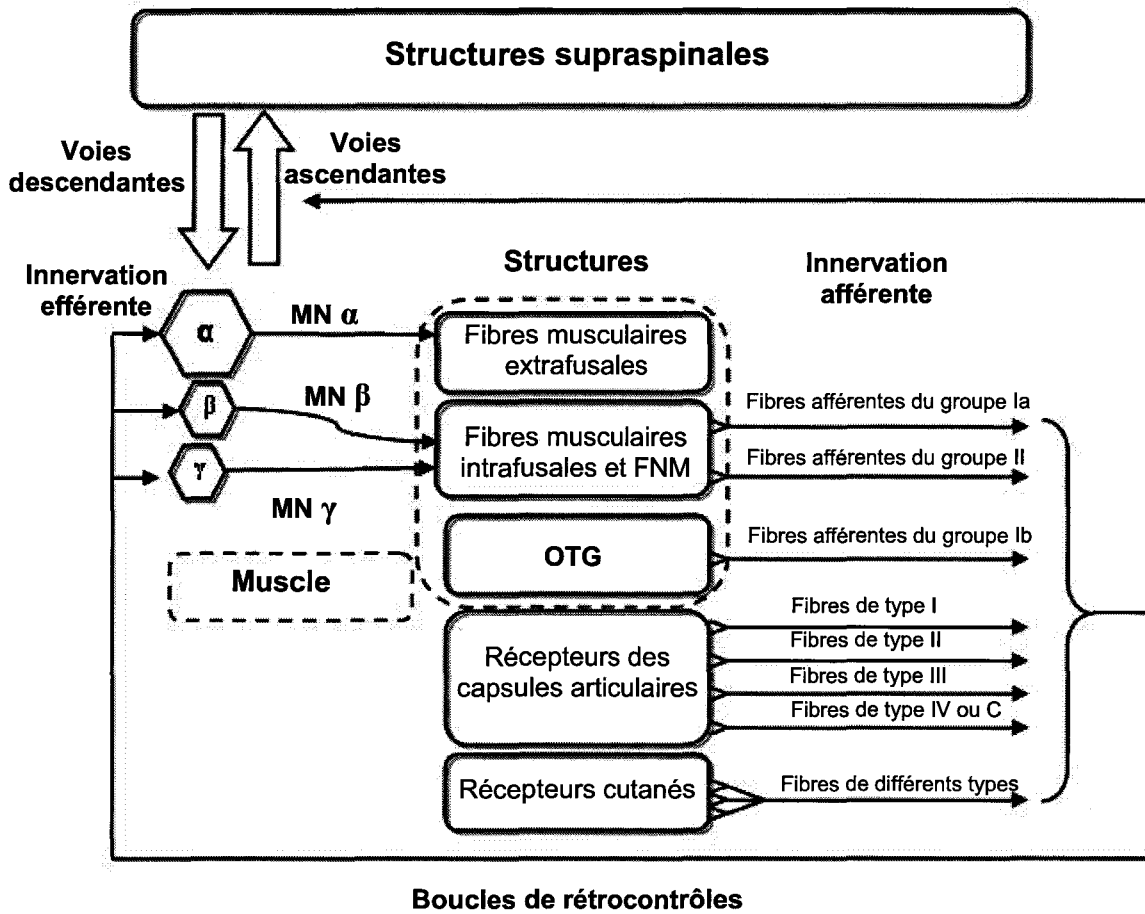
### *1.4. Voies réflexes alimentées par les afférences cutanées, articulaires et musculaires à seuil d'activation moyen et élevé*

Les expérimentations de Perrier et coll. (2000) ont suggéré que les informations issues des mécanorécepteurs des coussinets plantaires de Chat pouvaient agir au travers de plusieurs projections exerçant de larges influences sur les MN des muscles péroniers. Cette action excitatrice serait apparemment modulée, dans ses différentes réponses, par le type d'activité locomotrice dans lequel l'animal est engagé. Ces différentes réponses s'étendent d'un recrutement facilité des MN lors d'efforts soutenus à une inhibition empêchant tout mouvement incontrôlé. Le recrutement facilité des MN est assuré par des voies glutamatergiques (Alvarez et coll. 2004), tandis que l'inhibition est assurée par des voies GABAergiques (Ullström et coll. 1999).

## 2. Les influences supraspinales agissant sur les MN

Les projections corticostriatales influencent les MN ou les réseaux d'interneurones qui eux-mêmes modulent l'activité des MN. En effet, les fibres la peuvent être dépolarisées pré-synaptiquement par des voies descendantes : cortico-, rubro-, vestibulo- et réticulo-spinales (Baldissera et coll. 1981). Le glutamate, étant le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central, est probablement le neurotransmetteur prédominant des projections s'étendant aux voies efférentes de la moelle épinière ventrale (Ottersen 1991, Storm-Mathisen et coll. 1994).

L'ensemble des influences que reçoivent les motoneurones est schématisé par la **figure 15**. Cette figure illustre brièvement les différentes boucles de rétrocontrôle que reçoivent les MN, ainsi que les commandes motrices originaires des centres moteurs supérieurs. Les influences des autres muscles d'un même membre ou d'un autre membre et des autres organes (comme par exemple l'appareil vestibulaire) sont matérialisées dans les voies descendantes ou dans les boucles de rétrocontrôles.



**Figure 15 :** Schéma des différentes influences que peuvent recevoir les motoneurones, adapté d'après Moore (1984).



## **IV. PLASTICITE NEUROMUSCULAIRE**

Le tissu nerveux et le tissu musculaire ne sont pas des structures rigides. Ils s'adaptent au contraire très précisément aux variations de l'environnement interne et/ou externe. Cette adaptation correspond au concept de plasticité neuromusculaire. Dans cette partie, nous n'exposerons que leurs adaptations dans des situations d'hypodynamie-hypokinésie, situation que nous allons définir de façon précise.

### **A. L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE**

#### **1. Définition**

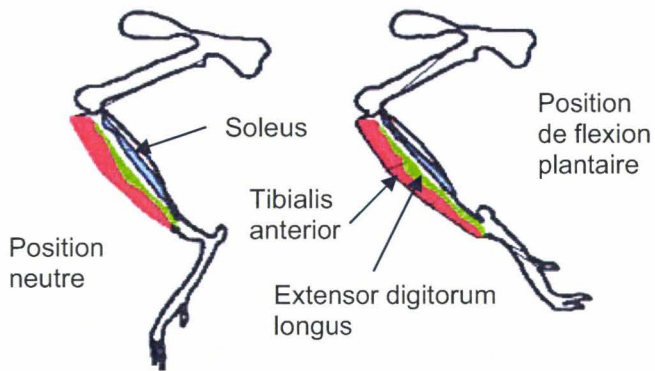
L'hypodynamie-hypokinésie (HH) est définie comme étant une situation caractérisée par une absence de charge corporelle et une réduction de l'activité locomotrice. L'HH est donc un concept plutôt qu'un modèle en particulier.

#### **2. Moyens d'obtention et buts**

Il existe plusieurs modèles pour l'obtention de l'HH. On peut citer les situations médicales d'alitement prolongé ou d'immobilisation ou les vols spatiaux. Suivant ces conditions, les muscles posturaux s'atrophient et/ou voient leurs compositions phénotypiques changées. Il existe plusieurs situations expérimentales, que nous ne développerons pas toutes, pour mimer ces effets. Chez l'Homme, on peut employer la « dry immersion », le « bed rest » (Booth 1994, Droppert 1993, Greenleaf 1984) et le modèle de suspension unilatérale (Tesch et coll. 1991). Chez l'animal, on peut employer la ténotomie (section d'un tendon) (Józsa et coll. 1988), la déafférentation (Picquet et Falempin 2003), la déefférentation (Stevens et coll. 2000), les modèles de traumatismes de la moelle épinière (Tillakaratne et coll. 2000) ou encore le vol parabolique (Leterme et Falempin 1998). On peut également employer l'immobilisation (Nordstrom et coll. 1995) ou encore la suspension des membres postérieurs développée par Morey et coll. (1979). C'est ce dernier modèle que nous utilisons au laboratoire pour étudier les effets de la microgravité simulée sur des durées de 7 à 14 jours sur les tissus nerveux et musculaire.

### 3. Le modèle de Morey

Le protocole d'obtention de ce modèle est détaillé dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Brièvement, le Rat est suspendu par l'appendice caudal, de manière à ce que ses membres postérieurs ne soient plus en contact avec le sol.



**Figure 16 :** *Position des muscles soleus, tibialis anterior et extensor digitorum longus lors de la suspension des membres postérieurs de rat (d'après Shah et coll. 2001).*

En contact avec le sol, les membres postérieurs du Rat sont dans une position où le muscle soleus est étiré. Au moment de la suspension, la position des membres postérieurs devient neutre. Ensuite au cours de la suspension, la position des membres postérieurs évolue vers une position de flexion plantaire (**figure 16**). Le muscle soleus est alors en position raccourcie pendant 80-90 % de la durée de suspension (Riley et coll. 1990).

## B. PLASTICITE MUSCULAIRE

L'appareil musculaire a une composition dépendante de sa fonction qui est elle-même soumise à son activité. Toute modification de cette activité, notamment une diminution, entraîne des transformations des propriétés musculaires. Dans cette partie, nous n'avons retenu que le modèle de Morey comme modèle d'HH. Il sera précisé, lorsque les résultats proviennent d'études utilisant un autre modèle, quel est ce modèle.

## 1. Modifications des structures contractiles en situation d'hypoactivité

La première observation des effets de l'HH est une atrophie musculaire. Les muscles lents extenseurs (soleus, adductor longus, vastus intermedius) sont plus touchés que les muscles fléchisseurs ou extenseurs rapides (tibialis anterior, extensor digitorum longus, gastrocnemius medialis et lateralis, plantaris, vastus lateralis et medialis, rectus femoris) (pour revue Edgerton et Roy 1996). En ce qui concerne le soleus, l'atrophie commence vers le 5<sup>ème</sup> jour de suspension et elle est maximale à 14 jours (46 à 50 %) (Falempin et coll. 1990). L'atrophie observée est associée à une diminution de la surface transversale (CSA) de chaque type de fibre (Ohira et coll. 1992). Cependant, les fibres lentes de type I sont plus affectées que les fibres rapides de type II (Templeton et coll. 1988).

### 1.1. Adaptation du phénotype musculaire

L'HH entraîne une diminution de la proportion de fibres lentes de type I et une augmentation du nombre des fibres rapides de type II et de fibres hybrides rapides et lentes dans le soleus (Desplanches et coll. 1987, Templeton et coll. 1984). En revanche, la typologie des muscles extenseurs et fléchisseurs rapides est peu changée après un épisode d'HH (Roy et coll. 1991). Pour le muscle soleus, il y a donc un complet changement de typologie musculaire au cours de la période d'HH. Ce changement va dans le sens lent vers rapide et se manifeste par des changements d'isoformes de MyHC. Le sens de transformation des isoformes de MyHC est le suivant MyHC I → MyHC IIA → MyHC IIX ou IID → MyHC IIB (Pette et Staron 1997, Talmadge 2000, Talmadge et coll. 1996a). L'HH affecte aussi les protéines régulatrices du filament fin d'actine, les troponines T, C et I, qui expriment alors des isoformes rapides (Bastide et coll. 2002, Campione et coll. 1993, Kischel et coll. 2001, Stevens et coll. 2002). Cette transition est également observée au niveau transcriptionnel. En effet, les ARN messagers de MyHC (Stevens et coll. 1999) et des protéines régulatrices (Bastide et coll. 2002, Campione et coll. 1993, Kischel et coll. 2001, Stevens et coll. 2002) codent préférentiellement pour des isoformes rapides.

## 1.2. Modification des propriétés mécaniques

### 1.2.1. Propriétés mécaniques sur muscle entier

En condition isométrique, la force maximale est directement corrélée à la CSA du muscle (Close 1972). Après une période d'HH, les propriétés mécaniques du muscle soleus sont modifiées. Après 14 jours d'HH, la force maximale développée lors d'une secousse musculaire ( $P_i$ ) et la force maximale tétanique ( $P_0$ ) sont diminuées respectivement de 54 et de 73 %, et sont corrélées à une atrophie musculaire de 41 % (Falempin et In-Albon 1999). A l'inverse après HH, les muscles rapides (gastrocnemius medialis, tibialis anterior et extensor digitorum longus) ne présentent pas de modification de leurs niveaux de force (Fitts et coll. 1986, Winiarski et coll. 1987).

Les paramètres de cinétiques de contraction du soleus (temps de contraction : TC ou TTP et temps de demi-relaxation :  $T_{1/2}R$  ou HRT) mesurés lors d'une secousse musculaire isométrique simple sont diminués et évoluent vers les valeurs d'un muscle rapide (Winiarski et coll. 1987). Il existe un autre indicateur de vitesse de contraction qui est le rapport entre la tension tétanique obtenue à 20 Hz de fréquence de stimulation et la tension tétanique maximale ( $P_0$ ). Ce rapport est de 0,8 pour un muscle lent et de 0,5 pour un muscle rapide. Après une période d'HH, le rapport  $P_{20}/P_0$  pour le soleus diminue pour tendre vers celui d'un muscle rapide (Falempin et coll. 1990, Winiarski et coll. 1987). Liée aux paramètres de cinétiques de contraction, la vitesse de raccourcissement maximale ( $V_{max}$ ) du soleus augmente respectivement de 46 et 124 % après 7 et 14 jours d'HH (Fitts et coll. 1986). Les  $V_{max}$  des muscles rapides sont inchangées après HH (Edgerton et Roy 1996). Schiaffino et Reggiani (1994) ont montré que la  $V_{max}$  était dépendante des isoformes de MyHC et de Myosin Light Chain (MLC) présent dans le muscle. Ces propriétés sont à mettre en relation avec les propriétés mécaniques des UM. En effet, les UM rapides sont plus compliantes que les UM lentes (Buller et Lewis 1965, Petit et coll. 1990).

### 1.2.2. Propriétés mécaniques sur fibres musculaires isolées

Les études sur fibres musculaires isolées et pelées, donc débarrassées de leur sarcolemme, montrent une augmentation des seuils d'activation calcique après HH (Stevens et coll. 1990, 1993). Les cinétiques de largage et de recapture du calcium par les fibres isolées du soleus sont significativement diminuées après 14 jours d'HH et se rapprochent de celles d'un muscle rapide (Peters et coll. 1999, Stevens et Mounier 1992). Donc, après HH, les fibres isolées de soleus ont des caractéristiques proches des fibres rapides. De plus, l'étude des fibres musculaires isolées a également permis de montrer une diminution de la

composante élastique parallèle (CEP) sans variation de l'expression de la titine (Toursel et coll. 2002). On peut donc en conclure qu'après HH, les fibres musculaires sont moins raides.

### *1.3. Hétérogénéisation des UM*

En condition normale, toutes les fibres musculaires d'une même UM ont les mêmes caractéristiques (Edström et Kugelberg 1968, Kugelberg 1976). Dans le soleus de Rat témoin, la proportion des UM lentes est de 82 %. Elles sont composées de fibres musculaires de type I. Les 18 % restant correspondent aux UM rapides, qui sont composées de fibres musculaires de type I, IIA et IIC. Après 14 jours d'HH, il y a apparition d'UM intermédiaires (38 %), les UM lentes représentent 24 % et les UM rapides 38 %. En plus du changement phénotypique, il est intéressant de noter que toutes les UM deviennent hétérogènes dans leur composition (Picquet et coll. 2000). Les UM lentes sont composées de 95 % de fibres de type I et 5 % de fibres de type IIC, les UM intermédiaires de 87 % de type I, 10 % de type IIC et 3 % de type IIA, et les UM rapides de 16 % de type I, 8 % de type IIC et 76 % de type IIA.

### *1.4. Modification de l'activité électromyographique (EMG)*

L'enregistrement EMG au cours de l'HH montre une diminution immédiate de l'activité EMG. Cette diminution intervient aussi bien en microgravité réelle (vol parabolique) (Leterme et Falempin 1998) qu'au cours de la suspension des membres postérieurs (Alford et coll. 1987). L'activité EMG de Rats soumis à 14 jours d'HH, présente un profil de muscle phasique avec des bouffées d'EMG (Blewett et Elder 1993, Riley et coll. 1990) et a tendance à revenir à des valeurs pré-suspension au bout de 7 jours de suspension (Alford et coll. 1987, Kawano et coll. 2004).

Les muscles solei de Rats soumis à un épisode d'HH voient donc leurs caractéristiques fonctionnelles, mécaniques et biochimiques de muscle lent et postural évoluer vers des caractéristiques de muscle rapide et phasique.

## **2. Modifications de la jonction myo-tendineuse et du tendon en situation d'HH**

### *2.1. Changement des isoformes de collagène*

La quantité globale de collagène du soleus n'est pas altérée par deux semaines d'HH. En revanche, la proportion relative de collagène de type I diminue. Cette diminution est liée à l'augmentation de la proportion de collagène de type III (Miller et coll. 2001). Ces auteurs n'ont pas noté de modification semblable pour le muscle plantaris. Les changements d'isoformes sont liés aux changements de phénotype des fibres musculaires, le collagène de type I est lié aux fibres musculaires de type I et le collagène de type III est lié aux fibres musculaires de type II (Miller et coll. 2001).

### *2.2. Changements structuraux de la jonction myo-tendineuse (JMT)*

La suspension des membres postérieurs de Rat, durant 18 jours, induit un allongement et un affinement des invaginations de la JMT du soleus alors que celle du plantaris n'est que peu affectée. Les modifications de la structure de la JMT d'un muscle en condition d'HH sont corrélées aux modifications que subissent les muscles posturaux, comme le soleus, par rapport à l'absence de modifications des muscles phasiques (plantaris). En effet, les muscles posturaux comme le soleus voient leur JMT devenir moins dense en terme d'invaginations et donc d'une structure moins résistante (Zamora et coll. 1995).

### *2.3. Changements des propriétés mécaniques tendineuses*

Le collagène de type I est présent en majorité dans les muscles lents qui interviennent dans le maintien de la posture (Kovanen et coll. 1984). Comme nous l'avons vu précédemment (partie complexe muscle-tendon), la transmission de la force est fonction des caractéristiques des composantes élastiques. Canon et Goubel (1995) ont observé une diminution de la raideur musculaire globale. Ils attribuent cette diminution aux fractions active et passive de la composante élastique série (CES). L'augmentation de l'élasticité de la fraction active de la CES est directement liée au phénotype musculaire et aux propriétés des fibres musculaires. Elle est directement à mettre en relation avec les changements

phénotypique de collagène observés par Miller et coll. (2001). L'augmentation de l'élasticité musculaire après HH est aussi due à la transition phénotypique des fibres lentes en fibres rapides, puisque les fibres rapides sont plus compliantes (Buller et Lewis 1965, Petit et coll. 1990).

## C. PLASTICITE DES AFFERENCES

Lors de l'hypodynamie-hypokinésie, il y a une diminution des flux d'informations afférentes musculaires (Kawano et coll. 2002, 2004). Les réseaux neuronaux qui reçoivent ces messages nerveux (*partie III*) vont vraisemblablement à leur tour voir leurs propriétés modifiées.

### 1. Modifications des afférences musculaires et propriétés des récepteurs musculaires

#### 1.1. Les fuseaux neuromusculaires (FNM)

A notre connaissance, une seule étude, réalisée dans le laboratoire, a apporté des informations sur les modifications électrophysiologiques des afférences Ia et II isolées de Rats soumis à 14 jours d'HH (De-Doncker et coll. 2003). Ces auteurs ont montré une augmentation des réponses des FNM lors d'étirements en rampes et sinusoïdaux. Dans une autre étude, ils ont décrit des changements d'expression des isoformes de MyHC I, slow-tonic et  $\alpha$ -cardiac au niveau des fibres intrafusales à sacs nucléaires (De-Doncker et coll. 2002).

Rosant et Pérot (2005) ont mis au point une méthode originale de quantification des afférences fusoriales totales du soleus par rapport à sa raideur musculaire. Le rapport normalisé obtenu est linéaire. Pour des amplitudes d'étirements plus faibles que ceux de l'étude de De-Doncker et coll. (2003), ces auteurs notent une augmentation des sensibilités statique et dynamique après HH.

L'immobilisation d'un membre a des effets sur les FNM. En effet, sur le muscle peroneus longus de Chat, immobilisé en position raccourcie, il a été observé une augmentation des sensibilités statiques et dynamiques des FNM (Gioux et Petit 1993). Ces variations sont à mettre en relation avec les diminutions de force tétanique des UM dans les mêmes conditions (Petit et Gioux 1993). Dans une autre étude, réalisée sur le tibialis anterior

de Chat immobilisé en position raccourcie, il a été montré une diminution de CSA de tous les types de fibres musculaires sans noter de changement dans la typologie du muscle (Nordstrom et al. 1995). En revanche, les auteurs n'ont relevé qu'une augmentation de l'index dynamique des afférences du groupe II.

Les muscles immobilisés ou ayant subi une ténotomie, présentent une augmentation des CSA des fibres musculaires intrafusales pendant la première semaine de traitement puis une diminution au cours des deux semaines suivantes. L'espace périaxial diminue au bout de deux semaines de traitement, de manière concomitante de l'augmentation de la capsule (Józsa et coll. 1988).

## 1.2. Les OTG

Józsa et coll. (1988), dans leur étude sur les mécanorécepteurs des muscles immobilisés ou ayant subi une ténotomie, ont montré un épaississement de la capsule de l'OTG lié à une diminution de l'espace intracapsulaire.

L'étude de Nordstrom et coll. (1995), réalisée sur le tibialis anterior de Chat immobilisé en position raccourcie, a montré que l'OTG était moins sensible à la contraction des UM «en-séries». D'après les auteurs, ce résultat est lié à une diminution de la CSA de tous les types de fibres musculaires et de la force tétanique maximale, ainsi qu'à une dénervation fonctionnelle de certaines UM.

A notre connaissance, il n'existe **aucune étude traitant des effets de la suspension des membres postérieurs de Rat sur les caractéristiques de décharge des OTG**. Comme pour les FNM, il existe cependant un certain nombre d'indices laissant supposer que l'hypodynamie-hypokinésie affecte les OTG. En effet, les OTG sont sensibles à la raideur musculaire, cette dernière diminuant après HH. Ils sont également dépendants des paramètres mécaniques de la contraction, qui sont eux aussi modifiés après HH. Enfin, ils sont dépendants pour une même UM «en-série» des caractéristiques des fibres musculaires «en-parallèles» et «en-séries», lesquelles sont changées après HH avec l'hétérogénéisation des UM.



## **2. Modifications de l'activité des afférences et des efférences**

L'enregistrement du neurogramme des racines ventrales et dorsales L<sub>5</sub>, au cours de vols paraboliques (microgravité réelle, Kawano et coll. 2002) et au cours de la suspension des membres postérieurs (microgravité simulée, Kawano et coll. 2004), a montré des diminutions instantanées des messages afférents et efférents en même temps que la diminution de l'activité EMG du soleus. Les neurogrammes afférent et efférent enregistrés au niveau des racines L<sub>5</sub>, correspondent aux muscles soleus, extensor digitorum longus (EDL) et gastrocnémus (latéral et médian). Au niveau des racines L<sub>4</sub>, on peut enregistrer l'activité des muscles tibialis anterior (TA) et plantaris. Au cours de 14 jours de suspension, le neurogramme afférent L<sub>5</sub> et l'EMG évoluent de manière similaire, c'est-à-dire qu'ils restent faibles du début de la suspension jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour, instant à partir duquel, les deux activités augmentent pour retrouver leurs valeurs pré-suspension au bout de 14 jours (Kawano et coll. 2004). Le neurogramme afférent enregistré au niveau de la racine dorsale L<sub>5</sub> est principalement lié avec l'activité du soleus. Le neurogramme efférent suit la même évolution que le neurogramme afférent au cours des 14 jours de suspension, mais son activité ne semble pas uniquement liée à celle du soleus. On observe donc une cinétique d'activité au cours de 14 jours de suspension qui va d'une diminution soudaine de l'activité à une tendance progressive à retourner à la normale au cours des 2 semaines de suspension.

## **D. PLASTICITE DE LA MOELLE EPINIÈRE**

### **1. Les modifications de la moelle épinière dues aux modifications environnementales**

Après 14 jours de vol en biosatellite (Cosmos-2044), on observe dans les corps cellulaires des MN, au niveau des segments lombaires et cervicaux de la moelle épinière de Rat, une diminution du volume du nucléole, du noyau (uniquement au niveau cervical) et du taux d'ARN cytoplasmique (Jiang et coll. 1992, Krasnov 1993). Ces résultats suggèreraient également une hypoactivité des MN de la moelle épinière. Cependant, ces mêmes auteurs ont observé, après 14 jours de suspension, une augmentation des volumes du nucléole, du noyau et du corps cellulaire des MN au niveau cervical. Ces résultats reflèteraient donc une hyperactivité des MN due à l'augmentation d'influx sur les pattes antérieures du Rat pendant la suspension.

Après des vols spatiaux de 14 jours, la taille des MN et l'activité de la SDH ne sont pas modifiées (Ishihara et coll. 1996). Cependant, des MN ayant une surface comprise entre 500 et 800  $\mu\text{m}^2$ , voient l'activité de leur SDH diminuée. Ces auteurs suggèrent que les MN dont la taille et l'activité SDH sont affectées sont en relation avec les muscles affectés par l'apesanteur. En utilisant le modèle de Morey, ils ont observé une diminution de l'activité oxydative (SDH) dans les corps cellulaires des MN liés aux muscles lents, alors que pour les autres MN, il n'y a pas de changement de l'activité oxydative ou de la taille des corps cellulaires (Ishihara et coll. 2002, 2004).

## 2. Les modifications du métabolisme des neurotransmetteurs

Plusieurs études ont montré des variations d'enzymes ou de récepteurs liés à l'activité de ces neurotransmetteurs. Le modèle de traumatisme de la moelle épinière (section de moelle épinière au niveau thoracique bas ou spinal cord injury en anglais) provoque une suppression des messages provenant des structures supraspinales et par conséquent une diminution des messages afférents due à une hypoactivité (Tillakaratne et coll. 2002). Ces auteurs ont étudié les variations de l'enzyme « glutamic acid decarboxylase » ( $\text{GAD}_{67}$ ), l'isoforme prépondérante dans la racine ventrale de l'enzyme de synthèse du GABA à partir du glutamate (Mackie et coll. 2003). Les résultats montrent que la synthèse de GABA est augmentée au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière lorsque les animaux sont spinalisés, donc lorsque les messages afférents sont diminués (Tillakaratne et coll. 2000). L'entraînement forcé à la marche des animaux spinalisés inverse ce processus (Tillakaratne et coll. 2002). Il a également été observé le même phénomène en ce qui concerne la densité des récepteurs glycine. Elle augmente chez les animaux spinalisés (Edgerton et coll. 2001). Plus précisément, l'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine augmente au niveau lombaire avec la section de moelle épinière au niveau thoracique bas (Talmadge et coll. 1996b).

Il n'y a pas seulement une modification du métabolisme des neurotransmetteurs inhibiteurs. L'étude de Panter et coll. (1990) a montré une augmentation des concentrations extracellulaires des acides aminés neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs dans la zone de la lésion de moelle épinière. Liu et coll. (1991) attribuent ces augmentations des excitateurs plus aux changements d'activité neuronale qu'à la lésion en elle-même. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les changements dans la synthèse de NR2A peuvent

moduler l'activité du récepteur NMDA (Wood et coll. 1996). La section de moelle épinière provoque, au niveau ventral, une augmentation de l'activité des récepteurs NR2A deux semaines après la lésion, avec un retour à des valeurs contrôles dans les 18 semaines qui suivent (Croul et coll. 1998).

De plus, l'expression des protéines NR1 et NR2A est plus élevée au niveau lombaire que thoracique de la moelle épinière chez le Rat contrôle. Après une lésion de la moelle épinière au niveau thoracique, l'expression de NR1 n'est pas modifiée ni après 24 heures ni après 1 mois post lésion. L'expression de NR2A n'est modifiée, à proximité de la lésion au niveau caudale qu'après 1 mois post lésion (Grossman et coll. 2000). Ces auteurs suggèrent que l'expression de NR2A est principalement sous la dépendance des influences supraspinales.

Il existe donc un lien direct entre les informations afférentes et efférentes reçues par la moelle épinière et les métabolismes des neurotransmetteurs.

### **3. Modifications du seuil d'excitation des motoneurones**

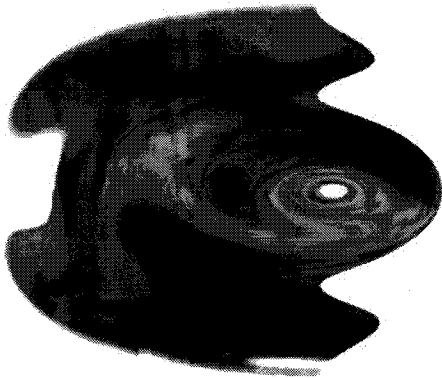
Il n'existe pas d'enregistrement intracellulaire de MN  $\alpha$  après une situation d'HH. En revanche, il existe un moyen indirect de mesurer l'évolution du seuil d'excitabilité des MN. En effet, le réflexe de Hoffmann (ou réflexe H) et l'onde M sont considérés comme des indicateurs indirects de l'excitabilité des MN (pour revue Zehr 2002). Le réflexe H est dépendant du type de fibre majoritaire au sein d'un muscle (Almeida-Silveira et coll. 1996). Le réflexe H est également dépendant de paramètres agissant au niveau médullaire (Morita et coll. 1998) qui ne sont pas musculaires. En effet chez l'Homme, il est réprimé pendant la phase microgravité réelle et augmentée après cette dernière (Nomura et coll. 2001, Reschke et coll. 1986). Chez le Rat soumis à la suspension des membres postérieurs, l'amplitude du réflexe H augmente. Ce phénomène est attribué à une augmentation de la facilitation pré-synaptique des afférences la et/ou à un changement d'excitabilité des MN  $\alpha$  (Anderson et coll. 1999). L'étude de ce réflexe, chez l'Homme comme chez l'animal permet de relier indirectement le moment de force et l'amplitude du réflexe H (Maffiuletti et coll. 2000).

Le réflexe tendineux (ou réflexe T) est obtenu par la vibration appliquée au niveau du tendon. La réponse obtenue, est aussi considérée comme un indicateur indirect de l'excitabilité des MN. La différence avec le réflexe H, est qu'au lieu de recruter directement

les fibres afférentes Ia, la vibration tendineuse va stimuler les FNM. En plus des paramètres synaptiques et du diamètre des motoneurons qui peuvent influencer le réflexe H, le réflexe T est sous la dépendance de la sensibilité des FNM et de l'élasticité de la CES. La diminution de l'amplitude du réflexe T, après un épisode d'HH, aurait pour cause l'augmentation de la compliance de la CES et/ou le changement de sensibilité des FNM (Anderson et coll. 1999).

## **E. PLASTICITE DU CORTEX CEREBRAL**

Chez le Rat, la représentation corticale somesthésique des pattes postérieures diminue après 14 jours d'HH (Langlet et coll. 1999). La proportion des champs récepteurs de petite taille diminue également au profit des champs récepteurs de grande taille. Après 7 jours d'HH, les résultats sont plus complexes. En effet, les résultats sont hétérogènes et la présence de sites non-répondants à la stimulation tactile légère empêche l'établissement de la carte de projection du membre postérieur. Consécutivement à ces travaux, il a été montré après 14 jours d'HH, une diminution du seuil d'excitabilité des neurones corticaux (Dupont et coll. 2003). Ces neurones sont donc plus sensibles à la stimulation tactile. Ce changement est associé à une augmentation de l'amplitude de la réponse des neurones. Ces modifications sont dépendantes de voies cholinergiques (Dupont et coll. 2002). Cependant, une implication des voies GABAergiques dans ces modifications a aussi été suggérée (Dupont et coll. 2003).

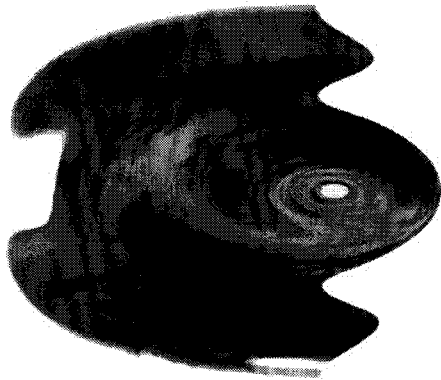


## Position du problème

L'ensemble des connaissances issues des études sur les modèles d'hypodynamie-hypokinésie montre des modifications du tissu musculaire. De manière générale, les muscles posturaux s'atrophient et/ou présentent une modification de leurs phénotypes. Le système musculaire possède donc une grande capacité d'adaptation. Les informations afférentes issues des mécano-récepteurs musculaires jouent un rôle dans la capacité d'adaptation des muscles. Comme nous l'avons vu, les caractéristiques des fuseaux neuromusculaires sont modifiées après une période d'HH. En revanche, il n'y a aucune donnée concernant un changement éventuel des organes tendineux de Golgi (OTG) du muscle soleus de Rat après une période d'HH induite par le modèle de Morey.

La **première partie** des travaux présentés dans ce mémoire concerne donc l'étude des OTG après une période d'HH induite par le modèle de Morey. Notre premier objectif a été d'adapter le dispositif expérimental déjà utilisé pour enregistrer la décharge des fibres afférentes Ia et II isolées, à l'enregistrement de la décharge des fibres afférentes Ib isolées de Rat. Le second objectif a été de comparer les effets de l'HH sur la décharge de ces mêmes fibres afférentes Ib activées par des contractions tétaniques isométriques d'unité motrice «en-séries». Enfin, le troisième objectif de cette première partie a été d'étudier les caractéristiques morphologiques des OTG après HH.

La **seconde partie** des travaux présentés dans ce mémoire est relative à l'étude de la neurotransmission dans la moelle épinière lombaire ventrale après deux périodes d'HH. Une étude (Kawano et coll. 2004) a montré, au cours d'une période d'HH, une évolution similaire et concomitante des neurogrammes afférent et efférent des racines L<sub>5</sub> et de l'activité électromyographique du muscle soleus. Ces données alliées aux modifications des informations afférentes issues des mécanorécepteurs musculaires, aux changements du réflexe H, et à la plasticité du cortex somesthésique suggèrent des modifications de la neurotransmission au niveau médullaire. Notre premier objectif a donc été de comparer les concentrations des acides aminés neurotransmetteurs prédominants au cours de l'HH. Nous avons choisi les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> où sont situés la majorité des corps cellulaires des motoneurones des muscles de la partie distale des membres postérieurs de Rat. Notre second objectif a été de comparer l'expression des protéines des sous-unités des récepteurs de ces neurotransmetteurs après les mêmes périodes d'HH.

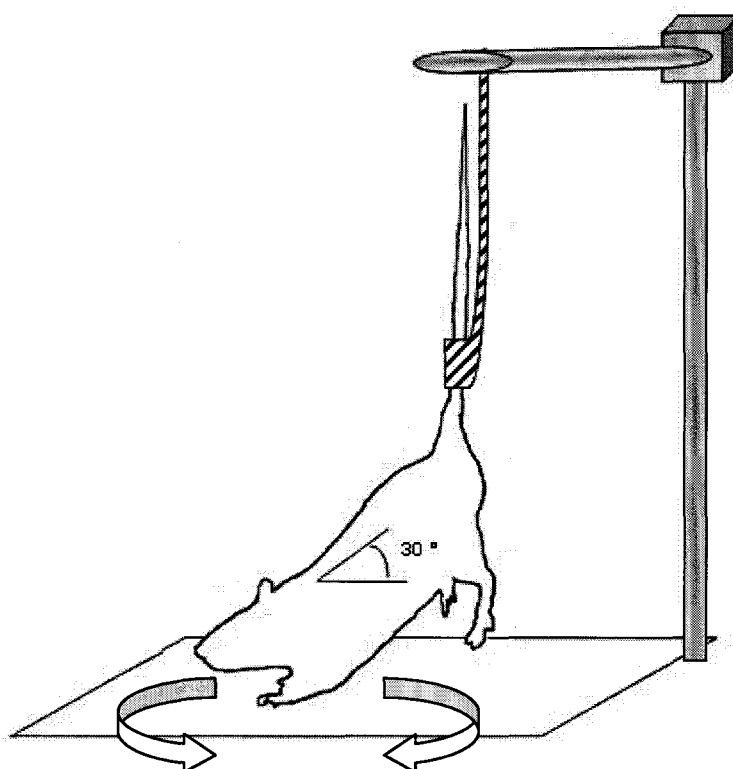


## Matériel et méthodes

Les études sont réalisées sur des rats mâles adultes de souche Wistar (Harlan, Gannat, France). Après leur réception au laboratoire, les animaux sont placés en cage individuelle pour une période d'acclimatation de trois jours. Les rats sont soumis aux mêmes conditions d'éclairage (cycle éclairage/obscurité : 12/12 h), et de température ambiante (23°C). Ils ont accès à l'eau et à la nourriture « ad libitum ». La répartition et le nombre d'animaux utilisés dans les différentes expérimentations sont précisés pour chaque approche expérimentale dans la partie qui lui est consacrée.

Toutes les expérimentations ainsi que les conditions de manipulations des animaux ont reçu les autorisations du Ministère de l'Agriculture et du Ministère de l'Education Nationale (Service Vétérinaire de Santé et de Protection des Animaux, autorisation B 59-00913).

## I. CONDITIONS D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE (HH)



**Figure 17 :** Représentation schématique du modèle de Morey et coll. (1979).

Les conditions d'HH sont obtenues par l'élévation du train postérieur du rat pendant 7 ou 14 jours selon le modèle de Morey et coll. (1979). Ce modèle est représenté sur la



**figure 17.** Le protocole expérimental est le suivant : la queue des rats est lavée à l'eau savonneuse, rincée, séchée, puis passée successivement à l'alcool et à l'éther. Elle est ensuite enduite avec une solution de collodion 4 % (Merck, Darmstadt, Allemagne). Une fois sèche, la queue est entourée sur son tiers proximal d'une bande adhésive hypoallergénique (Elastoplaste) sur laquelle un crochet de suspension est fixé. Ce crochet est raccordé à une potence munie d'un système de rotation sur 360°. La hauteur de la potence est ajustée de manière à ce que l'inclinaison du corps du rat forme un angle de 30° avec l'horizontale. L'inclinaison du rat est vérifiée chaque jour. Dans cette position, les pattes postérieures ne sont plus en contact avec le sol, ce qui induit une absence de charge corporelle (hypodynamie), et une activité motrice réduite (hypokinésie) au niveau des membres postérieurs. Le rat peut se déplacer et avoir accès librement à l'eau et à la nourriture à l'aide de ses pattes antérieures.

## **II. MESURE DES EFFETS DE L'HH SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI (OTG)**

### **A. ETUDES DES CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES OTG IN SITU**

Les expérimentations sont réalisées sur des rats Wistar mâles (Harlan, Gannat, France) pesant entre 300 et 320 g. Les animaux sont répartis en deux groupes, 13 rats dans le groupe contrôle (CONT) et 9 rats dans le groupe HH. Les animaux du groupe HH sont soumis à 14 jours d'HH.

#### **1. Préparation chirurgicale**

L'animal est profondément anesthésié au moyen d'une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg.kg<sup>-1</sup>). Il est ensuite placé sur une couverture chauffante (Homeothermic Blanket Control Unit, Phymep, Paris, France). Une laminectomie est réalisée au niveau des vertèbres L<sub>2</sub> à L<sub>6</sub>, en prenant bien soin de ne pas abîmer la moelle épinière, tout en veillant à la protéger de la dessiccation. Le muscle soleus est libéré des tissus

l'entourant, l'innervation et l'irrigation sanguine sont précautionneusement préservées. Toutes les branches nerveuses autres que celles innervant le muscle étudié sont coupées. Des injections supplémentaires d'agent anesthésique (pentobarbital sodique, 30 mg.kg<sup>-1</sup>) sont effectuées dès que nécessaire.

## **2. Montage sur le dispositif d'enregistrement**

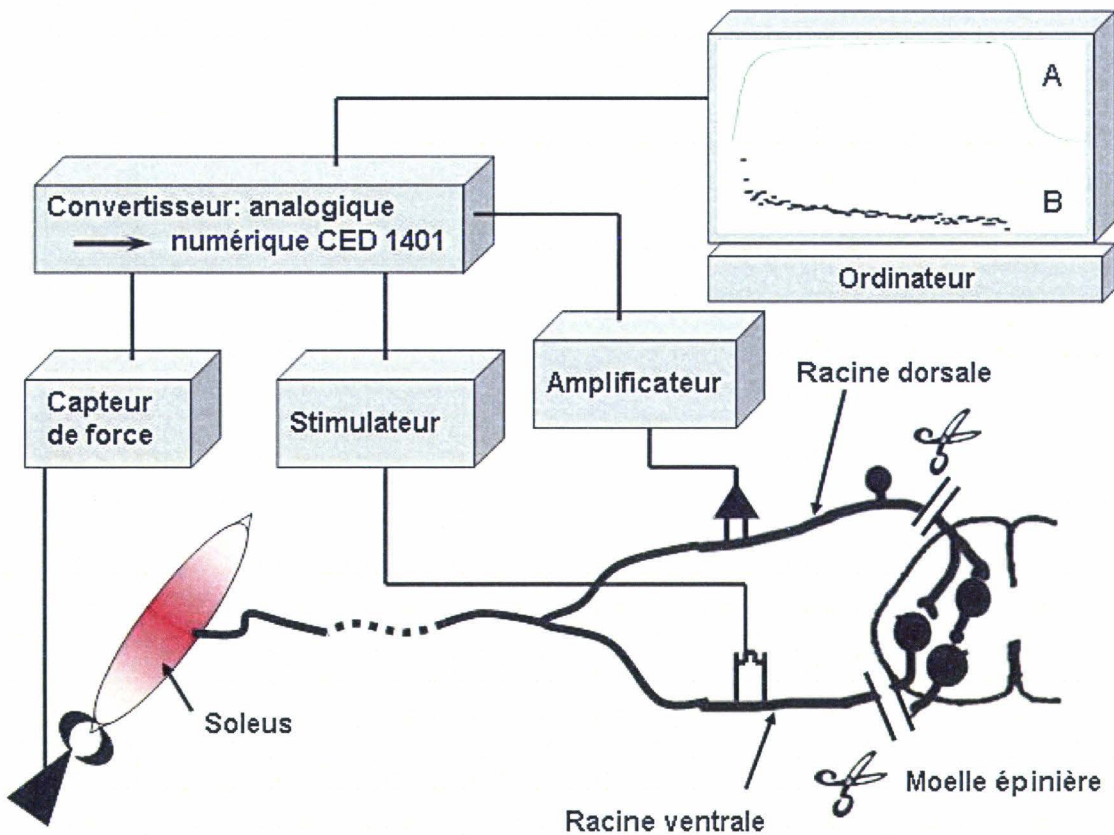
Le tendon distal du muscle est soigneusement attaché à un capteur de force (FT 10, 700 Hz, Grass Instruments, Quincy, MA, USA). La fixation du tendon au capteur s'effectue par intermédiaire de fils de sutures (metric 2, Crepin, France). Le nœud du tendon doit être fait sur la portion tendineuse la plus distale possible afin de ne léser aucun élément. A proximité de l'entrée de la branche nerveuse dans le muscle étudié, la gaine du nerf est retirée afin de pouvoir placer une électrode monopolaire d'enregistrement et ainsi obtenir le neurogramme du nerf soléaire. Les racines médullaires ventrales et dorsales L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> sur lesquelles se trouvent les innervations afférentes et efférentes des muscles des membres postérieurs sont dilacérées en filaments fins. Le muscle est placé à L<sub>0</sub>, c'est-à-dire la longueur de force maximale isométrique (Falempin et coll. 1990, Lewis et Chamberlain 1989, Winiarski et coll. 1987). Les caractéristiques des contractions musculaires en secousses et au cours de stimulations téaniques sont enregistrées. Ces caractéristiques sont détaillées dans la *partie 7.1*.

## **3. Isolation des afférences provenant du muscle soleus**

Les filaments de racines dorsales sont placés sur une électrode de stimulation. La stimulation est réalisée à l'aide d'un stimulateur Grass (Grass Instruments, S8800, Quincy, MA, USA). Les filaments sont triés en fonction de l'existence ou non de réponse à la stimulation qui se manifeste par l'apparition d'un ou de plusieurs potentiels évoqués sur le neurogramme musculaire. Ne sont conservés que les filaments évoquant une réponse, indiquant par la même que le filament contient une ou plusieurs afférences issues du muscle étudié. Par dilacération successive et tri des filaments, on n'obtient que des filaments évoquant une réponse et ne comportant qu'un seul potentiel d'action unitaire.

#### 4. Identification de la fibre afférente Ib

L'isolation fonctionnelle des fibres afférentes Ib s'effectue d'après la méthode de Hunt et Kuffler (1951) (**figure 18**). L'électrode d'enregistrement, qui jusqu'à présent était placée sous le nerf du muscle, est remplacée par une électrode de stimulation et l'électrode de stimulation sur lesquelles sont placées les racines dorsales est remplacée par une électrode d'enregistrement. Le muscle est stimulé par des chocs uniques provoquant des secousses simples et la réponse des afférences est enregistrée. L'identification des fibres afférentes Ib est réalisée suivant les critères de Matthews (1933) que nous détaillerons ci-après. A ce stade, ne sont conservés, pour la suite de l'expérience, que les filaments de racine dorsale remplissant tous les critères d'identification.



**Figure 18 :** Schéma du dispositif expérimental d'enregistrement des OTG (B) *in situ* en réponse à la contraction tétanique d'une UM «en-séries» (A) (d'après Jami 1988).

Pour être identifiée comme une fibre afférente Ib, une fibre doit répondre à plusieurs critères. Les potentiels d'action générés lors d'une secousse musculaire (également appelée «twitch» en anglais) doivent apparaître au cours de la phase ascendante de la secousse musculaire et ce, quelque soit la longueur musculaire à partir de la longueur physiologique minimale. La fibre ne doit pas avoir de réponse à des étirements en rampe et sinusoïdaux dans les longueurs physiologiques du muscle. Ce sont les deux principaux critères d'identification.

En cas de doute quant à l'origine d'une fibre, il faut réaliser un test supplémentaire, qui est le suivant. Au cours d'une stimulation téτανique d'une UM «en-séries» prolongée à haute fréquence (400 Hz), la décharge afférente de la fibre Ib ne doit pas persister après la baisse de la tension musculaire. Ces tests peuvent être répétés une fois les UM «en-séries» identifiées.

### **5. Isolement des unités motrices «en-séries»**

L'électrode de stimulation placée sous le nerf du muscle est remplacée par une électrode d'enregistrement et l'électrode sur laquelle sont placés les filaments fins des racines est remplacée par une électrode de stimulation. Les filaments fins de la racine ventrale sont stimulés tour à tour avec chacun des filaments fins de racine dorsale contenant une fibre afférente Ib. Tous les filaments de racine ventrale évoquant une réponse de la fibre afférente Ib sont conservés et dilacérés jusqu'à l'obtention d'une seule unité motrice activant l'OTG qui est alors classée comme unité motrice «en-séries». La réponse unitaire observée sur le neurogramme permet de confirmer la présence d'une seule unité motrice donc d'un seul axone moteur ou motoneurone dans le filament fin de racine ventrale.

### **6. Protocole expérimental de stimulation**

Après isolement de toutes les fibres afférentes Ib et de toutes les UM «en-séries» évoquant des réponses sur les filaments isolés (**figure 18**), la procédure expérimentale est la suivante. Un enregistrement de plusieurs secousses musculaires et de leurs réponses est effectué pour chaque couple fibre afférente Ib et UM «en-séries». Chaque couple fibre afférente Ib et UM «en-séries» est ensuite enregistré lors d'un protocole de stimulation de 4 contractions téτανiques de fréquences croissantes. Chaque contraction dure 2 secondes et est séparée de la suivante ou de la précédente par un intervalle de 2 minutes. Les

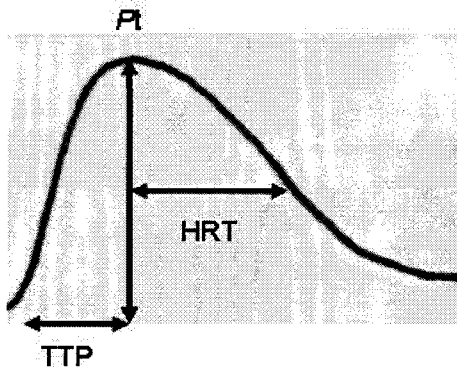
fréquences de stimulation sont 20, 40, 80 et 100 Hz. La stimulation à une fréquence de 20 ou 40 Hz permet de typer l'UM. Les fréquences de stimulation de 80 et 100 Hz permettent d'obtenir la force téτανique maximale (Winiarski et coll. 1987). Toutes les contractions, en secousse ou en contractions téτανiques sont de type isométrique et sont effectuées à la longueur  $L_0$  musculaire.

## 7. Paramètres mesurés et enregistrés

### 7.1. Paramètres mécaniques musculaires

#### Caractéristiques de force maximale isométrique sur une secousse musculaire et lors de contractions téτανiques musculaires

La première mesure mécanique concerne la valeur de la force maximale isométrique ( $P_t$ ) développée pendant la secousse musculaire. Cette mesure est exprimée en milliNewton (mN). Ensuite les paramètres enregistrés concernent la cinétique de contraction. Le premier est le temps de contraction (TC ou TTP pour time-to-peak en anglais) qui correspond au temps entre le début de la contraction et l'atteinte de  $P_t$ .



**Figure 19 :** Paramètres mécaniques d'une contraction en secousse musculaire.

Le second paramètre est le temps de demi relaxation ( $T_{1/2}R$  ou HRT pour half-relaxation time en terminologie anglaise) qui correspond au temps entre la valeur maximale de  $P_t$  et le moment où la force diminue de moitié par rapport à cette valeur de  $P_t$  (Leterme et Falempin 1996, Picquet et coll. 2000, Winiarski et coll. 1987). Ces paramètres sont illustrés **figure 19**.

Les caractéristiques de la contraction musculaire sont aussi enregistrées en réponses à des fréquences de stimulations de 20, 40, 80 et 100 Hz.

Caractéristiques de force maximale isométrique des UM «en-séries» lors d'une stimulation en secousse

Les mêmes paramètres que ceux enregistrés pour la contraction musculaire en secousse sont enregistrés au niveau des UM «en-séries».

Caractéristiques de force maximale isométrique des UM «en-séries» lors de stimulations téaniques de fréquence croissante

Comme pour les contractions en secousse, la force développée par les contractions téaniques est mesurée. La mesure est effectuée au niveau de la phase de plateau de la contraction. La force téanique développée à une fréquence de stimulation de 20 Hz est nommée  $P_{20}$  et la force téanique maximale obtenue à une fréquence de stimulation de 80 ou 100 Hz est appelée  $P_0$ . Le rapport  $P_{20}$  sur  $P_0$  ( $P_{20}/P_0$ ) est calculé.

Outre la force, la vitesse d'établissement de la contraction téanique des UM «en-séries» est mesurée. Cette vitesse est calculée par rapport à la décharge de l'OTG que l'UM active. La vitesse correspond à la pente de la relation force/temps dans l'intervalle de temps séparant le potentiel d'action du pic dynamique et le potentiel d'action suivant (Davies et coll. 1995).

L'ensemble des paramètres TTP, présence ou absence de « sag » et le rapport  $P_{20}/P_0$  permet de classer le muscle et les différentes UM «en-séries» enregistrées (Burke et coll. 1973, Burke et Tsairis 1973, Picquet et coll. 2000).

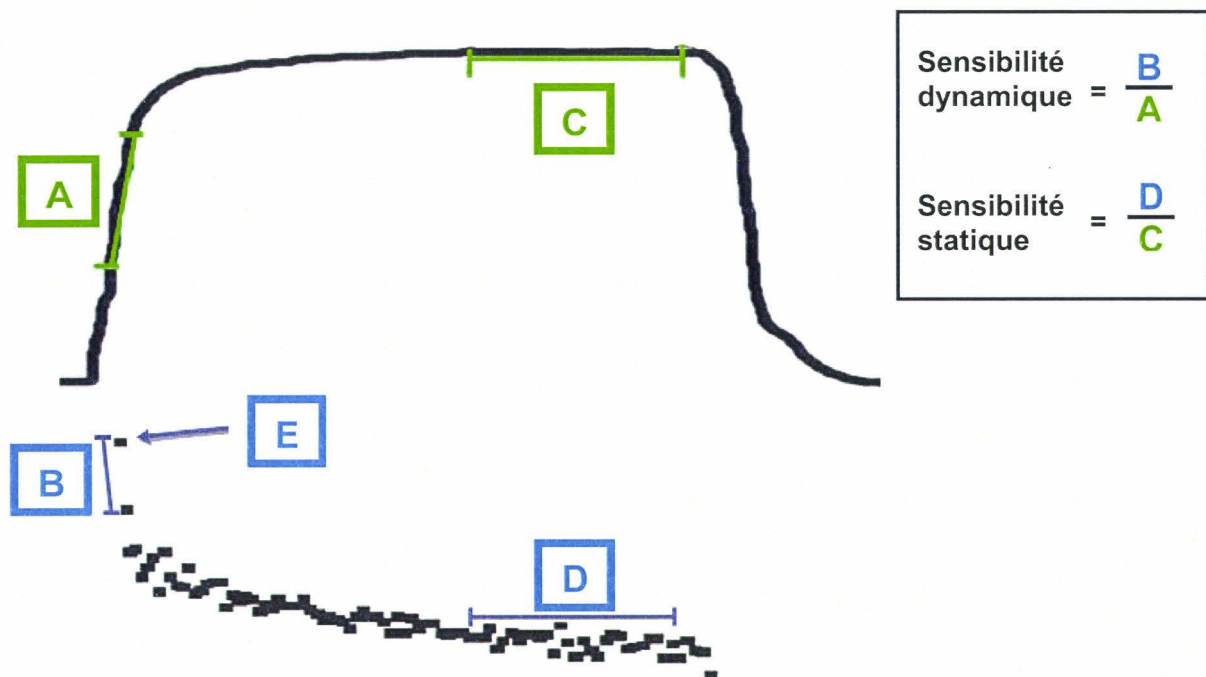
## 7.2. Vitesse de conduction des fibres afférentes Ib

La vitesse de conduction de la fibre afférente Ib est donnée indirectement par la mesure, sur l'écran de l'ordinateur, du temps de latence entre la stimulation et l'apparition sur le neurogramme musculaire du potentiel évoqué. Ce temps est rapporté à la distance mesurée post-mortem par dissection et parcourue par la stimulation dans le réseau nerveux entre les deux électrodes.

### 7.3. Paramètres de décharge

L'enregistrement de la décharge des OTG en réponse aux secousses musculaires et des UM «en-séries» est seulement un paramètre qualitatif qui sert en partie à confirmer l'identification de la fibre afférente Ib.

En revanche, l'enregistrement de la décharge des OTG lors de contractions tétaniques des UM «en-séries» permet la mesure de deux paramètres de décharge. Le premier est le pic dynamique illustré sur la **figure 20** par la lettre **E** (Davies et coll. 1995, Jami et Petit 1976a) et le second est la décharge statique illustrée par la lettre **D** (Petit et coll. 1994).



**Figure 20 :** Représentation des caractéristiques de décharges des OTG activé par une contraction tétanique fusionnée.

#### 7.4. Sensibilités mesurées indirectement par rapport à la décharge

Deux sensibilités sont obtenues indirectement des mesures de force des UM «en-séries» et de décharge des OTG. Elles sont exprimées en  $\text{Hz.mN}^{-1}$ .

La première sensibilité est la **sensibilité dynamique** qui est le rapport entre la pente de la diminution de décharge en fréquence instantanée entre le pic dynamique et le potentiel d'action suivant (représentée sur la **figure 20** par la lettre **B**) et la pente d'établissement de la force mesurée durant le même intervalle de temps (représentée par la lettre **A**), comme expliquée précédemment (Davies et coll. 1995).

La seconde sensibilité est la **sensibilité statique** qui est le rapport entre la décharge statique, quand elle est « stable » (représentée sur la **figure 20** par la lettre **D**) et le plateau de force dans le même intervalle de temps (représenté par la lettre **C**) (Petit et coll. 1994).

## B. MORPHOLOGIE DES OTG

### 1. Prélèvement des tissus

Les muscles solei, des animaux des expériences électrophysiologiques, sont prélevés juste avant le sacrifice de l'animal. Le muscle est pesé, puis coupé en trois parties. Seules sont conservées les extrémités distales et proximales qui sont immédiatement congelées dans l'isopentane refroidi par azote liquide. Les échantillons prélevés sont ensuite stockés au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Protocole de coupe

Les muscles sont coupés à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome cryostat (Leica CM 1800, Heidelberg, Allemagne). Afin de procéder à un balayage de toute la jonction myo-tendineuse, toutes les 14 coupes de  $10\ \mu\text{m}$  d'épaisseur, un espace de  $100\ \mu\text{m}$  était laissé.



### 3. Coloration par la méthode ATPase

#### 3.1. Préparation des solutions

Formol tampon : 5 % de formaldéhyde à 35 %, 200 mM de cacodylate de sodium, 68 mM de chlorure de calcium, 350 mM de sucrose.

Pré – incubation Alcaline pH 10.4 : 2-amino-2-méthyl-1.3-propanediol 0.2M et Chlorure de calcium 36 mM.

Pré – incubation Acide pH 4.45 : Acide Acétique 0.2M et acétate de sodium 0.2M

Incubation ATP pH 9.4 : 2-amino-2-méthyl-1.3-propanediol 0.2M, Chlorure de calcium 36 mM et Adénosine Tri Phosphate (ATP) 2,7 mM.

Solution de rinçage 1 pH 7.8 : Tris 0.2M et Chlorure de calcium 36 mM.

Solution de rinçage 2 : Chlorure de calcium 0.07M

Les pH sont ajustés à l'aide de soude (NaOH) 0,1 M et d'acide acétique 0,1 M

#### 3.2. Coloration

Les lames sont incubées, soit avec un pH acide, soit avec un pH basique (Brooke et Kaiser 1970, Guth et Samaha 1969). Le protocole de coloration est indiqué dans le **tableau 2**. Comme illustré dans le **tableau 1** (page 24), cette coloration permet d'identifier les fibres de type I, IC, IIA, IIC, IID/IIX et IIB.

Pré – incubation Alcaline pH 10.4	Pré – incubation Acide pH 4.3 et 4.45
Fixation : 5 minute dans le formol tampon	_____
Rinçages : 2 X 1 minute dans la solution de rinçage 1	_____
Pré – incubation : 15 minutes dans la solution à pH 10.4 à 23°C	Pré – incubation : 10 minutes dans la solution à pH 4.45 à 23°C
Rinçages : 2 X 1 minute dans la solution rinçage 1	
Incubation dans solution incubation (bain marie) : 30 min à 37°C	Incubation dans solution incubation (bain marie) : 45 min à 37°C
Rinçages : 3 X 1 minute dans la solution de rinçage 2	
Coloration : 3 min dans Chlorure de Cobalt 2%	
Rinçages : 3 X dans de l'eau ultrapure	
Coloration : 2 minutes dans le sulfure d'ammonium à 20 %	
Rinçage : 5 minutes dans de l'eau du robinet	
Déshydratation dans des bains d'alcool successifs et croissants en concentration puis dans le toluène avant la fixation avec des lamelles protectrices	

**Tableau 2 : Protocole de coloration par la méthode ATPase.**

#### 4. Quantification et recueil des données

Les mesures de surfaces des différents types musculaires et de surfaces totales et intracapsulaires des OTG sont faites à l'aide de l'analyseur d'images du Centre Commun de Microscopie et d'Imagerie Cellulaire de l'U.S.T. Lille (C.C.M.I.C.) de type SAMBA (Grenoble, France).

##### 4.1. Surface des fibres musculaires

Après identification par la coloration ATPasique, la surface moyenne, exprimée en  $\mu\text{m}^2$ , de chaque type de fibres est obtenue par la mesure de 200 fibres de chaque type. La surface du muscle, exprimée en  $\mu\text{m}^2$ , est également mesurée.

#### 4.2. Morphologie des OTG

L'identification des OTG est faite d'après les critères de Spielmann et Stauffer (1986) et Zelena et Soukup (1983).

La surface capsulaire est obtenue en soustrayant la surface intracapsulaire de la surface totale. Le diamètre des OTG est extrapolé de la surface totale des OTG en admettant qu'ils aient une forme circulaire.

La surface de l'OTG et la surface musculaire sont mesurées sur la même coupe. Le rapport entre les deux est ensuite calculé.

La longueur musculaire est toujours calculée dans les mêmes conditions, c'est-à-dire lorsque l'articulation du genou est positionnée à 90° et l'articulation de la cheville positionnée à 30° (Riley et coll. 1990). La longueur de l'OTG est établie d'après la reconstitution effectuée sur les coupes successives où il apparaît. Le rapport longueur de l'OTG sur longueur musculaire est ensuite calculé.

Le rapport diamètre de l'OTG sur longueur de l'OTG, considéré comme un marqueur de contrainte que l'OTG peut subir (Bridgman 1970, Jami 1992), est aussi calculé.

### **III. EFFETS DE L'HH SUR LES NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES**

#### **A. QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES**

Le contenu des acides aminés neurotransmetteurs est déterminé sur fragments entiers de moelle épinière ventrale. L'eau ultrapure utilisée au cours des diverses expérimentations, possède une résistance de 18 M $\Omega$ .

##### **1. Prélèvements des tissus**

Les expérimentations sont réalisées sur des rats Wistar mâles (Harlan, Gannat, France) pesant entre 330 et 350 g. Les animaux sont répartis en trois groupes, 16 rats dans

le groupe contrôle (CONT), 16 rats dans le groupe HH7 et 16 rats dans le groupe HH14. Les animaux des groupes HH7 et HH14 sont respectivement soumis à 7 et 14 jours d'HH. Ces deux durées de suspension sont choisies en fonction des résultats obtenus par Kawano et coll. (2004) pour qui, ces deux périodes, sont charnières dans l'évolution de l'activité des neurogrammes.

Les animaux sont placés dans une pièce d'animalerie où le rythme circadien est réglé de la manière suivante : de minuit jusqu'à midi → phase éclairée, et de midi à minuit → phase d'obscurité, pendant laquelle les rats présentent une phase d'activité intense. Un tel dispositif nous permet d'effectuer les sacrifices pendant leur phase de plus forte activité (Stewart et coll. 1985), c'est-à-dire entre 13h00 et 14h30. Les animaux sont pesés et sacrifiés par décapitation sans anesthésie préalable. Les animaux des groupes HH sont manipulés (pesée et sacrifice) de telle façon que leurs membres postérieurs ne soient jamais en contact avec le sol. Une laminectomie est réalisée entre les vertèbres L<sub>4</sub> et T<sub>9</sub>. Pour empêcher toute dégradation éventuelle, les segments spinaux L<sub>2</sub> à T<sub>10</sub> sont prélevés en moins de 6 minutes après décapitation. Ces segments correspondent respectivement aux niveaux spinaux L<sub>6</sub> à L<sub>1</sub>. Les niveaux spinaux L<sub>5</sub> et L<sub>4</sub> correspondent à l'emplacement des corps cellulaires des motoneurones des muscles soleus, gastrocnémus médian et latéral et EDL pour le niveau L<sub>5</sub> et des muscles tibialis anterior et plantaris pour le niveau L<sub>4</sub> (Kawano et coll. 2004). La partie ventrale est séparée de la partie dorsale d'après les illustrations de Paxinos (Paxinos, *The rat nervous system*, éd. Academic Press, 1995) et d'après la méthode décrite par Malcangio et Bowery (1994). Les échantillons prélevés sont immédiatement congelés dans l'azote liquide. Ils sont ensuite stockés au congélateur à - 80° C en attendant le dosage.

## 2. Préparation des échantillons

Les fragments congelés de moelle épinière sont broyés par ultrason (sonication) dans l'eau ultrapure à une dilution de 5 µl par mg de tissu. 10 µl d'homogénat sont prélevés pour le dosage de protéines suivant la méthode Folin-Lowry (Lowry et coll. 1951). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4° C. Le surnageant est prélevé, puis dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau ultrapure. Il est enfin passé dans un filtre d'un maillage 0,2 µm Millex-GV filter (Nihon Millipore Ltd., Yonezawa, Japan).

### 3. Préparation des standards externes

Un mélange d'acides aminés contenant : arginine, lysine, alanine, thréonine, glycine, valine, sérine, proline, isoleucine, leucine, méthionine, histidine, phénylalanine, glutamate, aspartate, cystine, tyrosine (Pierbo Science France, Brebières, France), glutamine, GABA et taurine (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France) est préparé aux concentrations de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M.

### 4. Chromatographie liquide de haute précision à détection ampérométrique pulsée intégrée (HPLC iPAD)

La méthode chromatographique est adaptée à partir de l'étude de Hanco et Rohrer (2004). Le système chromatographique utilisé (**figure 21**) pour cette étude est un système Dionex BioLC, équipé d'un injecteur automatique, configuré avec la méthode *AAA-Direct* (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France).



**Figure 21** : Photographie d'un dispositif d'HPLC iPAD.

La colonne d'échange de séparation est une colonne du type AminoPac PA 10 (2 X 250 mm; P/N 55406; Dionex) avec sa colonne de garde PA10 (2 X 50 mm; P/N 55407; Dionex).

Un mélangeur gradient GM4 (2 mm; P/N 49135; Dionex) est également utilisé pour homogénéiser le mélange des éluents. Les conditions de gradient sont détaillées dans le **tableau 3**. L'ensemble du système chromatographique est relié à un ordinateur, qui recueille les données, permet l'intégration et contrôle automatiquement les injections et les phases de gradient.

Le signal électrochimique est de +0,13 V de 0,00 à 0,04 s, + 0,28 V de 0,05 à 0,11 s, +0,55 V de 0,12 à 0,41 s, +0,28 V de 0,42 à 0,56 s, -1,67 V de 0,57 à 0,58 s, +0,93 à 0,59 s, et +0,13 V à 0,60 s, utilisant le mode de référence pH. Le courant électrique est intégré entre 0,11 et 0,56 s pour la détection. L'électrode de travail est en or. Les éluents (eau dans la voie A; 250 mM de NaOH dans la voie B; 1 M d'acétate de sodium dans la voie C) sont préparés suivant les recommandations du fournisseur. Tous les acides aminés sont séparés avec un débit de pompe de 0,25 mL/min et une température de colonne de 30 °C.

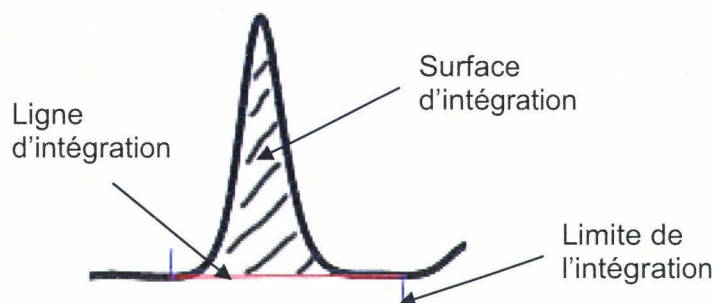
Temps (min)	%E1 Voie A	%E2 Voie B	%E3 Voie C	Réglage	Commentaires
Init	80	20	0	5	Remplissage de la boucle d'injection
0,0	80	20	0	5	Chargement de la valve d'injection
2,0	80	20	0	5	Début du gradient de soude
12,0	80	20	0	8	
16,0	68	32	0	5	Début du gradient d'acétate de sodium
24,0	36	24	40	8	
27,0	36	24	40	5	
42,0	36	24	40	5	
42,1	0	50	50	5	Rinçage de la colonne à la soude
50,1	0	50	50	5	
50,2	80	20	0	5	Retour aux conditions de départ
75,0	80	20	0	5	

**Tableau 3 :** Conditions de gradient des différents éluents de la phase mobile.

Les standards et les échantillons sont placés dans l'injecteur automatique (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France) pour une durée maximale de 24 heures. La séquence de passage des échantillons est aléatoirement déterminée pour éviter un possible effet due à la séquence de dosage en elle-même.

## 5. Analyse des données

Les chromatogrammes sont enregistrés sur l'ordinateur qui contrôle l'HPLC. Ils sont ensuite analysés et intégrés avec le logiciel Chromeleon, version 6.40 (Dionex Corporation). Brièvement, l'intégration se déroule de la manière suivante : les pics sont identifiés par rapport aux temps de rétention des standards externes. Ensuite, l'étalonnage de l'HPLC est réalisé en traçant la relation qui passe pour chaque acide aminé par les valeurs obtenues pour les 3 concentrations de chaque standard externe. Cette relation doit être linéaire et avoir un coefficient de reproductibilité de plus de 90 %. Ces paramètres sont calculés par le logiciel. L'intégration est la mesure de la surface comprise entre le pic et la ligne d'intégration. Cette ligne d'intégration est placée automatiquement par le logiciel pour relier la ligne de base du chromatogramme comme illustré sur la **figure 22**. Le coefficient directeur de la droite permet, d'après la surface d'intégration, d'obtenir la concentration d'acides aminés présents dans l'échantillon.



**Figure 22** : Exemple d'intégration d'un pic extrait d'un chromatogramme.

## B. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DES RECEPTEURS GLYCINE ET NMDA

### 1. Prélèvement des tissus

Les expérimentations sont réalisées sur des rats Wistar mâles (Harlan, Gannat, France) pesant entre 300 et 320 g. Les animaux sont répartis en trois groupes, 12 rats dans



le groupe contrôle (CONT), 12 rats dans le groupe HH7 et 12 rats dans le groupe HH14. Les animaux du groupe HH7 et HH14 sont respectivement soumis à 7 et 14 jours d'HH. Le choix de ces périodes repose également sur les résultats de Kawano et coll. (2004) mais aussi sur les résultats de la quantification des neurotransmetteurs.

Les animaux sont traités et sacrifiés de la même manière que les animaux de l'expérimentation HPLC. En raison d'un protocole d'extraction différent entre les expérimentations en HPLC et en électrophorèse, il n'a pas été possible de travailler sur les mêmes échantillons.

## **2. Extraction des protéines du tissu nerveux**

Les tissus nerveux fraîchement prélevés sont manipulés sous azote liquide et carboglace. Les tissus sont placés dans une solution Laemmli contenant 125mM de Tris HCl ajusté à pH 7.4, 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 5% de  $\beta$ -mercapto-éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne), 10% de glycérol et 0.02% de bleu de bromophénol. Un cocktail d'inhibiteur de protéases (pepstatine, apoprotéine, leupeptine, phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride ou PMSF à une concentration de 0,2 mM) est ajouté pour éviter toute perte de matériel protéique. On ajoute à cette solution de l'acide éthylène glycol-bis (2-amino-éthyléther-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France), qui sont deux chélateurs du calcium et permettent donc la destruction des membranes des protéines. Il est ajouté 5  $\mu$ l de cette solution par milligramme de tissu. Les échantillons sont ensuite soniqués dans la glace, puis sont centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4° C. La quantité de protéines présente dans le surnageant est dosée par un kit (Dc Protein Assay, Bio-Rad) fonctionnant selon la méthode de dosage de Folin-Lowry (Lowry et coll. 1951).

## **3. Electrophorèse dénaturante (avec Sodium-Dodécyl-Sulphate) sur Gel de PolyAcrylamide ou SDS-PAGE**

L'électrophorèse consiste à faire migrer des protéines dans un champ électrique. Ces dernières migrent à une vitesse qui est fonction de leurs charges électriques nettes, de leurs tailles et de leurs formes. La charge électrique nette de la protéine dépend des acides aminés qui la composent. Le rôle du Sodium-Dodécyl-Sulphate (SDS), qui est chargé

négativement, est de se lier aux régions hydrophobes de la protéine. Le SDS a aussi un rôle d'agent dénaturant très puissant. La protéine dénaturée est alors chargée négativement. Lorsqu'une solution contenant différents électrolytes est soumise à l'action d'un champ électrique, on assiste à un phénomène de déplacement des molécules ionisées vers leur électrode respective. Les anions, chargés négativement, comme les protéines en présence de SDS, se dirigent vers l'électrode positive, l'anode. L'ajout du  $\beta$ -mercapto-éthanol permet de rompre tous les ponts di-sulfures des protéines, mais il est aussi un activateur de protéase dont l'activité est inhibée par le cocktail d'inhibiteur de protéases. Les protéines sont alors dénaturées et les sous-unités qui les composent, peuvent être analysées séparément. Avec une électrophorèse de type mono-dimensionnelle, les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaires. Afin de vérifier de compléter notre identification et notre marquage à l'aide d'anticorps, nous avons utilisé un marqueur de poids moléculaire (Amersham, Little Chalfont, Angleterre).

Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide (ou acryl) en présence de petite quantité de bis acrylamide (NN'méthylène-bisacrylamide). Le bis acrylamide, appelé aussi Bis, est l'équivalent de 2 monomères d'acrylamide liés par un groupement méthyl et est utilisé comme agent pontant. La polymérisation de l'acrylamide est un exemple de catalyse par radicaux libres initiée par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine, Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France).

Le système de migration comprend deux modes successifs de migration électrophorétique, une isotachophorèse (gel de concentration), puis une électrophorèse de zone monophasique (gel de séparation). Le passage de l'une à l'autre se fait avec un changement de pH et par une augmentation de concentration en acrylamide du gel. L'objectif du gel d'électrophorèse en deux parties est de pallier aux problèmes liés aux faibles quantités de protéines et aux volumes parfois non négligeables déposés dans les puits. On réalise donc une étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines dans le gel de concentration (stacking gel en anglais), qui migreront dans le gel de séparation (resolving gel ou separating gel en anglais).

Tous les accessoires servant à la préparation des gels en eux-mêmes ou à la migration, sont soigneusement nettoyés à l'eau ultrapure et à l'alcool.

### 3.1. Le gel de séparation

Le gel de séparation est soit un gel de polyacrylamide de 8% soit un gel de 15%, leurs compositions sont indiquées dans le **tableau 4**. Les quantités données correspondent à un gel de 0,75 mm d'épaisseur, mesurant 17,5 cm de largeur et 12 cm de hauteur. Le gel est coulé et recouvert d'eau ultrapure afin de lisser son bord supérieur. La durée de polymérisation est d'une heure. Nous nous sommes servis de deux gels de séparation de concentration différentes du fait des poids moléculaires différents de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine (48 kDa), des sous-unités NR2A (177 kDa) et NR1 (115 kDa) du récepteur NMDA et de la  $\beta$ -tubuline (55 kDa). Le standard interne (la  $\beta$ -tubuline) apparaît sur les gels des deux concentrations. L'utilisation du gel 15 % est nécessaire pour une séparation suffisante de la  $\beta$ -tubuline et de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine qui ont des poids moléculaires proches.

	8 %	15 %
Rotiphorèse (30 % d'acrylamide/0,8 % de bisacrylamide)	4 ml	7,5 ml
TRIS HCl/SDS pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml
Eau ultrapure (Résistivité 18 M $\Omega$ )	7,25 ml	3,75 ml
Ammonium Persulfate 10 %	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tableau 4** : Composition des gels de séparation de 8 et 15 %.

### 3.2. Le gel de concentration

La composition du gel de concentration est indiquée dans le **tableau 5**. Les quantités données correspondent à un gel de 0,75 mm d'épaisseur, mesurant 17,5 cm de largeur et 3,5 cm de hauteur. Le peigne moulant les puits est mis en place et le gel de concentration est coulé. Après que le gel soit polymérisé (30 minutes), le peigne est retiré et les puits sont rincés avec le tampon de migration. Le gel est prêt à recevoir les échantillons.

Rotiphorèse (30 % d'acrylamide/0,8 % de bisacrylamide)	1,3 ml
TRIS HCl/SDS pH 6,8	2,5 ml
Eau ultrapure (Résistivité 18 M $\Omega$ )	6,1 ml
Ammonium Persulfate 10 %	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

**Tableau 5 : Composition du gel de concentration.**

### 3.3. Migration des échantillons dans le gel

La composition du tampon de migration est donnée dans le **tableau 6**. Dans chaque puits, il est déposé 50  $\mu$ g de protéine provenant du surnageant de l'extraction. Le voltage du générateur (Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Amersham, Little Chalfont, Angleterre) est réglé pour ne pas excéder 300 Volts. L'ampérage est de 10 mA par le gel pour le gel de concentration et de 13 mA par le gel pour le gel de séparation.

Glycine	72 g
Tris Base	15,2 g
SDS	5 g
Eau ultrapure (Résistivité 18 M $\Omega$ )	QSP 5 litres

**Tableau 6 : Composition du tampon de migration.**

#### 4. Transfert sur membrane

Le transfert semi-sec s'effectue sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0.2  $\mu\text{m}$  (Adventec MFS Inc, Pleasanton, USA), à ampérage constant de 0.8 mA/cm et à un voltage de 60 V pendant 4 h. La composition du tampon de transfert est donnée par le **tableau 7**. Chaque membrane est ensuite conservée dans un mélange PBS (Phosphate Buffered Saline) / Sodium Azide. La qualité du transfert est vérifiée par une coloration au rouge Ponceau (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France).

Glycine	50,4 g
Tris Base	10,6 g
Méthanol	700 ml
Eau ultrapure (Résistivité 18 M $\Omega$ )	2,8 litres

**Tableau 7** : Composition du tampon de transfert.

#### 5. Marquage aux anticorps

Ce marquage permet la localisation de la position des isoformes des sous-unités des récepteurs membranaires. Il nécessite tout d'abord la saturation des sites non-spécifiques de la membrane. Cette dernière est réalisée, pendant 2h, dans une solution de PBS contenant de l'albumine bovine à 5% et de l'antifoam à 0.01% (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France). La membrane est ensuite incubée durant toute la nuit à 37°C avec les anticorps primaires dirigés contre :

- la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine (dilution au 1/100<sup>ème</sup>, SC 17276 SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, USA) obtenu chez la chèvre.
- les sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  du récepteur NMDA (dilution au 1/100<sup>ème</sup>, respectivement SC 1468 et SC 1467 SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, USA) obtenus chez la chèvre.

▪ la  $\beta$ -tubuline (dilution au 1/200<sup>ème</sup>, SC 9104 SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, USA) obtenu chez le lapin. Les sous-unités  $\epsilon$ 1 et  $\xi$ 1 correspondent respectivement aux sous-unités NR2A et NR1 du récepteur NMDA (Mori et Mishina 1995).

Les anticorps secondaires combinées à la peroxydase de Raifort (HRP pour Horse Radish Peroxydase en anglais) anti IgG de lapin et anti IgG de chèvre (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, respectivement SC 2313 et SC 2020 SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, USA) obtenus chez l'âne sont par la suite appliqués pendant 1h.

Entre chaque application des différents produits, la membrane est rincée 3x15min au PBS afin d'éliminer tout bruit de fond résiduel.

La détection du signal est assurée par un kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham, Little Chalfont, Angleterre). Les bandes ainsi révélées vont impressionner un film ECL (Hyperfilm ECL, Amersham) dans une cassette autoradiographique. Le film est ensuite développé et fixé (Processing Chemicals, KodaK, GBX Developer/Fixer/Replenisher, Sigma).

## **6. Analyse des films et quantification du signal des protéines**

Les films sont ensuite scannés à l'aide d'un logiciel d'acquisition (Photoshop 7.0). Les paramètres de contraste et de luminosité sont réglés afin que les bandes marquées se détachent du bruit de fond. La surface de chaque bande est mesurée à l'aide du logiciel de densitrométrie. Les surfaces moyennes obtenues pour les sous-unités  $\alpha$ 1 du récepteur glycine et pour les sous-unités  $\epsilon$ 1 et  $\xi$ 1 du récepteur NMDA sont normalisées à l'aide de la surface moyenne obtenue pour la  $\beta$ -tubuline qui sert de standard interne (Tillakaratne et coll. 2000).

## **IV. ANALYSES STATISTIQUES**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel Prism 3.0 de GraphPad. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard. Les analyses portant sur les poids des rats et les poids des muscles sont réalisées avec une analyse de variance (ANOVA) ou un test t non apparié de Student le cas échéant.

## **1. Analyses statistiques des propriétés fonctionnelles des OTG**

L'analyse des propriétés fonctionnelles des OTG est réalisée avec un test-t non apparié de Student. Le nombre d'asterisques (\*) indique le niveau de significativité des différences observées entre les valeurs des paramètres mesurés pour le groupe HH et pour le groupe CONT, \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$  et \*\*\*:  $P < 0,001$ .

## **2. Analyses statistiques des propriétés morphologiques des OTG et des fibres musculaires**

La comparaison des différents types de fibres musculaires est réalisée avec un test-t non apparié de Student.

La comparaison des propriétés morphologiques des OTG est réalisée avec un test de Mann-Whitney.

Le nombre d'asterisques (\*) indique le niveau de significativité des différences observées entre les valeurs des paramètres mesurés pour le groupe HH et pour le groupe CONT, \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$  et \*\*\*:  $P < 0,001$ . Les symboles (¶) indiquent une différence significative entre les valeurs des paramètres mesurés pour les UM lentes et pour les UM rapides pour le groupe HH, ¶,  $P < 0,05$ ; ¶¶,  $P < 0,01$ ; ¶¶¶,  $P < 0,001$ . La lettre (a) indique une différence significative entre les fibres musculaires de type I et IIA pour un même groupe. La lettre (b) indique une différence significative entre les fibres musculaires de type I et hybrides pour un même groupe. La lettre (c) indique une différence significative entre les fibres musculaires de type IIA et hybrides pour un même groupe.

## **3. Analyses statistiques des concentrations en acides aminés de la moelle épinière ventrale**

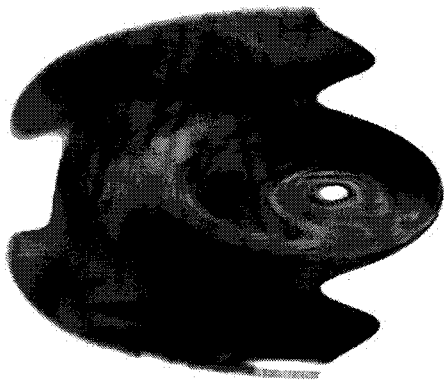
L'analyse des concentrations en acides aminés pour les 3 groupes d'animaux sur deux segments vertébraux est réalisée avec une analyse de variance (ANOVA) en mesures répétées.

#### **4. Analyses statistiques de la densité de récepteur glycine et NMDA de la moelle épinière ventrale**

L'analyse de l'expression des sous-unités  $\alpha 1$  du récepteur glycine et des sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  du récepteur NMDA pour les 3 groupes d'animaux sur deux segments vertébraux est réalisée avec une analyse de variance (ANOVA) en mesures répétées.







## Résultats

# **I. EFFETS DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI**

Seront exposés dans cette partie, les données obtenues concernant les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des animaux contrôles et des animaux soumis à une période de 14 jours d'HH.

## **A. EFFETS DE L'HH SUR LES POIDS CORPORELS ET SUR LES MUSCLES**

### **1. Les poids corporels et les poids musculaires**

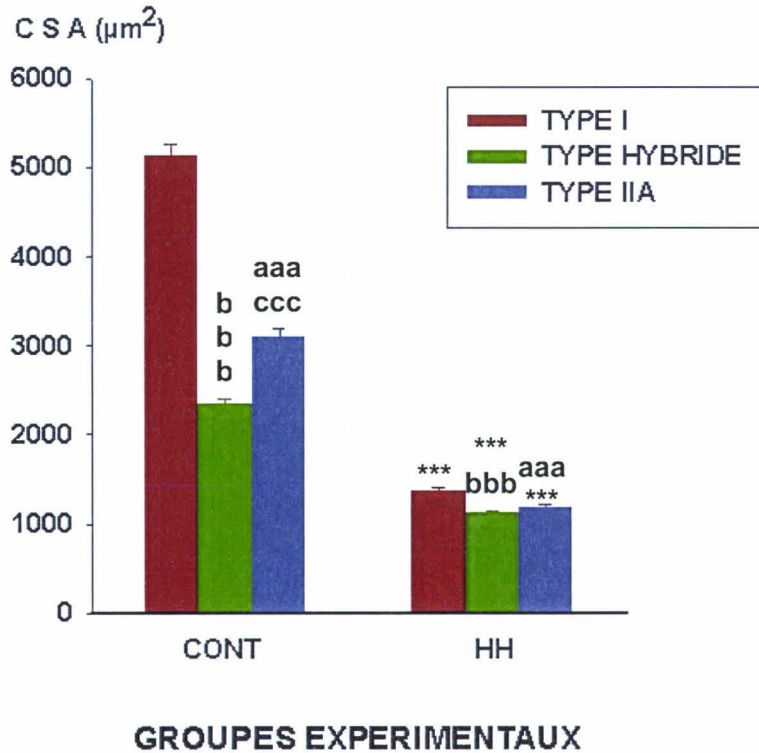
Après 14 jours d'HH, les poids des rats (BW :  $294,6 \pm 6,7$  g ;  $P < 0,05$ ) et le poids des muscles soleus (MWW :  $94,9 \pm 5,4$  mg ;  $P < 0,001$ ) sont diminués par rapport à ceux du groupe contrôle (BW :  $319,5 \pm 3,9$  g et MWW :  $169,3 \pm 5,7$  mg). Le rapport MWW/BW est significativement diminué ( $P < 0,001$ ) pour les animaux du groupe HH ( $0,32 \pm 0,01$ ) par rapport aux animaux du groupe contrôle ( $0,53 \pm 0,01$ ).

### **2. Les surfaces de fibres musculaires**

Pour le groupe contrôle, la CSA des fibres de type I est plus grande que celles des fibres de type IIA et que celles des fibres hybrides. Proportionnellement, la CSA des fibres de type I par rapport à celles des fibres IIA ou des fibres hybrides est respectivement plus grande de 39 % et 54 %, alors que les fibres de type IIA sont 24 % plus grandes que les fibres de type hybrides.

Dans le groupe HH, les CSA des fibres de type IIA et hybrides sont plus petites que les CSA des fibres de type I, mais proportionnellement les différences respectives ne sont plus que de 13 % et de 18,5 %. Ces valeurs peuvent être expliquées par une atrophie plus importante pour les fibres de type I après 14 jours d'HH.

Par rapport au groupe CONT, les pourcentages de diminution des CSA des fibres de type I, IIA et hybrides sont respectivement de - 73 %, - 61 % et - 52.5 %. Les CSA des différents types de fibres musculaires sont représentées sur la **figure 23**.



**Figure 23 :** Histogramme des CSA des différents types de fibres musculaires pour les groupes CONT et HH.

\*\*\*,  $P < 0,001$  indique une différence significative entre les groupes CONT et HH.

aaa,  $P < 0,001$  indique une différence significative entre les fibres musculaires de type I et IIA pour un même groupe.

bbb,  $P < 0,001$  indique une différence significative entre les fibres musculaires de type I et hybrides pour un même groupe.

ccc,  $P < 0,001$  indique une différence significative entre les fibres musculaires de type IIA et hybrides pour un même groupe.

### 3. Paramètres mécaniques musculaires

Les paramètres mécaniques du muscle entier et ceux des UM «en-séries» sont reportés dans le **tableau 8**.

	Muscle entier		Unité motrice		
	CONT (n = 13)	HH (n = 9)	CONT (n = 19)	HH (n = 15)	
			S (n = 19)	S (n = 11)	F (n = 4)
$P_t$ (mN)	233 ± 11,3	109,3 ± 8,2 ***	10,5 ± 0,5	6 ± 1 ***	7 ± 3
$P_0$ (mN)	1478 ± 110,5	478,1 ± 44,2 ***	58,2 ± 4,1	25,6 ± 3,7 ***	22,7 ± 7,7
$P_t/MWW$ (mN.mg <sup>-1</sup> )	1,347 ± 0,55	1,169 ± 0,11	-	-	-
$P_0/MWW$ (mN.mg <sup>-1</sup> )	9,36 ± 0,9	5,18 ± 0,6 **	-	-	-
TTP (ms)	67,4 ± 1,9	58 ± 3,9 *	63,47 ± 2,8	57,14 ± 2,9	32,6 ± 5,8 ¶¶
HRT (ms)	67,3 ± 4,4	66,8 ± 6,4	75,43 ± 6,2	87 ± 5,5	36,9 ± 6,7 ¶¶¶
$P_{20}/P_0$	0,85 ± 0,02	0,63 ± 0,03 ***	0,88 ± 0,03	0,75 ± 0,03 **	0,52 ± 0,16 ¶

**Tableau 8 :** Propriétés contractiles du muscle soleus et des UM «en-séries» lentes (S) et rapides (F).

$P_t$  : Force maximale développée lors d'une contraction en secousse ;  $P_0$  : force maximale développée lors d'une contraction tétonique ; MWW : masse du muscle ; TTP : temps de contraction ; HRT : temps de demi-relaxation ;  $P_{20}$  : force tétonique développée pour une fréquence de stimulation de 20 Hz. \*\*,  $P < 0,01$  avec le groupe CONT. Les symboles (¶) indiquent une différence significative entre les valeurs des paramètres mesurés pour les UM lentes et pour les UM rapides pour le groupe HH, ¶,  $P < 0,05$ ; ¶¶,  $P < 0,01$ ; ¶¶¶,  $P < 0,001$ .

Les valeurs de  $P_t$ , de  $P_0$ , du rapport  $P_0/MWW$ , de TTP et du rapport  $P_{20}/P_0$  sont diminués pour les muscles du groupe HH par rapport aux muscles du groupe CONT. Les pourcentages de diminution sont respectivement de - 53%, - 68 %, - 45 %, - 14 % et - 26 %.

Pour les muscles du groupe CONT, il n'a seulement été enregistré que des UM «en-séries» lentes ( $n = 19$ ) alors que dans le groupe HH, 11 UM «en-séries» lentes et 4 UM «en-séries» rapides ont été identifiées sur la base de leur propriétés contractiles, en référence aux critères de Burke et coll. (1973) et de Picquet et coll. (2000).

Les UM «en-séries» rapides des muscles du groupe HH présentent des valeurs significativement plus faibles : TTP - 43 %, HRT - 57 % et  $P_{20}/P_0$  - 31 % que celles observées pour les UM «en-séries» rapides des mêmes muscles. Les UM «en-séries» lentes des muscle du groupe HH ont des valeurs significativement plus petites :  $P_t$  - 43 %, le  $P_0$  - 56 % et  $P_{20}/P_0$  - 15 % que celles observées pour les UM «en-séries» lentes des muscles du groupe CONT.

## **B. EFFETS DE L'HH SUR LES CARACTERISTIQUES DE DECHARGE DES OTG**

Les propriétés électrophysiologiques des OTG ont été étudiées pour les groupes CONT ( $n = 13$  rats) et HH ( $n = 9$  rats). Dans chaque expérience, entre 1 et 5 fibres afférentes Ib étaient isolées pour le groupe CONT et entre 1 et 7 fibres afférentes Ib pour le groupe HH. Les OTG enregistrés, pour le groupe CONT, étaient activés par 1 à 5 UM «en-séries», et par 1 à 7 UM pour le groupe HH. Vingt-trois et 28 couples OTG/UM «en-séries» ont été étudiés respectivement dans les groupes CONT et HH.

### **1. Vitesses de conduction de la fibre afférente Ib**

Il n'y a pas de différence significative entre les vitesses de conduction des fibres afférentes Ib après 14 jours d'HH. Les vitesses relevées sont respectivement de  $36,8 \pm 3,2$  m.s<sup>-1</sup> pour le groupe CONT et de  $37,4 \pm 1,9$  m.s<sup>-1</sup> pour le groupe HH.

## 2. Paramètres électrophysiologiques

La réponse des OTG en réponse à une contraction **tétanique non fusionnée** (fréquence de stimulation de 20 Hz) montre un driving 1:1 (Jami et al. 1985) pour les 4 UM «en-séries» rapides du groupe HH. La réponse de type driving 1:1 correspond à une formation d'un potentiel d'action pour chaque oscillation de la force.

A l'inverse, durant les contractions tétaniques fusionnées des UM «en-séries» lentes, les OTG ont une réponse typique, illustrée par la **figure 24**. Par conséquent, les réponses des OTG aux contractions des UM «en-séries» rapides pour des fréquences de stimulation de 20 Hz ont été enlevées de l'analyse statistique. De plus, les valeurs de pic dynamique (PD) et de décharge statique (DS) sont similaires entre elles en réponse à des contractions tétaniques fusionnées des UM «en-séries» HH rapides et lentes. Donc, nous avons regroupés ces valeurs pour n'avoir qu'un groupe de paramètres de réponses (PD et DS) pendant les contractions tétaniques fusionnées.

### 2.1. Pic dynamique (PD)

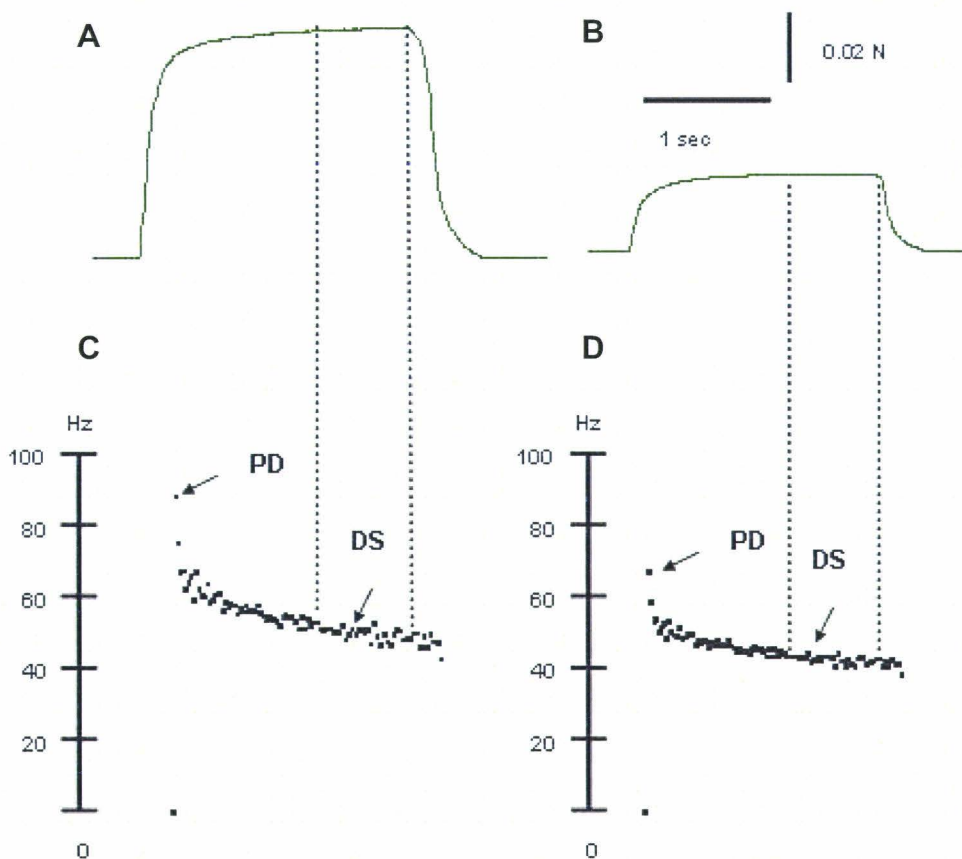
Après une période de 14 jours d'HH, le PD de la réponse d'un OTG à la contraction d'une seule UM «en-séries» est significativement plus petit ( $P < 0,05$ ) que celui observé pour le groupe CONT (**Figure 24**), cela uniquement pour des fréquences de stimulation maximales. A une fréquence de stimulation de 80 Hz, nous obtenons respectivement les valeurs suivantes :  $102 \pm 18$  Hz et  $67 \pm 8$  Hz pour les groupes CONT et HH. A une fréquence de stimulation de 100 Hz, nous observons la même diminution (CONT :  $110 \pm 20$  Hz, HH :  $66 \pm 6$  Hz). Le PD n'est pas modifié entre les réponses enregistrées des groupes CONT et HH pour des fréquences de stimulation de 20 Hz et 40 Hz.

### 2.2. Décharge statique (DS)

Après une période de 14 jours d'HH, la DS des OTG n'est pas modifiée quelles que soient les fréquences de stimulation (**Figure 24**). Pour le groupe CONT, ces valeurs sont respectivement de  $42,3 \pm 6,2$  ;  $42,4 \pm 7,1$  ;  $42,4 \pm 7,5$  et  $40 \pm 8,8$  Hz pour des fréquences de stimulation de 20, 40, 80 et 100 Hz. Pour le groupe HH, ces valeurs sont respectivement de

35,9 ± 3,7 ; 38,7 ± 3,7 ; 42 ± 3,9 et 39,8 ± 3,8 Hz pour des fréquences de stimulation de 20, 40, 80 et 100 Hz.

Comme précédemment décrit sur le Chat par Jami et Petit (1976a), les valeurs de ces paramètres obtenues chez les animaux CONT, sont très hétérogènes et dispersées. Après une période de 14 jours d'HH, la dispersion de ces valeurs reste présente, bien qu'elle soit réduite par rapport au groupe CONT. Nous avons donc choisi de nous focaliser uniquement sur la sensibilité dynamique et la sensibilité statique pour quantifier objectivement les propriétés de décharge des OTG, puisque que ces paramètres sont moins dépendants des UM «en-séries» et de la jonction myo-tendineuse (JMT), ces deux facteurs étant modifiés par une période d'HH.



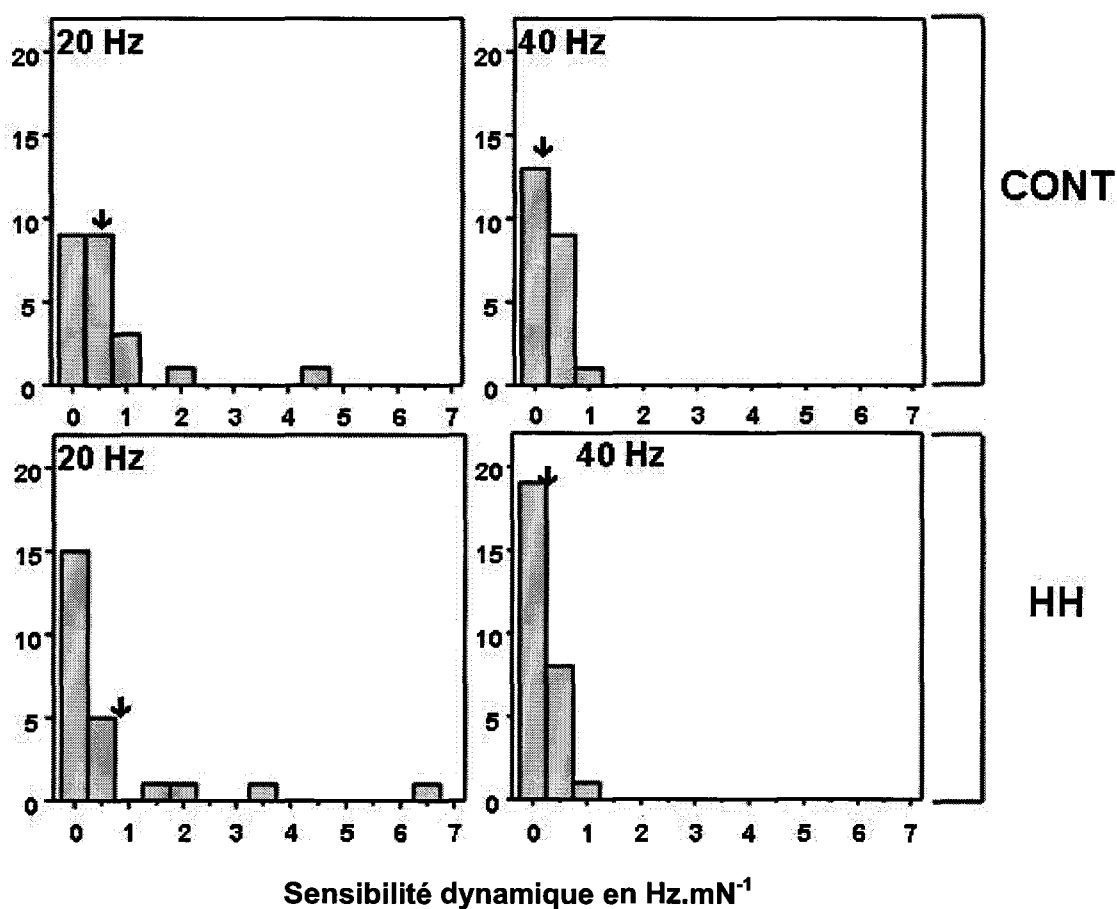
**Figure 24 :** Exemples de contractions téaniques d'une UM «en-séries» contrôle (A) et d'une UM «en-séries» HH (B) et les décharges des OTG contrôle (C) et HH (D) qui leurs sont liées. PD : pic dynamique ; DS : décharge statique.

### 3. Sensibilités de l'OTG

#### 3.1. Sensibilité dynamique (SD)

Comme nous l'avons déjà présenté précédemment, la SD est le rapport entre la pente de diminution de décharge en fréquence instantanée entre le pic dynamique et le potentiel d'action suivant et la pente d'établissement de la force mesurée durant le même intervalle de temps (Davies et al. 1995).

#### Nombre de fibres

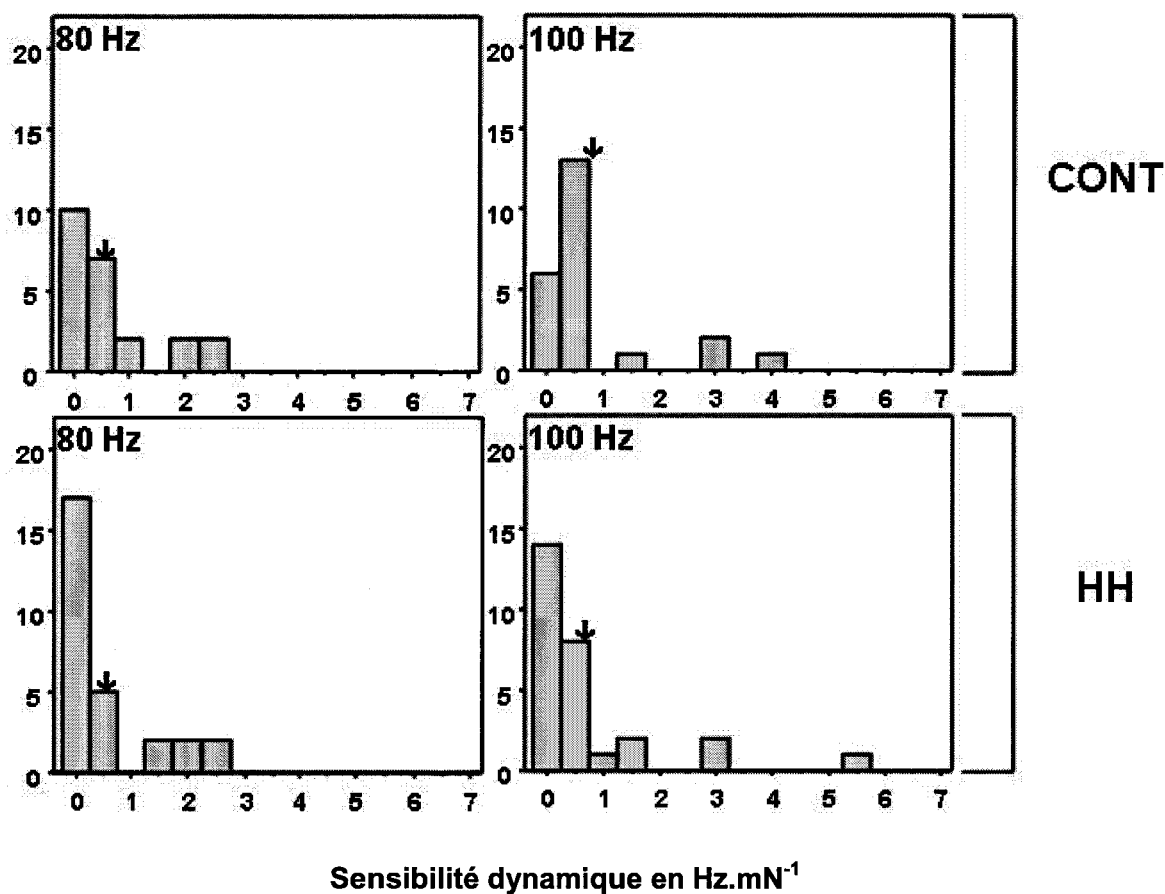


**Figure 25 :** Histogrammes de répartition de la sensibilité dynamique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 20 et 40 Hz. En abscisse la sensibilité dynamique en Hz.mN<sup>-1</sup> et en ordonnée le nombre de couple OTG/UM. La flèche noire indique la valeur de la moyenne.



Après une période de 14 jours d'HH, la SD de la réponse des OTG est similaire à celle observée pour les OTG du groupe CONT. Pour le groupe CONT, ces valeurs sont respectivement de  $0,63 \pm 0,13$  Hz;  $0,43 \pm 0,09$  Hz;  $0,65 \pm 0,13$  Hz et  $0,78 \pm 0,16$  Hz pour des fréquences de stimulation de 20, 40, 80 et 100 Hz. Pour le groupe HH, ces valeurs sont respectivement de  $0,82 \pm 0,17$  Hz;  $0,32 \pm 0,06$  Hz;  $0,56 \pm 0,11$  Hz et  $0,74 \pm 0,14$  Hz pour des fréquences de stimulation de 20, 40, 80 et 100 Hz. La répartition des sensibilités dynamiques pour les différentes fréquences de stimulation et pour les groupes est illustrée par les figures 25 et 26.

Nombre de fibres

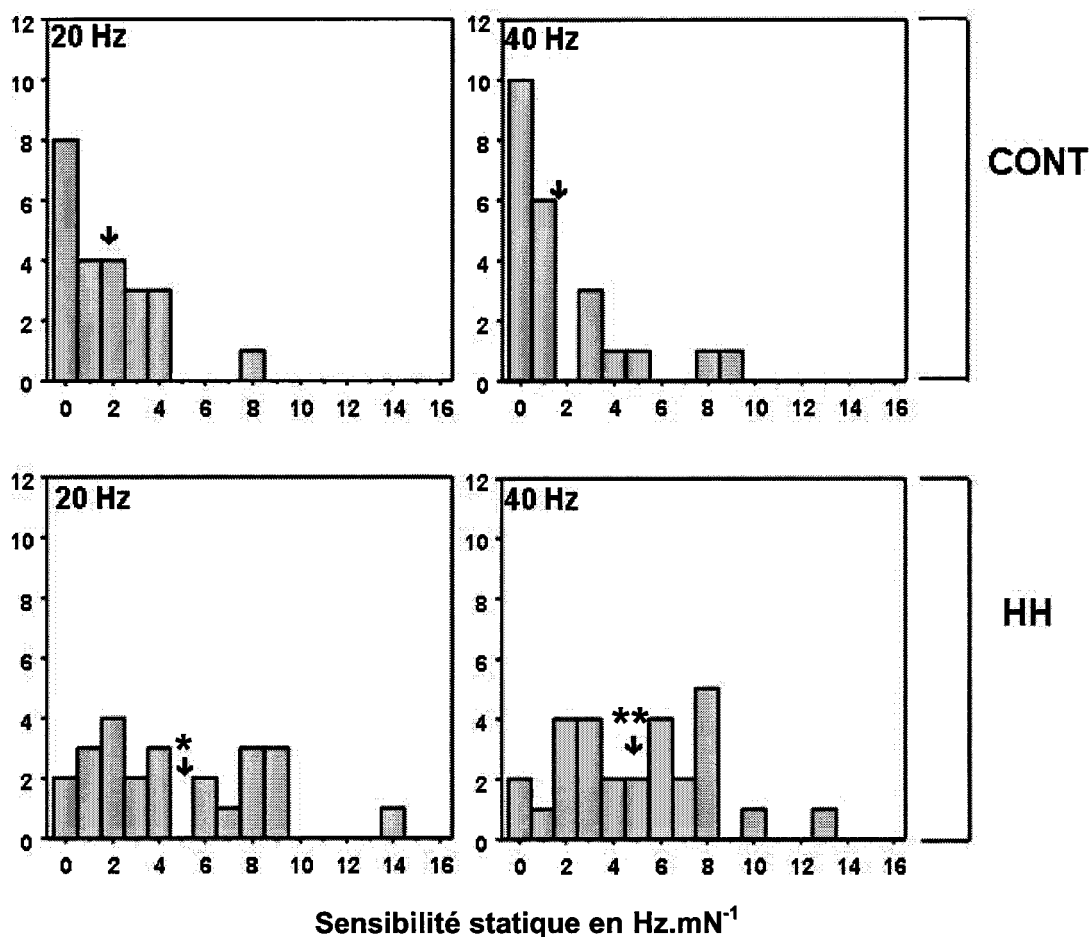


**Figure 26 :** Histogrammes de répartition de la sensibilité dynamique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 80 et 100 Hz. En abscisse la sensibilité dynamique en Hz.mN<sup>-1</sup> et en ordonnée le nombre de couple OTG/UM. La flèche noire indique la valeur de la moyenne.

### 3.2. Sensibilité statique (SS)

Après une période de 14 jours d'HH, la SS de la réponse des OTG est significativement augmentée par rapport à celle observée pour les réponses des OTG du groupe CONT. Les pourcentages d'augmentation sont les suivants : +111,6 % à 20 Hz de fréquence de stimulation ( $P < 0,05$ ), +125,9 % à 40 Hz de fréquence de stimulation ( $P < 0,01$ ), +118,7 % à 80 Hz de fréquence de stimulation ( $P < 0,01$ ) et +91,9 % à 100 Hz de fréquence de stimulation ( $P < 0,05$ ).

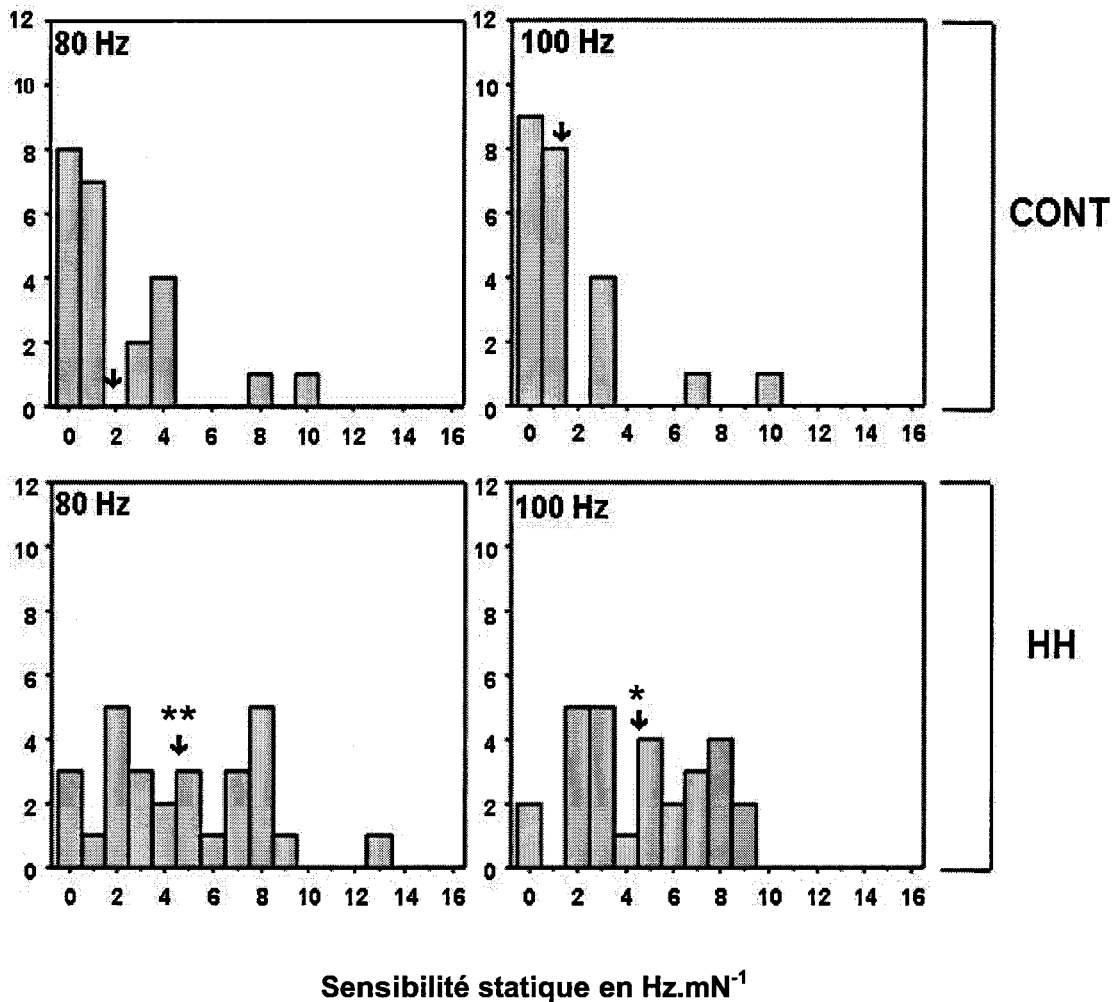
#### Nombre de fibres



**Figure 27 :** Histogrammes de répartition de la sensibilité statique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 20 et 40 Hz. En abscisse la sensibilité statique en Hz.mN<sup>-1</sup> et en ordonnée le nombre de couple OTG/UM. La flèche noire indique la valeur de la moyenne. \*,  $P < 0,05$  et \*\*,  $P < 0,01$  indiquent une différence significative avec le groupe CONT

Pour la fréquence de stimulation de 20 Hz, seules les réponses des OTG à des contractions fusionnées ont été conservées pour l'analyse (justification page 105). La répartition des sensibilités dynamiques pour les différentes fréquences de stimulation et pour les groupes est illustrée par les *figures 27* et *28*.

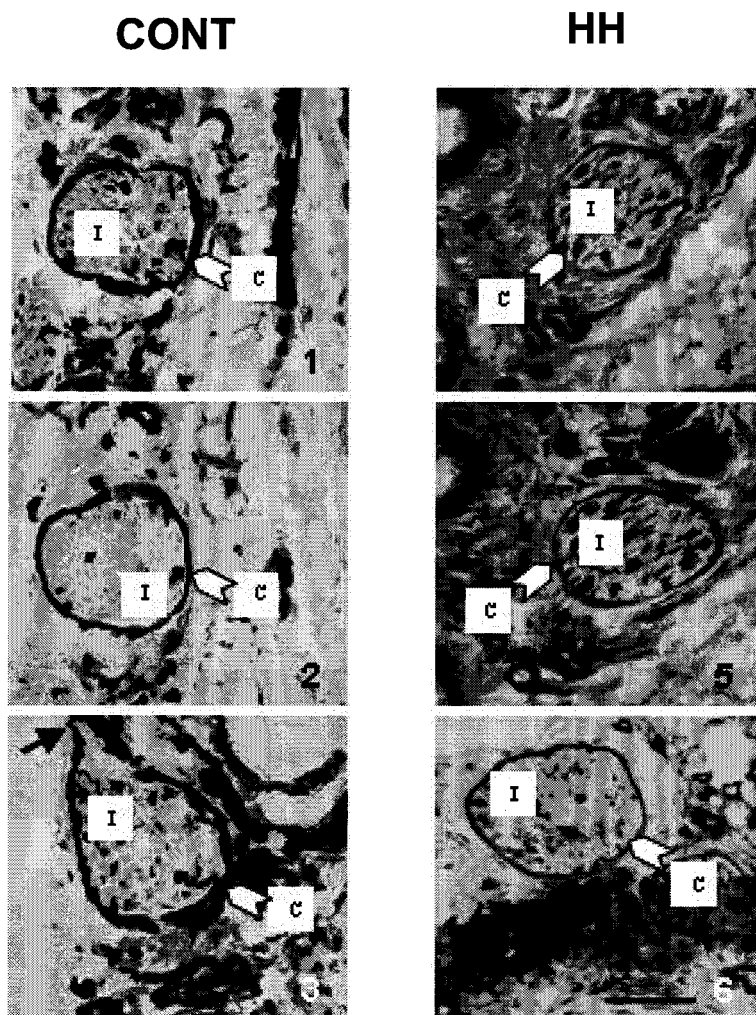
Nombre de fibres



**Figure 28 :** Histogrammes de répartition de la sensibilité statique des OTG des groupes CONT et HH pour les fréquences de stimulation de 80 et 100 Hz. En abscisse la sensibilité statique en Hz.mN<sup>-1</sup> et en ordonnée le nombre de couple OTG/UM. La flèche noire indique la valeur de la moyenne. \*, P < 0,05 et \*\*, P < 0,01 indiquent une différence significative avec le groupe CONT

## B. EFFETS DE L'HH SUR LES PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DES OTG

Les propriétés morphologiques de 9 et 19 OTG ont été respectivement analysées pour les groupes CONT et HH. La **figure 29** présente des coupes sériées dans la partie médiane d'un OTG CONT et d'un OTG HH. Les lettres I indiquent l'espace intracapsulaire, les lettres C indiquent la capsule. La flèche noire de la photographie 3 indique l'excroissance capsulaire de sortie de la fibre afférente Ib. Pour les deux OTG présentés sur la figure ci-dessous, la capsule apparaît noire et le collagène intracapsulaire apparaît gris.



**Figure 29 :** Photographies en microscopie optique de coupes transversales sériées dans la partie médiane d'un OTG CONT et d'un OTG HH. La barre d'échelle est égale à 40  $\mu$ m.

Les valeurs des paramètres morphologiques sont récapitulées dans le **tableau 9**. Après une période d'HH, le rapport longueur de l'OTG / longueur du muscle et le rapport diamètre de l'OTG / longueur de l'OTG sont inchangés. La longueur de l'OTG, la surface capsulaire de l'OTG, la surface intracapsulaire de l'OTG et la surface totale de l'OTG sont identiques pour les groupes CONT et HH. Le rapport surface totale de l'OTG / surface musculaire est augmenté de 16,8 fois, passant de  $0,058 \pm 0,014$  pour le groupe CONT à  $1,03 \pm 0,3$  pour le groupe HH.

	CONT (n = 9)	HH (n = 19)
$\frac{\text{Longueur de l'OTG}}{\text{Longueur du muscle}}$	$2,934 \pm 0,403$	$3,507 \pm 0,214$
$\frac{\text{Diamètre de l'OTG}}{\text{Longueur de l'OTG}}$	$2,731 \pm 0,384$	$2,559 \pm 0,35$
Longueur de l'OTG ( $\mu\text{m}$ )	$1041 \pm 143$	$968,6 \pm 137,1$
Surface capsulaire de l'OTG ( $\mu\text{m}^2$ )	$1834 \pm 505,3$	$2330 \pm 349$
Surface intracapsulaire de l'OTG ( $\mu\text{m}^2$ )	$3844 \pm 1258$	$5915 \pm 1227$
Surface totale de l'OTG ( $\mu\text{m}^2$ )	$5678 \pm 1677$	$8245 \pm 1516$
Surface totale de l'OTG / Surface du muscle	$0,058 \pm 0,014$	$1,03 \pm 0,3^{**}$

**Tableau 9 :** Paramètres morphologiques du muscle soleus et des OTG pour les groupes CONT et HH. \*\*,  $P < 0.01$  différence significative avec le groupe CONT.

## II. EFFETS DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES

Seront exposés dans cette partie, les données concernant les acides aminés neurotransmetteurs obtenues par HPLC et concernant l'expression des sous-unités des récepteurs glycine et NMDA obtenues par western blot pour les animaux contrôles et les animaux soumis à 7 et 14 jours d'HH.

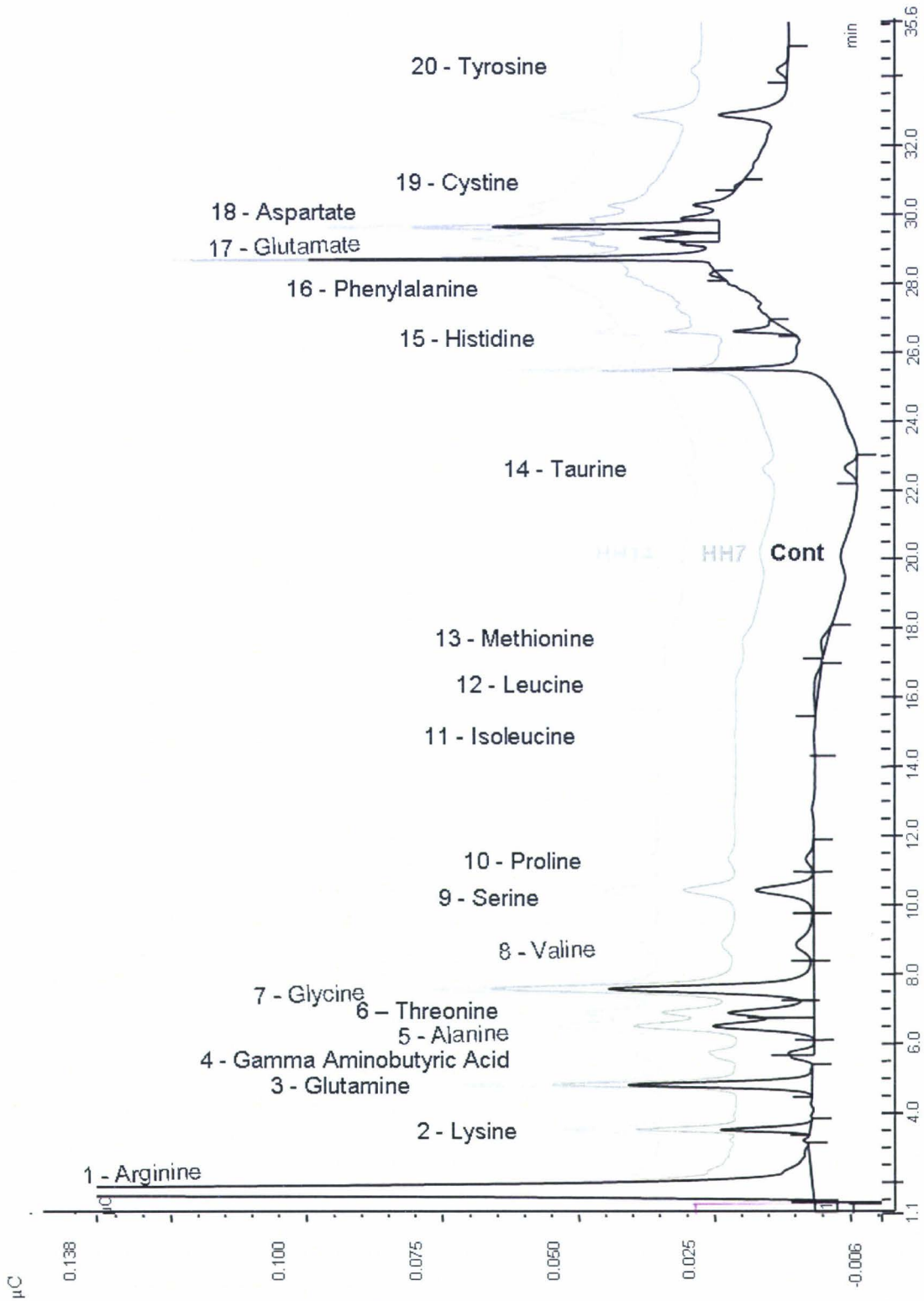
### A. QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES

#### 1. Concentration de protéines

La concentration de protéines, exprimée en  $\mu\text{g}$  de protéine par  $\mu\text{l}$ , présente dans les échantillons ne varie pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes CONT ( $14,08 \pm 0,96$ ), HH7 ( $12,27 \pm 0,94$ ) et HH14 ( $11,92 \pm 0,68$ ).

#### 2. Chromatogrammes

Les chromatogrammes obtenus sont de même allure que ceux de la **figure 30**, les 20 acides aminés identifiés apparaissent sur le chromatogramme en fonction de leur temps de rétention dans la colonne de l'HPLC. Ce temps de rétention varie avec la complexité des acides aminés et leur pH. Les acides aminés identifiés grâce à leur standard, sortent de la colonne dans l'ordre suivant : arginine, lysine, glutamine, GABA, alanine, thréonine, glycine, valine, sérine, proline, isoleucine, leucine, méthionine, taurine, histidine, phénylalanine, glutamate, aspartate, cystine et tyrosine. La ligne d'intégration a été uniquement laissée sur le chromatogramme contrôle. L'intégration automatique de chaque pic de chaque chromatogramme a été vérifiée manuellement. La fiabilité de la droite d'intégration a été vérifiée pour chaque chromatogramme et était toujours supérieure à 95 %. L'échelle de la **figure 30** a été volontairement choisie pour faire apparaître au mieux l'ensemble des pics correspondant aux différents acides aminés. Pour l'analyse de chaque pic, l'échelle a été adaptée afin de permettre une vérification précise des chromatogrammes.



**Figure 30 :** Exemples d'un chromatogramme pour chaque groupe CONT, HH7 et HH14. En abscisse, le temps et en ordonnée les variations du courant en  $\mu\text{C}$ .

### 3. Acides aminés et neurotransmetteurs

Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{M}.\mu\text{l}.\mu\text{g}^{-1}$ . L'analyse de variances en mesures répétées des niveaux segmentaires et des groupes, a révélé des différences significatives entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes (CONT, HH7 et HH14) pour l'alanine, l'arginine, l'aspartate, la cystine, le GABA, le glutamate, la glycine, la lysine, la taurine, la thréonine et la tyrosine (**Tableau 10**). Les autres acides aminés ne présentent aucune variation entre les segments et entre les groupes.

Groupe	CONT		HH7		HH14	
	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>
<b>Niveau segmentaire</b>						
<b>Alanine (*)</b>	0,53 ± 0,075	0,47 ± 0,045	0,49 ± 0,058	0,55 ± 0,037	0,54 ± 0,046	0,53 ± 0,033
<b>Arginine (*)</b>	6,6 ± 0,63	6,5 ± 0,4	6,3 ± 0,7	6,9 ± 0,3	5,6 ± 0,4	7,4 ± 0,7
<b>Aspartate (***)</b>	1,4 ± 0,16	1,5 ± 0,11	1,5 ± 0,19	1,8 ± 0,11	1,4 ± 0,08	1,8 ± 0,14
<b>Cystine (**)</b>	0,0091 ± 0,0022	0,0047 ± 0,0017	0,0082 ± 0,0012	0,003 ± 0,0006	0,008 ± 0,0014	0,0047 ± 0,0018
<b>GABA (**)</b>	0,12 ± 0,011	0,14 ± 0,014	0,13 ± 0,017	0,19 ± 0,015	0,14 ± 0,015	0,18 ± 0,013
<b>Glutamate (***)</b>	0,96 ± 0,109	1,06 ± 0,083	1,04 ± 0,142	1,33 ± 0,094	1,01 ± 0,067	1,21 ± 0,11
<b>Glycine (**)</b>	0,98 ± 0,113	1,14 ± 0,083	1,45 ± 0,111	1,45 ± 0,111	1,05 ± 0,054	1,36 ± 0,089
<b>Lysine (**)</b>	0,15 ± 0,012	0,17 ± 0,013	0,14 ± 0,021	0,2 ± 0,014	0,15 ± 0,011	0,18 ± 0,022
<b>Taurine (**)</b>	0,176 ± 0,02	0,185 ± 0,011	0,138 ± 0,021	0,197 ± 0,019	0,123 ± 0,007	0,166 ± 0,008
<b>Thréonine (***)</b>	0,17 ± 0,021	0,21 ± 0,019	0,15 ± 0,015	0,19 ± 0,018	0,15 ± 0,011	0,19 ± 0,018
<b>Tyrosine (**)</b>	0,03 ± 0,0046	0,046 ± 0,0034	0,03 ± 0,005	0,046 ± 0,0057	0,029 ± 0,0029	0,043 ± 0,0075

**Tableau 10 :** Valeurs des concentrations normalisées des acides aminés qui varient entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et les groupes CONT, HH7 et HH14. \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 et \*\*\*, P < 0,001.

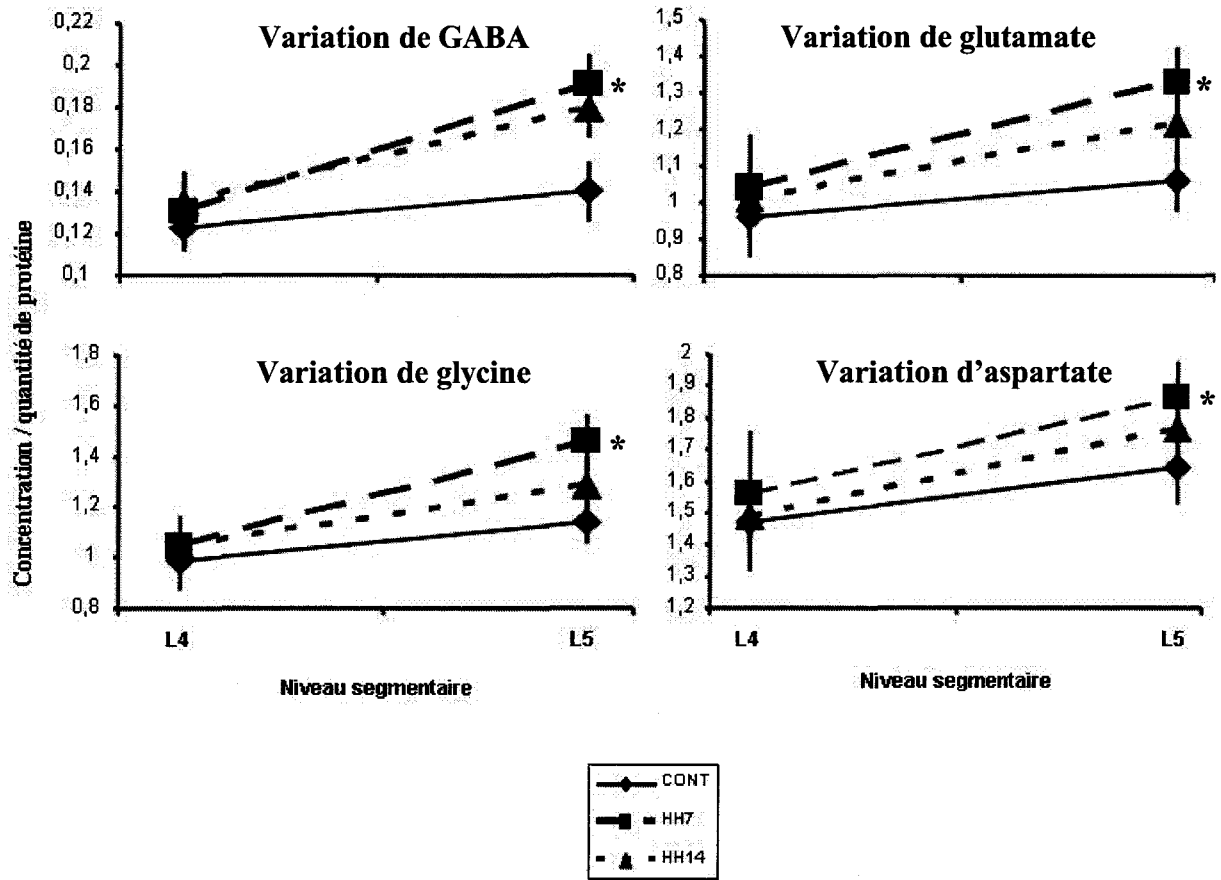


Parmi les acides aminés qui présentent des variations avec l'analyse de variance en mesures répétées, nous avons comparé par niveau segmentaire, les valeurs de chaque groupe.

**Au niveau segmentaire L<sub>4</sub>**, il n'y a aucune différence entre les groupes CONT, HH7 et HH14 pour les concentrations normalisées des acides aminés précédemment cités.

**Au niveau segmentaire L<sub>5</sub>**, parmi les acides aminés précédemment cités, seuls le glutamate, l'aspartate, le GABA et la glycine présentent des différences significatives entre les 3 groupes. Une période de 7 jours d'HH augmente significativement les concentrations normalisées de ces quatre acides aminés (**figure 31**). En revanche, une période de 14 jours d'HH, ne provoque pas de variation significative de ces quatre acides aminés avec le groupe CONT. Il n'y a pas non plus de différence significative entre 7 et 14 jours d'HH.

Afin d'évaluer une possible modification de la balance entre les neurotransmetteurs inhibiteurs (glycine et GABA) et excitateurs (glutamate et aspartate), nous avons normalisé les valeurs de ces quatre neurotransmetteurs pour le groupe HH7 respectivement à l'aide des valeurs du groupe CONT. Les données ainsi obtenues, exprimées en pourcentage de variation, ont aussi été comparées statistiquement deux à deux et ne présentent aucune différence.



**Figure 31 :** Evolution des concentrations normalisées des neurotransmetteurs contenus dans les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> pour les groupes CONT, HH7 et HH14. \*, P < 0,05 indique une différence significative entre les groupes CONT et HH7.

## B. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DES RECEPTEURS GLYCINE ET NMDA

### 1. Concentration de protéines

La concentration de protéines, exprimée en  $\mu\text{g}$  de protéine par  $\mu\text{l}$ , et présente dans les échantillons ne varie pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes CONT ( $4,86 \pm 0,57$ ), HH7 ( $5,41 \pm 0,58$ ) et HH14 ( $5,26 \pm 0,49$ ).

### 2. Quantification de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des récepteurs glycine

L'expression, mesurée par densitométrie et exprimée en unité arbitraire, de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine, normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$  tubuline, ne varie pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes CONT (L<sub>4</sub> :  $2,04 \pm 0,28$  et L<sub>5</sub> :  $2,11 \pm 0,37$ ), HH7 (L<sub>4</sub> :  $2,12 \pm 0,32$  et L<sub>5</sub> :  $2,03 \pm 0,27$ ) et HH14 (L<sub>4</sub> :  $2,07 \pm 0,22$  et L<sub>5</sub> :  $2,2 \pm 0,45$ ) (*figure 32*).



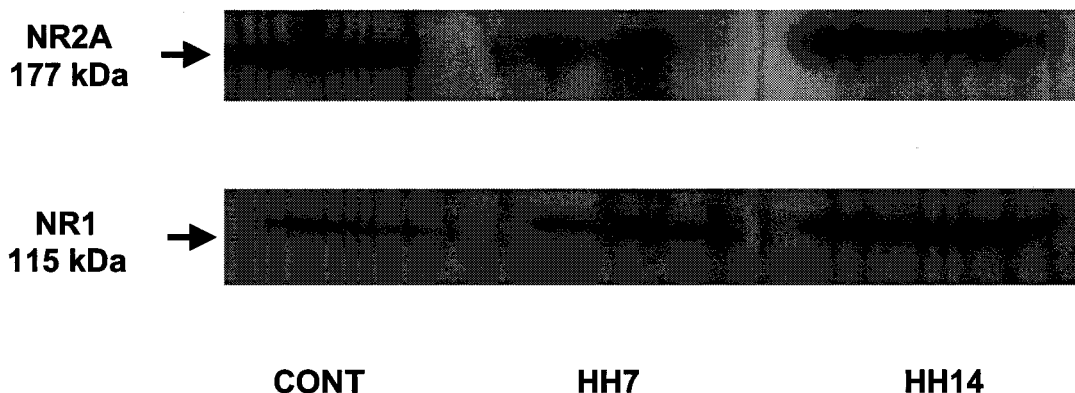
**Figure 32 :** Expression des protéines de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine sur SDS PAGE.

### 3. Quantification de l'expression des sous unités NR1 et NR2A des récepteurs NMDA

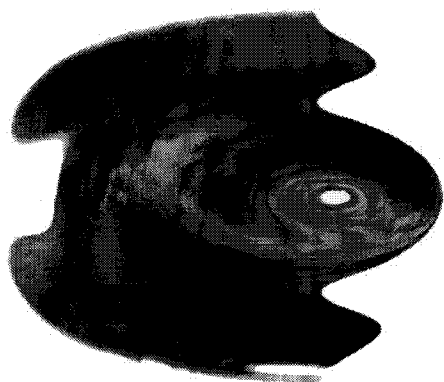
L'expression, mesurée par densitométrie et exprimée en unité arbitraire, des sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  du récepteur NMDA, normalisées par rapport à l'expression de la  $\beta$  tubuline, ne varie pas entre les niveaux segmentaires  $L_4$  et  $L_5$  et entre les groupes CONT, HH7 et HH14 (**figure 33**). Les sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  correspondent respectivement aux sous-unités NR2A et NR1 du récepteur NMDA. Leurs poids moléculaires sont respectivement de 177 kDa et 115 kDa.

Pour NR2A : CONT ( $L_4$  :  $2,12 \pm 0,20$  et  $L_5$  :  $2,17 \pm 0,19$ ), HH7 ( $L_4$  :  $2,21 \pm 0,22$  et  $L_5$  :  $2,14 \pm 0,21$ ) et HH14 ( $L_4$  :  $2,13 \pm 0,16$  et  $L_5$  :  $2,23 \pm 0,38$ ).

Pour NR1 : CONT ( $L_4$  :  $1,88 \pm 0,18$  et  $L_5$  :  $1,95 \pm 0,23$ ), HH7 ( $L_4$  :  $2,01 \pm 0,22$  et  $L_5$  :  $1,99 \pm 0,27$ ) et HH14 ( $L_4$  :  $1,92 \pm 0,12$  et  $L_5$  :  $1,96 \pm 0,15$ ).



**Figure 33** : Expression des protéines des sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  du récepteur NMDA sur SDS PAGE.



## Discussion

## I. EFFETS DE L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE SUR LES ORGANES TENDINEUX DE GOLGI

Après 14 jours d'HH, les poids corporels des animaux (BW), les masses des muscles (MWW) et le rapport MWW/BW, considéré comme un marqueur de l'atrophie, sont également diminués. De plus la CSA de tous les types de fibres musculaires est également réduite. Les paramètres enregistrés au cours de contractions musculaires en secousses simples et contractions musculaires téaniques, ont confirmé un changement de propriétés mécaniques.

En effet, les valeurs de forces maximales isométriques, enregistrées pour des contractions en secousses ( $P_i$ ) ou téaniques ( $P_0$ ) sont diminuées par l'HH. De même, la force maximale en contraction téanique normalisée à la masse musculaire ( $P_0/MWW$ ) est diminuée après HH. Les critères cinétiques (TTP et  $P_{20}/P_0$ ) sont diminués après HH. L'ensemble de ces critères reflète l'évolution du muscle soleus dans le sens lent → rapide après HH. Ces données amplement décrites et déjà discutées dans la littérature (Desplanches et coll. 1987, Edgerton et Roy 1996, Falempin et coll. 1990, Falempin et In-Albon 1999, Fitts et coll. 1986, Ohira et coll. 1992, Pette et Staron 1997, Talmadge et coll. 1996a, Talmadge 2000, Templeton et coll. 1984, 1988, Winiarski et coll. 1987), attestent de la transformation du muscle soleus dans notre étude.

### A. COMPARAISON DES PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DES OTG

La longueur, la surface totale, la surface intracapsulaire et la surface capsulaire des OTG demeurent inchangées après une période de 14 jours d'HH. Le rapport diamètre de l'OTG sur longueur de l'OTG qui est considéré comme un marqueur des contraintes mécaniques que peut subir l'OTG (Bridgman 1970, Jami 1992), reste inchangé après 14 jours d'HH. Jusqu'à présent, Il n'existait aucune donnée concernant les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des OTG après une période d'HH. Des modifications de la morphologie des OTG avaient déjà été décrites au cours d'autres situations expérimentales.

Józsa et coll. (1988) ont observé après une ténotomie ou une immobilisation du muscle en position raccourcie, un épaissement de la capsule de l'OTG lié à une diminution de l'espace intracapsulaire. La différence observée, entre l'étude de Józsa et coll. (1988) et la nôtre, sur les surfaces capsulaires et intracapsulaires des OTG peut avoir plusieurs explications.

La première explication est méthodologique. Dans les travaux de Józsa et coll. (1988), le groupe de récepteurs servant de contrôles provenait de la patte contralatérale à celle ayant subi le traitement (immobilisation ou ténotomie). Les muscles de la patte contrôle ont durant toute la période de traitement permis de compenser les effets du traitement sur la patte contralatérale (Heslinga et coll. 1992).

La seconde explication possible tient probablement au fait que lors de l'immobilisation, il y a bien une hypokinésie (diminution de l'activité motrice) pour la patte immobilisée qui peut être comparée à celle de la suspension des membres postérieurs mais il n'y a pas réellement d'hypodynamie (absence de charge corporelle) puisque l'animal repose sur ses quatre pattes et se déplace librement à l'aide des trois pattes libres (Hnik et coll 1985). Pour la ténotomie, l'hypokinésie est plus forte qu'en condition de suspension des membres postérieurs (Kawano et coll. 2004), et dans ce modèle l'hypodynamie est réelle puisque les muscles de la patte ténotomisée n'ont plus à supporter la charge corporelle. Les différents degrés d'hypodynamie-hypokinésie entre ces deux modèles expérimentaux peuvent expliquer les différences de résultats.

La troisième explication possible est matérielle. Dans l'étude de Józsa et coll. (1988) l'estimation de la surface capsulaire était indirecte par des mesures de son épaisseur en différents points, alors que dans notre étude nous avons directement calculé la surface capsulaire d'après la différence de mesures entre la surface totale de l'OTG et la surface intracapsulaire.

Le rapport surface de l'OTG sur la surface musculaire est augmenté 16,8 fois. L'évolution de ce rapport tient simplement au fait que la surface de l'OTG ne varie pas alors que la surface musculaire diminue en raison de l'atrophie du muscle après une période d'HH. L'augmentation de ce rapport a des conséquences au niveau fonctionnel que nous détaillerons dans la partie suivante.

## **B. CARACTERISTIQUES DE DECHARGES DES OTG APRES UNE PERIODE D' HH**

### **1. Les mesures directes : pic dynamique et décharge statique**

Comme nous l'avons déjà énoncé dans l'Introduction, les mesures des paramètres directs tels le pic dynamique et la décharge statique ne fournissent pas de données permettant de comparer plusieurs OTG. En effet, ces deux paramètres présentent une grande dispersion dans leurs valeurs, puisqu'ils sont directement influencés par de nombreux facteurs comme la force de l'UM «en-série», le rapport entre les fibres «en-parallèles» et «en-séries» de cette UM, la raideur de l'OTG, la raideur de la jonction myo-tendineuse (JMT), l'innervation du brin de collagène (Jami et Petit 1976). Donc nous nous intéresserons uniquement aux mesures de sensibilités, puisque ces deux paramètres sont normalisés par rapport à la force développée par l'UM «en-série».

### **2. La sensibilité dynamique (SD)**

Les valeurs de la SD ne sont pas modifiées après 14 jours d'HH. Les OTG qui possèdent une sensibilité dynamique élevée, comme cela a été décrit chez les OTG de Chat contrôlé par Davies et coll. (1995), la conservent donc après 14 jours d'HH. Cette sensibilité ne dépend pas seulement du taux de variation de force produit par l'UM «en-série» lors de la contraction, mais aussi des caractéristiques propres de l'OTG, comme sa raideur ou encore des propriétés ioniques des terminaisons nerveuses de la fibre Ib sur les brins de collagène intracapsulaires (Fukami et Wilkinson 1977, Proske et Gregory 1976). Il est donc possible de supposer que l'absence de modification de la SD après HH, en dépit des modifications des propriétés des UM «en-séries», est peut être la résultante de phénomènes opposés. Notre hypothèse est que le changement du phénotype et des propriétés mécaniques musculaires en général, et des UM «en-séries» en particulier, alliés aux changements des propriétés de la JMT sont peut être compensés par des modifications de l'innervation et les propriétés des brins de collagène intracapsulaires. L'étude des propriétés intrinsèques de l'OTG après une période d'HH ouvre un nouveau champ de perspectives, que nous détaillerons dans la partie consacrée aux perspectives.



### 3. La sensibilité statique (SS)

Les valeurs de la SS obtenues pour des contractions tétaniques fusionnées augmentent après une période de 14 jours d'HH. Ce résultat s'explique directement par la diminution des forces contractiles des UM «en-séries» et l'absence de variation de la décharge statique. La diminution de la force contractile des UM «en-séries» est classiquement observée après une période d'HH (Picquet et coll. 2000) et elle est corrélée à la diminution de CSA des différents types de fibres musculaires (Close 1972). En revanche le maintien de la décharge statique en dépit d'une force contractile diminuée est plus complexe à analyser. Si on écarte pour l'instant les hypothèses de modifications de propriétés intrinsèques des OTG après une période d'HH, nous pouvons supposer que l'augmentation de la SS est uniquement due à des paramètres musculaires et/ou tendineux. Les UM «en-séries» ont des fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles». La localisation de ces fibres les unes par rapport aux autres a une incidence sur le phénomène «unloading» (Horcholle-Bossavit et coll. 1989). Lors de la transformation des UM dans le sens lent → rapide, Picquet et coll. (2000) ont montré une hétérogénéisation des UM après une période d'HH. Une conséquence de ce phénomène est une diminution de la force et de la raideur qui peut être différente pour chacune des fibres musculaires d'une même UM. Pour les UM «en-séries», la balance entre les fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles», exprimée en terme de raideur et de force, est probablement modifiée après HH.

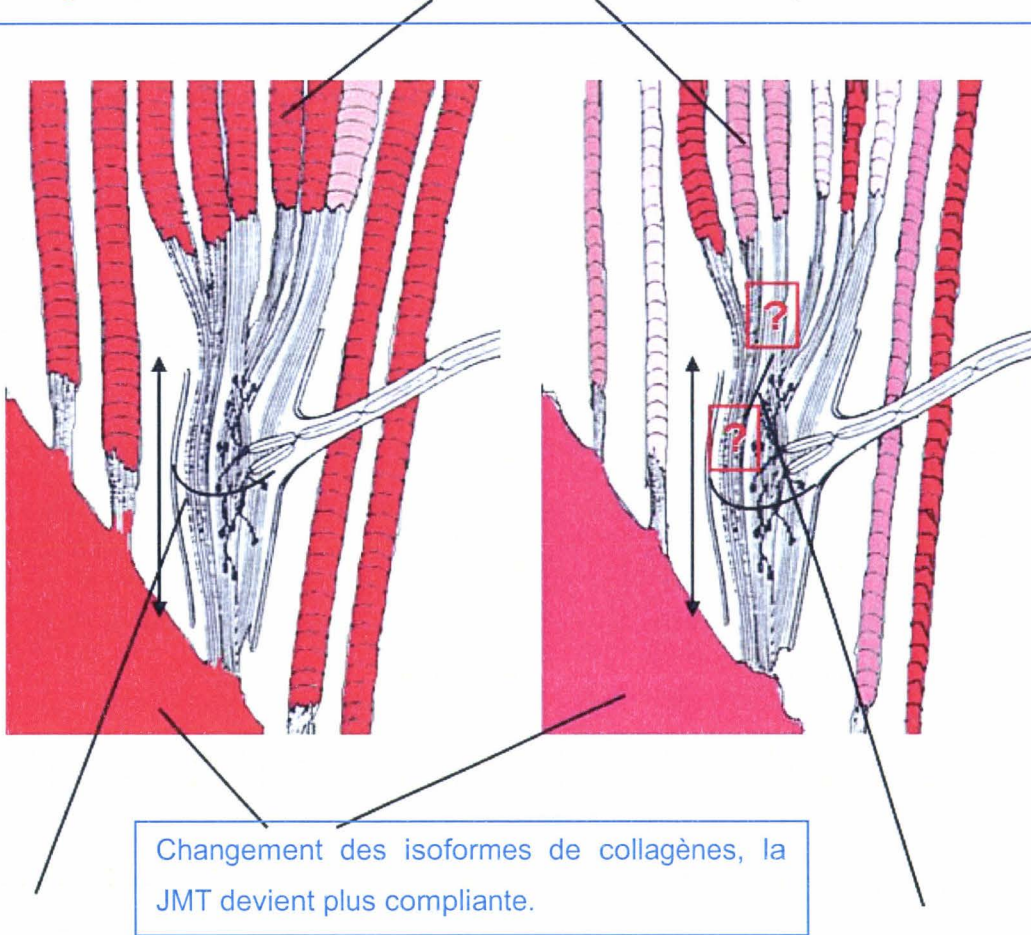
Un élément explicatif supplémentaire de la modification de cette balance est l'augmentation concomitante de la compliance du muscle, après une période d'HH, de la composante contractile (CC) et de la composante élastique série (CES) (**figure 5**). Cette augmentation de la compliance musculaire est due à la transition des isoformes des fibres musculaires dans le sens lent (raide) vers rapide (compliant) (Canon et Goubel 1995, Petit et coll. 1990, Picquet et coll. 2000) et à la transformation des isoformes de collagène de type I (raide) en type III (compliant) (Miller et coll. 2001). Dans ces conditions, l'OTG, dont la décharge statique est maintenue en dépit d'une force contractile plus faible, a une augmentation sa SS.

Bien sûr, comme pour la SD, il nous est impossible d'exclure que des modifications des propriétés intrinsèques des OTG telles que l'augmentation de la compliance des brins de collagène intracapsulaire ou encore une modification de l'innervation sensitive, jouent un rôle dans l'augmentation de la SS.

Un bilan des connaissances que nous avons des effets de l'HH sur l'environnement direct de l'OTG est présenté par la **figure 34** dans la **partie C**.

### C. BILAN DES EFFETS DE L'HH SUR LES OTG

Modifications de la typologie et des propriétés mécaniques musculaire, hétérogénéisation des UM et atrophie des fibres musculaires après HH.



Changement des isoformes de collagènes, la JMT devient plus compliant.

Aucun changement des caractéristiques morphologiques des OTG après 14 jours d'HH.

Nous n'avons aucune information concernant l'évolution de l'innervation des brins de collagène et les isoformes des brins de collagènes intracapsulaires après HH.

**Figure 34** : Bilan schématique des connaissances des effets de l'HH sur les OTG, le muscle et la jonction myo-tendineuse (JMT).

## II. NEUROTRANSMETTEURS MEDULLAIRES ET HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE

### *HH et Récepteurs glycine et NMDA*

L'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine, normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$  tubuline, ne varie pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes CONT, HH7 et HH14.

L'expression des sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  du récepteur NMDA, normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$  tubuline, ne varie pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes CONT, HH7 et HH14. Les sous-unités  $\epsilon 1$  et  $\xi 1$  correspondent respectivement aux sous-unités NR2A et NR1 du récepteur NMDA.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les changements dans la synthèse de NR2A peuvent moduler l'activité du récepteur NMDA (Wood et coll. 1996). La section de moelle épinière provoque, au niveau ventral, une augmentation de l'activité des récepteurs NR2A deux semaines après la lésion, avec un retour à des valeurs contrôles dans les 18 semaines qui suivent (Croul et coll. 1998). Après une lésion de la moelle épinière au niveau thoracique, l'expression de NR1 n'est pas modifiée ni après 24 heures ni après 1 mois post lésion. L'expression de NR2A n'est modifiée, à proximité de la lésion au niveau caudal, qu'après 1 mois post lésion (Grossman et coll. 2000). Ces auteurs suggèrent que l'expression de NR2A est principalement sous la dépendance des influences supraspinales. Ceci est renforcé par les travaux de Shapiro (1997) qui précise que les voies descendantes interrompues par les lésions de moelle épinière sont glutamatergiques. Nous supposons que l'absence de variation que nous observons a plusieurs raisons.

La première est un maintien des influences supraspinales qui ne sont pas interrompues au cours de l'HH. La seconde explication repose sur le fait qu'il faille des durées supérieures (1 mois) à nos durées (7 et 14 jours) de traitement pour observer des variations de l'expression de NR2A. Enfin la troisième explication repose sur les différences entre le modèle de section de moelle épinière et le modèle de Morey. Ce dernier, même s'il diminue les messages nerveux afférents et efférents (Kawano et coll. 2004), préserve

l'intégrité du système neuromusculaire à la différence des modèles de section de moelle épinière.

### *HH et Neurotransmetteurs*

Le choix d'une approche biochimique de type HPLC sur fragments de moelle épinière entiers, ne nous permettait pas de faire une analyse localisée des acides aminés neurotransmetteurs présents dans la fente synaptique. A l'inverse, il nous donnait une indication de l'évolution de l'ensemble des acides aminés incluant des neurotransmetteurs présents dans deux niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub>.

Les concentrations de protéines ne varient pas entre les niveaux segmentaires L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub> et entre les groupes. Nous nous sommes donc servis de la concentration de protéines contenues dans chaque échantillon pour normaliser toutes les concentrations d'acides aminés obtenues par HPLC.

**Au niveau segmentaire L<sub>4</sub>**, il n'y a aucune différence entre les concentrations normalisées des acides aminés entre les 3 groupes. L'absence de modification des concentrations normalisées des neurotransmetteurs peut être liée au fait que le niveau segmentaire L<sub>4</sub> de la moelle épinière ventrale de rat contient les corps cellulaires des motoneurones (MN) des muscles EDL, TA et plantaris (Kawano et coll. 2004), muscles qui sont très peu modifiés par les conditions d'HH (Edgerton et Roy 1996).

**Au niveau segmentaire L<sub>5</sub>**, seuls le glutamate, l'aspartate, le GABA et la glycine présentent des différences significatives entre les 3 groupes. Une période de 7 jours d'HH augmente significativement les concentrations normalisées de ces quatre acides aminés. En revanche, une période de 14 jours d'HH, ne provoque pas de variation significative de ces quatre acides aminés. Il n'y a pas non plus de différence significative entre 7 et 14 jours d'HH. La partie ventrale du niveau segmentaire L<sub>5</sub> de la moelle épinière de rat contient les corps cellulaires des MN des muscles soleus, du gastrocnemius médian et du gastrocnemius latéral (Kawano et coll. 2004), qui sont les muscles présentant les transformations les plus importantes après HH (Edgerton et Roy 1996, Falempin et coll. 1990).

Les seuls acides aminés variant après une période de 7 jours d'HH, sont des acides aminés neurotransmetteurs qui sont admis comme étant les principaux en terme de

concentration et d'affinité avec les récepteurs post-synaptiques (Cupello 2003, Dingledine et coll. 1999, Legendre 2001). L'absence de variation, après 7 et 14 jours d'HH, de tous les acides aminés à l'exception des quatre principaux neurotransmetteurs, renforce notre hypothèse qui suppose que l'HH modifie la neurotransmission. En ce qui concerne la sérine, la taurine et l'alanine qui sont aussi des neurotransmetteurs, nous supposons que l'absence de variations dans leurs concentrations a plusieurs origines. Tout d'abord, cette absence de variation peut s'expliquer par le fait que ces acides aminés, outre la neurotransmission, sont impliqués dans d'autres voies métaboliques qui mettent en jeu des concentrations importantes de ces acides aminés. La fraction de ces acides aminés dédiée à la neurotransmission est donc très faible par rapport à leur quantité totale. La seconde raison repose sur le fait qu'en terme de quantité et d'affinité ces neurotransmetteurs ne sont pas les plus importants (Legendre 2001). Un autre élément vient corroborer notre hypothèse. En effet, l'absence de variation de glutamine, qui est le précurseur principal du glutamate (Balazs et coll. 1970) lui-même précurseur du GABA (Johnson 1972) indiquerait que la modification des concentrations normalisées de glutamate et de GABA provient uniquement d'une adaptation du métabolisme (augmentation de la synthèse et/ou diminution de la dégradation du glutamate et du GABA) de la neurotransmission et non du contenu du tissu nerveux en glutamine.

Les graphiques de la **figure 31** suggèrent qu'il y a une augmentation transitoire des quatre neurotransmetteurs (GABA, glycine, glutamate et aspartate) au cours des 7 premiers jours d'HH pour tendre à retrouver des valeurs proches des valeurs du groupe CONT à 14 jours d'HH. L'évolution des concentrations normalisées de ces quatre neurotransmetteurs au niveau segmentaire L<sub>5</sub> est le reflet de l'évolution observée par Kawano et coll. (2004), de l'activité des neurogrammes L<sub>5</sub> afférent et efférent ainsi que de l'activité électromyographique (EMG) du muscle soleus au cours d'une période de 14 jours d'HH. Ces auteurs ont observé une diminution instantanée des neurogrammes afférent et efférent et de l'activité EMG, qui demeurent faibles du début de la suspension jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour, instant à partir duquel, les trois activités augmentent pour retrouver leurs valeurs pré-suspension au bout de 14 jours. Ils ont lié les variations de l'activité des neurogrammes afférent et efférent et de l'EMG du soleus directement avec l'HH. Etant donné la similarité de l'évolution que nous observons et une localisation segmentaire identique (L<sub>5</sub>), nous pouvons supposer que les variations que nous enregistrons concernant ces quatre neurotransmetteurs sont dues à l'HH et donc en partie aux transformations de l'activité du muscle soleus.

Nous n'avons aucune donnée pouvant expliquer directement les raisons des modifications de ces quatre neurotransmetteurs au cours d'une période d'HH. Néanmoins,

les études réalisées chez le Chat et chez le Rat dans un modèle de section de moelle épinière au niveau thoracique inférieur, montrent des modifications des métabolismes de la glycine et GABA (DeLeon et coll. 1999, Edgerton et coll. 2001, Tillakaratne et coll. 2002).

Le modèle de section de moelle épinière (période minimale de 3 mois de traitement) est caractérisé par une suppression complète des informations supraspinales et de la commande motrice, associée à une diminution des informations afférentes musculaires et cutanées. Ce modèle diffère du nôtre, puisque l'HH consiste essentiellement en une perturbation des afférences musculaires et cutanées, tout en préservant l'intégrité du système neuromusculaire. Bien que ces deux modèles expérimentaux (HH et section de moelle épinière) soient différents, Talmadge et coll. (1996b) ont décrit une augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur glycine au niveau lombaire. Nous n'avons pas mis en évidence une telle augmentation. En conséquence, on peut expliquer cette disparité de résultats par des durées expérimentales différentes (HH : 7 et 14 jours) et (section de moelle épinière : 3 mois minimum).

Le métabolisme du glutamate et du GABA varie également dans le modèle de section de la moelle épinière. En effet la GAD<sub>67</sub>, c'est-à-dire l'isoforme prédominant au niveau ventral de la moelle épinière (Mackie et coll. 2003) de l'enzyme de synthèse du GABA à partir du glutamate augmente après plusieurs semaines de section de moelle épinière (Tillakaratne et coll. 2000, 2002). Si les auteurs montrent une augmentation de la synthèse de GABA, ils ne présentent en revanche aucune information concernant le turn over du glutamate. L'étude de Panter et coll. (1990) a montré une augmentation des concentrations extracellulaires des acides aminés neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs dans la zone de la lésion de moelle épinière. Liu et coll. (1991) attribuent ces augmentations des neurotransmetteurs excitateurs davantage aux changements d'activité neuronale qu'à la lésion en elle-même. Dans un autre modèle de déafférentation (rhizotomie) où la commande centrale est maintenue ainsi que l'activité motrice, il a été montré, chez le Rat, une augmentation de l'activité des voies sérotoninergiques alors que les voies noradrénergiques ne présentaient pas de variation (Wang et coll. 1991).

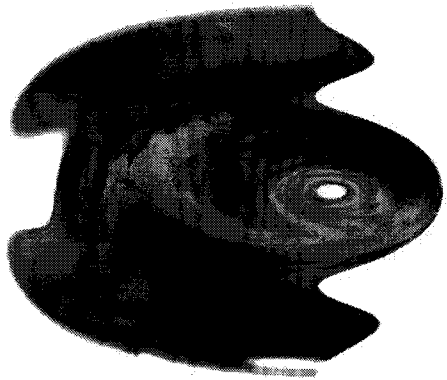
Il existe donc un lien direct entre les informations afférentes et efférentes reçues par la moelle épinière et les métabolismes des neurotransmetteurs. L'hypokinésie, due à une section de moelle épinière au niveau thoracique inférieur, augmente l'activité des métabolismes des neurotransmetteurs inhibiteurs (Edgerton et coll. 2001, Tillakaratne et coll. 2002) sans donner d'information sur le métabolisme de neurotransmetteurs excitateurs. D'autres études (Liu et coll. 1991, Panter et coll. 1990) sur la section de moelle épinière ont

montré en parallèle de l'augmentation du métabolisme des neurotransmetteurs inhibiteurs, une augmentation des concentrations extracellulaires des neurotransmetteurs excitateurs. De plus, l'interruption des informations afférentes, due à une rhizotomie, augmente l'activité du métabolisme de neurotransmetteurs excitateurs (Wang et coll. 1991).

*Conséquence fonctionnelle des variations des concentrations normalisées des neurotransmetteurs*

Parmi les quatre neurotransmetteurs qui ont des concentrations normalisées modifiées après une période de 7 jours d'HH, deux neurotransmetteurs sont excitateurs, le glutamate et l'aspartate et deux neurotransmetteurs sont inhibiteurs, la glycine et le GABA. La balance entre les neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs n'est apparemment pas modifiée puisque les augmentations respectives des excitateurs et des inhibiteurs sont identiques. Ceci implique également qu'il n'y a pas de variation de la balance entre la synthèse et la dégradation du GABA à partir du glutamate. L'ensemble de ces résultats ne permet pas d'évaluer précisément une modification fine et localisée de la balance entre excitateurs et inhibiteurs. Ces résultats fournissent seulement une indication de l'évolution de cette balance au cours des 7 jours d'HH sur l'ensemble d'un niveau segmentaire. Quoiqu'il en soit, si modification de la balance entre neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs il y a, cette dernière ne provoque pas un changement visible des concentrations normalisées.

En revanche, il est possible de supposer qu'il y a effectivement des modifications localisées des concentrations de neurotransmetteurs concernant uniquement les MN de muscles des membres postérieurs de rat. L'hypothèse de telles modifications expliquerait en partie les changements observés dans la locomotion sur tapis roulant de rats soumis à une période d'HH. En effet, les difficultés à se déplacer qu'éprouvent les Rats qui ont été suspendus, ainsi que les altérations des temps de phases d'appui et de transfert pourraient être en liaison avec une neurotransmission bouleversée aux niveaux des corps cellulaires de MN des muscles des membres postérieurs (Canu et coll. 2005, Canu et Falempin 1998).



## Conclusion et perspectives



Les approches, morphologique et électrophysiologique, que nous avons utilisées pour l'étude des OTG du muscle soleus de rat contrôle et soumis à 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie, nous ont permis de montrer, après 14 jours d'HH, une modification de la décharge des OTG en réponse à la contraction tétanique fusionnée d'une UM «en-série». Les OTG apparaissent donc plus sensibles après une période d'HH puisqu'ils conservent leur sensibilité dynamique élevée et qu'ils montrent une sensibilité statique augmentée. Après 14 jours d'HH, les OTG continuent à remplir leur fonction de capteur des variations de force musculaire. Le maintien du message afférent issu des OTG en dépit de la force contractile plus faible, pourrait modifier l'interaction de l'organisme avec son environnement. Le rôle des OTG dans un déclenchement précoce de l'atrophie musculaire semble peu probable puisque c'est l'atrophie qui semble à l'origine de leurs modifications de sensibilité statique.

Nous avons en partie attribué la modification de sensibilité statique à des facteurs périphériques à l'OTG, augmentation de la compliance des fibres musculaires, modification de la balance entre les fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles» pour les UM «en-séries», augmentation de la compliance de la jonction myo-tendineuse. Néanmoins, nous ne pouvons exclure des modifications intrinsèques des OTG. En effet, l'investigation du type d'isoforme des brins de collagène intracapsulaires et/ou l'étude de la densité des terminaisons nerveuses en microscopie électronique permettrait de préciser l'origine du maintien de la décharge statique et de la sensibilité dynamique après HH. Des études plus spécifiques de la sensibilité dynamique seraient complémentaires à cette approche. Elles pourraient être réalisées avec un protocole de contraction tétanique non fusionnée en utilisant la méthode décrite par Horcholle-Bossavit et coll. 1989, c'est-à-dire l'application de fréquences de stimulation croissantes puis décroissantes (10, 20, 40, 20 et 10 Hz) afin d'observer la décharge des OTG lors de contractions tétaniques non fusionnées (10 et 20 Hz) et fusionnées (40 Hz). En complément, nous pourrions réaliser une étude spécifique de l'effet de l'hypodynamie-hypokinésie sur la typologie des fibres musculaires «en-séries» et «en-parallèles» des UM «en-séries» afin de confirmer leur hétérogénéisation.

En ce qui concerne l'étude de la neurotransmission médullaire, l'utilisation d'une approche biochimique et d'une approche protéomique nous a permis de montrer après 7 jours d'HH, une augmentation des concentrations normalisées de 4 neurotransmetteurs (glycine, GABA, glutamate et aspartate), augmentation qui pourrait être à l'origine des

modifications de la locomotion observée après HH. Par contre, nous n'avons pas détecté de changement quantitatif des récepteurs des neurotransmetteurs (récepteur glycine et NMDA).

Ces données pourraient être complétées par une réelle étude cinétique de la teneur en neurotransmetteurs qui serait examinée par HPLC. Des durées croissantes d'HH (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 28 jours) peuvent être envisagées afin de déterminer d'éventuelles périodes clés dans les variations de la concentration des neurotransmetteurs.

De la même façon, il serait intéressant de poursuivre la quantification des récepteurs glycine et NMDA au-delà de 14 jours d'HH, puisqu'il a été démontré dans d'autres modèles expérimentaux que les modifications de l'expression de ces récepteurs n'étaient effectives qu'au-delà de 1 mois.

Cependant, nos approches resteront globales puisqu'elles seront réalisées sur des fragments entiers de moelle épinière qui contiennent les corps cellulaires des motoneurones innervant différents muscles. Une approche originale serait de pouvoir « cartographier » des coupes transversales de moelle épinière en associant à la localisation des corps cellulaires des motoneurones, une détermination qualitative et quantitative des neurotransmetteurs. Ainsi, nous pourrions réaliser un marquage fluorescent rétrograde des corps cellulaires des motoneurones du muscle soleus et éventuellement d'autres muscles. Des coupes transversales de moelle épinière seraient réalisées puis examinées en utilisant la technique de MALDI TOF qui permettrait de localiser la répartition des neurotransmetteurs au sein de la moelle épinière. Une quantification sera ensuite réalisée grâce à l'utilisation d'un logiciel spécifique. *Cette approche expérimentale pourrait être entreprise en collaboration avec le Professeur M. Salzet (Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, USTL).*

Une étude plus approfondie de la répartition des récepteurs glycine et NMDA pourrait être réalisée grâce à l'utilisation de la microscopie confocale. Ainsi, sur des motoneurones identifiés par marquage fluorescent rétrograde, nous pourrions après identification par anticorps, déterminer la localisation membranaire ou non de ces récepteurs. L'association de ce marquage à celui de la protéine géphyrin nous donnerait une estimation de la proportion de récepteurs réellement fonctionnels dans le corps cellulaires des motoneurones. *Cette approche expérimentale pourrait être entreprise en collaboration avec le Professeur N. Prevarskaya (Laboratoire de Physiologie Cellulaire, USTL).*



# Références bibliographiques

## A

- [1] **Aggelopoulos, N. C., Burton, M. J., Clarke, R. W. et Edgley, S. A.** (1996) Characterization of a descending system that enables crossed group II inhibitory reflex pathways in the cat spinal cord, *J Neurosci*, **16**, 723-729.
- [2] **Alford, E. K., Roy, R. R., Hodgson, J. A. et Edgerton, V. R.** (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension, *Exp Neurol*, **96**, 635-649.
- [3] **Almeida-Silveira, M. I., Perot, C. et Goubel, F.** (1996) Neuromuscular adaptations in rats trained by muscle stretch-shortening, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **72**, 261-266.
- [4] **Alnaes, E.** (1967) Static and dynamic properties of Golgi tendon organs in the anterior tibial and soleus muscles of the cat, *Acta Physiol Scand*, **70**, 176-187.
- [5] **Alvarez, F. J., Villalba, R. M., Zerda, R. et Schneider, S. P.** (2004) Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses, *J Comp Neurol*, **472**, 257-280.
- [6] **Anderson, J., Almeida-Silveira, M. I. et Perot, C.** (1999) Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension, *J Exp Biol*, **202**, 2701-2707.

## B

- [7] **Baba, H., Goldstein, P. A., Okamoto, M., Kohno, T., Ataka, T., Yoshimura, M. et Shimoji, K.** (2000) Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons, *Anesthesiology*, **92**, 485-492.

- [8] **Baer, K., Essrich, C., Benson, J. A., Benke, D., Bluethmann, H., Fritschy, J. M. et Luscher, B.** (1999) Postsynaptic clustering of gamma-aminobutyric acid type A receptors by the gamma3 subunit in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12860-12865.
- [9] **Balazs, R., Machiyama, Y., Hammond, B. J., Julian, T. et Richter, D.** (1970) The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro, *Biochem J*, **116**, 445-461.
- [10] **Baldissera, F., Hultborn, H. et Illert, M.** (1981) Integration in spinal neuronal systems, In *Handbook of physiology. The nervous system*, American Physiological Society, **2**, 509-595.
- [11] **Barker, D., Emonet-Denand, F., Harker, D. W., Jami, L. et Laporte, Y.** (1977) Types of intra- and extrafusil muscle fibre innervated by dynamic skeleto-fusimotor axons in cat peroneus brevis and tenuissimus muscles, as determined by the glycogen-depletion method, *J Physiol*, **266**, 713-726.
- [12] **Barker, D.** (1974) The morphology of muscle receptors, In *Handbook of sensory physiology. Muscle receptors*, edited by Hunt, C. C. New York Springer, **III/2**, 1-190.
- [13] **Barker, D.** (1962) The structure and distribution of muscle receptors, In *Symposium on muscle receptors*, edited by Barker, D. Hong Kong University, 227-240.
- [14] **Bastide, B., Kischel, P., Puterflam, J., Stevens, L., Pette, D., Jin, J. P. et Mounier, Y.** (2002) Expression and functional implications of troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading, *Pflugers Arch*, **444**, 345-352.
- [15] **Behrends, T., Schomburg, E. D. et Steffens, H.** (1983) Group II muscle afferents and low threshold mechanoreceptive skin afferents converging onto interneurons in a common reflex pathway to alpha-motoneurons, *Brain Res*, **265**, 125-128.
- [16] **Bennett, J. A. et Dingledine, R.** (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop, *Neuron*, **14**, 373-384.

- [17] **Binder, M. D.** (1981) Further evidence that the Golgi tendon organ monitors the activity of a discrete set of motor units within a muscle, *Exp Brain Res*, **43**, 186-192.
- [18] **Binder, M. D., Kroin, J. S., Moore, G. P. et Stuart, D. G.** (1977) The response of Golgi tendon organs to single motor unit contractions, *J Physiol*, **271**, 337-349.
- [19] **Binder, M. D. et Osborn, C. E.** (1985) Interactions between motor units and Golgi tendon organs in the tibialis posterior muscle of the cat, *J Physiol*, **364**, 199-215.
- [20] **Blewett, C. et Elder, G. C.** (1993) Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery, *J Appl Physiol*, **74**, 2057-2066.
- [21] **Booth, F. W.** (1994) Terrestrial applications of bone and muscle research in microgravity, *Adv Space Res*, **14**, 373-376.
- [22] **Bridgman, C. F.** (1968) The structure of tendon organs in the cat: a proposed mechanism for responding to muscle tension, *Anat Rec*, **162**, 209-220.
- [23] **Bridgman, C. F.** (1970) Comparisons in structure of tendon organs in the rat, cat and man, *J Comp Neurol*, **138**, 369-372.
- [24] **Brooke, M. H. et Kaiser, K. K.** (1970) Muscle fiber types: how many and what kind?, *Arch Neurol*, **23**, 369-379.
- [25] **Brown, A. G.** (1981) Organization in the spinal cord, *New York Springer*.
- [26] **Buller, A. J. et Lewis, D. M.** (1965) The Rate of Tension Development in Isometric Tetanic Contractions of Mammalian Fast and Slow Skeletal Muscle, *J Physiol*, **176**, 337-354.
- [27] **Burgeson, R. E.** (1987) The collagens of skin, *Curr Probl Dermatol*, **17**, 61-75.
- [28] **Burke, R. E.** (1999) Revisiting the notion of 'motor unit types', *Prog Brain Res*, **123**, 167-175.

- [29] **Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P. et Zajac, F. E., 3rd** (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius, *J Physiol*, **234**, 723-748.
- [30] **Burke, R. E. et Tsairis, P.** (1973) Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius, *J Physiol*, **234**, 749-765.
- [31] **Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E. et Sakmann, B.** (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes, *J Physiol*, **485 ( Pt 2)**, 403-418.

## C

- [32] **Campione, M., Ausoni, S., Guezennec, C. Y. et Schiaffino, S.** (1993) Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **74**, 1156-1160.
- [33] **Canon, F. et Goubel, F.** (1995) Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle, *Pflugers Arch*, **429**, 332-337.
- [34] **Celichowski, J.** (2000) Mechanisms underlying the regulation of motor unit contraction in the skeletal muscle, *J Physiol Pharmacol*, **51**, 17-33.
- [35] **Chamberlain, S. et Lewis, D. M.** (1989) Contractile characteristics and innervation ratio of rat soleus motor units, *J Physiol*, **412**, 1-21.
- [36] **Clamann, H. P.** (1993) Motor unit recruitment and the gradation of muscle force, *Phys Ther*, **73**, 830-843.
- [37] **Close, R. I.** (1972) Dynamic properties of mammalian skeletal muscles, *Physiol Rev*, **52**, 129-197.
- [38] **Cope, T. C. et Pinter, M. J.** (1995) The size principle: still working after all these year, *News Physiol Sci*, **10**, 280-286.

- [39] **Croul, S., Radziewsky, A., Sverstiuk, A. et Murray, M.** (1998) NK1, NMDA, 5HT1a, and 5HT2 receptor binding sites in the rat lumbar spinal cord: modulation following sciatic nerve crush, *Exp Neurol*, **154**, 66-79.

## D

- [40] **Davies, P., Petit, J. et Scott, J. J.** (1995) The dynamic response of Golgi tendon organs to tetanic contraction of in-series motor units, *Brain Res*, **690**, 82-91.
- [41] **De-Doncker, L., Picquet, F., Browne, G. B. et Falempin, M.** (2002) Expression of myosin heavy chain isoforms along intrafusal fibers of rat soleus muscle spindles after 14 days of hindlimb unloading, *J Histochem Cytochem*, **50**, 1543-1554.
- [42] **De-Doncker, L., Picquet, F., Petit, J. et Falempin, M.** (2003) Effects of hypodynamia-hypokinesia on the muscle spindle discharges of rat soleus muscle, *J Neurophysiol*, **89**, 3000-3007.
- [43] **Desplanches, D., Mayet, M. H., Sempore, B. et Flandrois, R.** (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle, *J Appl Physiol*, **63**, 558-563.
- [44] **Devanandan, M. S., Ghosh, S. et John, K. T.** (1983) A quantitative study of muscle spindles and tendon organs in some intrinsic muscles of the hand in the bonnet monkey (*Macaca radiata*), *Anat Rec*, **207**, 263-266.
- [45] **Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. et Traynelis, S. F.** (1999) The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol Rev*, **51**, 7-61.
- [46] **Dingledine, R., McBain, C. J. et McNamara, J. O.** (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy, *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 334-338.
- [47] **Dingledine, R., Myers, S. J. et Nicholas, R. A.** (1990) Molecular biology of mammalian amino acid receptors, *Faseb J*, **4**, 2636-2645.
- [48] **Droppert, P. M.** (1993) A review of muscle atrophy in microgravity and during prolonged bed rest, *J Br Interplanet Soc*, **46**, 83-86.



- [49] Dupont, E., Canu, M. H. et Falempin, M. (2002) Atropine prevents the changes in the hindlimb cortical area induced by hypodynamia-hypokinesia, *Brain Res*, **926**, 51-57.
- [50] Dupont, E., Canu, M. H. et Falempin, M. (2003) A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons, *Neuroscience*, **121**, 433-439.

## E

- [51] Eccles, J. C. (1964) Presynaptic Inhibition in the Spinal Cord, *Prog Brain Res*, **12**, 65-91.
- [52] Eccles, J. C., Eccles, R. M. et Lundberg, A. (1957) The convergence of monosynaptic excitatory afferents on to many different species of alpha motoneurons, *J Physiol*, **137**, 22-50.
- [53] Eccles, J. C., Fatt, P. et Landgren, S. (1956) Central pathway for direct inhibitory action of impulses in largest afferent nerve fibres to muscle, *J Neurophysiol*, **19**, 75-98.
- [54] Eccles, J. C., Schmidt, R. F. et Willis, W. D. (1962) Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway, *J Physiol (Paris)*, **161**, 282-297.
- [55] Eccles, R. M. et Lundberg, A. (1958) Integrative pattern of Ia synaptic actions on motoneurons of hip and knee muscles, *J Physiol*, **144**, 271-298.
- [56] Edgerton, V. R., Leon, R. D., Harkema, S. J., Hodgson, J. A., London, N., Reinkensmeyer, D. J., Roy, R. R., Talmadge, R. J., Tillakaratne, N. J., Timoszyk, W. et Tobin, A. (2001) Retraining the injured spinal cord, *J Physiol*, **533**, 15-22.
- [57] Edgerton, V. R., et Roy, R. R. (1996) Neuromuscular adaptation to actual and simulated microgravity, In *Handbook of physiology*, New York Oxford University Press, 721-763.

- [58] **Edgley, S. A. et Jankowska, E.** (1987a) An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord, *J Physiol*, **389**, 647-674.
- [59] **Edgley, S. A. et Jankowska, E.** (1987b) Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord, *J Physiol*, **385**, 393-413.
- [60] **Edström, L. et Kugelberg, E.** (1968) Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units, *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, **31**, 424-433.
- [61] **Emonet-Denand, F., Jami, L. et Laporte, Y.** (1975) Skeleto-fusimotor axons in the hind-limb muscles of the cat, *J Physiol*, **249**, 153-166.
- [62] **Enriquez-Denton, M., Manjarrez, E. et Rudomin, P.** (2004) Persistence of PAD and presynaptic inhibition of muscle spindle afferents after peripheral nerve crush, *Brain Res*, **1027**, 179-187.
- [63] **Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M. et Luscher, B.** (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin, *Nat Neurosci*, **1**, 563-571.

## F

- [64] **Falempin, M. et In-Albon, S. F.** (1999) Influence of brief daily tendon vibration on rat soleus muscle in non-weight-bearing situation, *J Appl Physiol*, **87**, 3-9.
- [65] **Falempin, M., Leclercq, T., Leterme, D. et Mounier, Y.** (1990) Time-course of soleus muscle-change in and-recovery from disuse atrophy, *Physiologist*, **33**, S88-89.
- [66] **Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M. C., Kuhse, J., Betz, H. et Sanes, J. R.** (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity, *Science*, **282**, 1321-1324.

- [67] **Fitts, R. H., Metzger, J. M., Riley, D. A. et Unsworth, B. R.** (1986) Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization, *J Appl Physiol*, **60**, 1946-1953.
- [68] **Fonnum, F.** (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain, *J Neurochem*, **42**, 1-11.
- [69] **Fritz, N., Illert, M. et Saggau, P.** (1978) Monosynaptic convergence of group I muscle afferents from forelimb onto dorsal interosseus motoneurons, *Neurosci Lett*, **Suppl 1**, S95.
- [70] **Fukami, Y.** (1980) Interaction of impulse activities originating from individual Golgi tendon organs innervated by branches of a single axon, *J Physiol*, **298**, 483-499.
- [71] **Fukami, Y.** (1981) Responses of isolated Golgi tendon organs of the cat to muscle contraction and electrical stimulation, *J Physiol*, **318**, 429-443.
- [72] **Fukami, Y. et Wilkinson, R. S.** (1977) Responses of isolated Golgi tendon organs of the cat, *J Physiol*, **265**, 673-689.
- [73] **Fukushima, K. et Kato, M.** (1975) Spinal interneurons responding to group II muscle afferent fibers in the cat, *Brain Res*, **90**, 307-312.
- [74] **Fukuyama, U.** (1955) On cytoarchitectural lamination of the spinal cord in the albino rat, *Anat Rec*, **121**, 396-396.

## G

- [75] **Gajdosik, R. L.** (2001) Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications, *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, **16**, 87-101.
- [76] **Gioux, M. et Petit, J.** (1993) Effects of immobilizing the cat peroneus longus muscle on the activity of its own spindles, *J Appl Physiol*, **75**, 2629-2635.

- [77] **Gioux, M., Petit, J. et Proske, U.** (1991) Responses of cat muscle spindles which lack a dynamic fusimotor supply, *J Physiol*, **432**, 557-571.
- [78] **Giustetto, M., Kirsch, J., Fritschy, J. M., Cantino, D. et Sassoe-Pognetto, M.** (1998) Localization of the clustering protein gephyrin at GABAergic synapses in the main olfactory bulb of the rat, *J Comp Neurol*, **395**, 231-244.
- [79] **Goldfinger, M. D. et Fukami, Y.** (1982) Distribution, density and size of muscle receptors in cat tail dorsolateral muscles, *J Anat*, **135**, 371-384.
- [80] **Goubel, F. et Lensele-Corbeil, G.** (1998) Biomécanique, éléments de mécanique musculaire, *Masson*.
- [81] **Granit, R.** (1950) Reflex self-regulation of muscle contraction and autogenetic inhibition, *J Neurophysiol*, **13**, 351-372.
- [82] **Greenleaf, J. E.** (1984) Physiological responses to prolonged bed rest and fluid immersion in humans, *J Appl Physiol*, **57**, 619-633.
- [83] **Greene, E. C.** (1968) Anatomy of the Rat, *Hafner edition*.
- [84] **Gregory, J. E. et Proske, U.** (1979) The responses of Golgi tendon organs to stimulation of different combinations of motor units, *J Physiol*, **295**, 251-262.
- [85] **Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D. et Betz, H.** (1987) The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors, *Nature*, **328**, 215-220.
- [86] **Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D. et Betz, H.** (1988) Molecular cloning of the antagonist-binding subunit of the glycine receptor, *J Recept Res*, **8**, 183-193.
- [87] **Grossman, S. D., Wolfe, B. B., Yasuda, R. P. et Wrathall, J. R.** (2000) Changes in NMDA receptor subunit expression in response to contusive spinal cord injury, *J Neurochem*, **75**, 174-184.

- [88] **Guth, L. et Samaha, F. J.** (1969) Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle, *Exp Neurol*, **25**, 138-152.

## H

- [89] **Hamalainen, N. et Pette, D.** (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit, *J Histochem Cytochem*, **41**, 733-743.
- [90] **Hamalainen, N. et Pette, D.** (1995) Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres, *Microsc Res Tech*, **30**, 381-389.
- [91] **Hanko, V. P. et Rohrer, J. S.** (2004) Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *Anal Biochem*, **324**, 29-38.
- [92] **Henneman, E., Somjen, G. et Carpenter, D. O.** (1965) Excitability and inhibibility of motoneurons of different sizes, *J Neurophysiol*, **28**, 599-620.
- [93] **Hill, A. V.** (1938) The heat of shortening and the dynamic constants of muscle, *Proc Roy Soc B*, **126**, 136-195.
- [94] **Hirayama, T., Ono, H. et Fukuda, H.** (1990) Effects of excitatory and inhibitory amino acid agonists and antagonists of ventral horn cells in slices of spinal cord isolated from adult rats, *Neuropharmacology*, **29**, 1117-1122.
- [95] **Hollmann, M. et Heinemann, S.** (1994) Cloned glutamate receptors, *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.
- [96] **Hongo, T., Kudo, N., Sasaki, S., Yamashita, M., Yoshida, K., Ishizuka, N. et Mannen, H.** (1987) Trajectory of group Ia and Ib fibers from the hind-limb muscles at the L3 and L4 segments of the spinal cord of the cat, *J Comp Neurol*, **262**, 159-194.

- [97] Horcholle-Bossavit, G., Jami, L., Petit, J., Vejsada, R. et Zytnicki, D. (1988) Effects of muscle shortening on the responses of cat tendon organs to unfused contractions, *J Neurophysiol*, **59**, 1510-1523.
- [98] Horcholle-Bossavit, G., Jami, L., Petit, J., Vejsada, R. et Zytnicki, D. (1989) Unloading of tendon organ discharges by in-series motor units in cat peroneal muscles, *J Physiol*, **408**, 185-198.
- [99] Horcholle-Bossavit, G., Jami, L., Petit, J., Vejsada, R. et Zytnicki, D. (1990) Ensemble discharge from Golgi tendon organs of cat peroneus tertius muscle, *J Neurophysiol*, **64**, 813-821.
- [100] Houk, J. et Henneman, E. (1967) Responses of Golgi tendon organs to active contractions of the soleus muscle of the cat, *J Neurophysiol*, **30**, 466-481.
- [101] Houk, J. C., Singer, J. J. et Henneman, E. (1971) Adequate stimulus for tendon organs with observations on mechanics of ankle joint, *J Neurophysiol*, **34**, 1051-1065.
- [102] Hultborn, H. et Wigström, H. (1980) Motor response with long latency and maintained duration evoked by activity in Ia afferents, In: *Clinical Neurophysiology, spinal and supraspinal mechanisms of voluntary motor control and locomotion*, Desmedt, J. E. (Karger Basel), **8**, 99-115.
- [103] Hultborn, H., Wigström, H. et Wangberg, B. (1975) Prolonged activation of soleus motoneurons following a conditioning train in soleus Ia afferents – a case for a reverberating loop ?, *Neurosci Lett*, **1**, 152-174.
- [104] Hunt, C. C. et Kuffler, S. W. (1951) Stretch receptor discharges during muscle contraction, *J Physiol*, **113**, 298-315.
- I
- [105] Ishihara, A., Kawano, F., Wang, X. D. et Ohira, Y. (2004) Responses of neuromuscular systems under gravity or microgravity environment, *Biol Sci Space*, **18**, 128-129.

- [106] Ishihara, A., Nishikawa, W., Kawano, F., Fukunaga, K. et Ohira, Y. (2002) Effects of hindlimb suspension on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in Wistar Hannover rats, *J Gravit Physiol*, **9**, P141-142.
- [107] Ishihara, A., Ohira, Y., Roy, R. R., Nagaoka, S., Sekiguchi, C., Hinds, W. E. et Edgerton, V. R. (1996) Influence of spaceflight on succinate dehydrogenase activity and soma size of rat ventral horn neurons, *Acta Anat (Basel)*, **157**, 303-308.

## J

- [108] Jami, L. (1988) [Functional properties of the Golgi tendon organs], *Arch Int Physiol Biochim*, **96**, A363-378.
- [109] Jami, L. (1989) Some quantitative data on the sensory equipment of the cat peroneal muscles, *Behav Brain Sci*, **12**, 658-659.
- [110] Jami, L. (1992) Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions, *Physiol Rev*, **72**, 623-666.
- [111] Jami, L. et Petit, J. (1976a) Heterogeneity of motor units activating single Golgi tendon organs in cat leg muscles, *Exp Brain Res*, **24**, 485-493.
- [112] Jami, L. et Petit, J. (1976b) Frequency of tendon organ discharges elicited by the contraction of motor units in cat leg muscles, *J Physiol*, **261**, 633-645.
- [113] Jami, L., Petit, J., Proske, U. et Zytnicki, D. (1985) Responses of tendon organs to unfused contractions of single motor units, *J Neurophysiol*, **53**, 32-42.
- [114] Jankowska, E., Hammar, I., Chojnicka, B. et Heden, C. H. (2000) Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents, *Eur J Neurosci*, **12**, 701-714.
- [115] Jankowska, E., McCrea, D. et Mackel, R. (1981) Oligosynaptic excitation of motoneurons by impulses in group Ia muscle spindle afferents in the cat, *J Physiol*, **316**, 411-425.

- [116] **Jansen, J. K. et Rudjord, T.** (1964) On the Silent Period and Golgi Tendon Organs of the Soleus Muscle of the Cat, *Acta Physiol Scand*, **62**, 364-379.
- [117] **Jiang, B., Roy, R. R., Polyakov, I. V., Krasnov, I. B. et Edgerton, V. R.** (1992) Ventral horn cell responses to spaceflight and hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **73**, 107S-111S.
- [118] **Johnson, J. L.** (1972) Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. A review, *Brain Res*, **37**, 1-19.
- [119] **Jonas, P., Bischofberger, J. et Sandkuhler, J.** (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse, *Science*, **281**, 419-424.
- [120] **Jozsa, L., Kvist, M., Kannus, P. et Jarvinen, M.** (1988) The effect of tenotomy and immobilization on muscle spindles and tendon organs of the rat calf muscles. A histochemical and morphometrical study, *Acta Neuropathol (Berl)*, **76**, 465-470.

## K

- [121] **Kalb, R. G., Lidow, M. S., Halsted, M. J. et Hockfield, S.** (1992) 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.
- [122] **Kawano, F., Ishihara, A., Stevens, J. L., Wang, X. D., Ohshima, S., Horisaka, M., Maeda, Y., Nonaka, I. et Ohira, Y.** (2004) Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R76-86.
- [123] **Kawano, F., Nomura, T., Ishihara, A., Nonaka, I. et Ohira, Y.** (2002) Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment, *Neuroscience*, **114**, 1133-1138.
- [124] **Kins, S., Betz, H. et Kirsch, J.** (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin, *Nat Neurosci*, **3**, 22-29.



- [125] **Kirkwood, P. A., Schomburg, E. D. et Steffens, H.** (1987) Facilitatory interaction in spinal reflex pathways from nociceptive cutaneous afferents and identified secondary spindle afferents in the cat, *Exp Brain Res*, **68**, 657-660.
- [126] **Kirsch, J., Malosio, M. L., Wolters, I. et Betz, H.** (1993) Distribution of gephyrin transcripts in the adult and developing rat brain, *Eur J Neurosci*, **5**, 1109-1117.
- [127] **Kischel, P., Bastide, B., Stevens, L. et Mounier, Y.** (2001) Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading, *J Appl Physiol*, **90**, 1095-1101.
- [128] **Kleckner, N. W. et Dingledine, R.** (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes, *Science*, **241**, 835-837.
- [129] **Kneussel, M., Brandstatter, J. H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U. et Betz, H.** (1999) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice, *J Neurosci*, **19**, 9289-9297.
- [130] **Kniffki, K. D., Schomburg, E. D. et Steffens, H.** (1981) Convergence in segmental reflex pathways from fine muscle afferents and cutaneous or group II muscle afferents to alpha-motoneurons, *Brain Res*, **218**, 342-346.
- [131] **Kovanen, V., Suominen, H. et Heikkinen, E.** (1980) Connective tissue of "fast" and "slow" skeletal muscle in rats--effects of endurance training, *Acta Physiol Scand*, **108**, 173-180.
- [132] **Kovanen, V., Suominen, H. et Heikkinen, E.** (1984) Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training, *J Biomech*, **17**, 725-735.
- [133] **Krasnov, I. B., Poliakov, I. V. et Drobyshev, V. I.** (1993) [Effect of space flight and head-down position on motoneuron- glia-capillary system of the rat bone marrow], *Aviakosm Ekolog Med*, **27**, 38-42.
- [134] **Kugelberg, E.** (1976) Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth, *J Neurol Sci*, **27**, 269-289.

**L**

- [135] **Lafleur, J., Zytnicki, D., Horcholle-Bossavit, G. et Jami, L.** (1992) Depolarization of Ib afferent axons in the cat spinal cord during homonymous muscle contraction, *J Physiol*, **445**, 345-354.
- [136] **Lamotte d'Incamps, B., Destombes, J., Thiesson, D., Hellio, R., Lasserre, X., Kouchtir-Devanne, N., Jami, L. et Zytnicki, D.** (1998) Indications for GABA-immunoreactive axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of a Ib fiber in cat: a confocal microscope study, *J Neurosci*, **18**, 10030-10036.
- [137] **Lamotte d'Incamps, B., Meunier, C., Zytnicki, D. et Jami, L.** (1999) Flexible processing of sensory information induced by axo-axonic synapses on afferent fibers, *J Physiol Paris*, **93**, 369-377.
- [138] **Langlet, C., Canu, M. H. et Falempin, M.** (1999) Short-term reorganization of the rat somatosensory cortex following hypodynamia-hypokinesia, *Neurosci Lett*, **266**, 145-148.
- [139] **Langosch, D., Thomas, L. et Betz, H.** (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7394-7398.
- [140] **Lanir, Y.** (1978) Structure-strength relations in mammalian tendon, *Biophys J*, **24**, 541-554.
- [141] **Laporte, Y. et Lloyd, D. P.** (1952) Nature and significance of the reflex connections established by large afferent fibers of muscular origin, *Am J Physiol*, **169**, 609-621.
- [142] **Legendre, P.** (1997) Pharmacological evidence for two types of postsynaptic glycinergic receptors on the Mauthner cell of 52-h-old zebrafish larvae, *J Neurophysiol*, **77**, 2400-2415.
- [143] **Legendre, P.** (2001) The glycinergic inhibitory synapse, *Cell Mol Life Sci*, **58**, 760-793.

- [144] **Leite, J. F., Amoscato, A. A. et Cascio, M.** (2000) Coupled proteolytic and mass spectrometry studies indicate a novel topology for the glycine receptor, *J Biol Chem*, **275**, 13683-13689.
- [145] **Leterme, D. et Falempin, M.** (1996) Contractile properties of rat soleus motor units following 14 days of hindlimb unloading, *Pflugers Arch*, **432**, 313-319.
- [146] **Leterme, D. et Falempin, M.** (1998) EMG activity of three rat hindlimb muscles during microgravity and hypergravity phase of parabolic flight, *Aviat Space Environ Med*, **69**, 1065-1070.
- [147] **Lewis, S. J., Lander, P. T., Taylor, P. A., Chamberlain, D. A. et Vincent, R.** (1989) Evolution of late potential activity in the first six weeks after acute myocardial infarction, *Am J Cardiol*, **63**, 647-651.
- [148] **Liu, D., Thangnipon, W. et McAdoo, D. J.** (1991) Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord, *Brain Res*, **547**, 344-348.
- [149] **Lloyd, D. P. C.** (1943) Conduction and synaptic transmission of the reflex response to stretch in spinal cats, *J Neurophysiol*, **6**, 317-326.
- [150] **Lloyd, D. P. C.** (1946) Facilitation and inhibition of spinal motoneurons, *J Neurophysiol*, **9**, 421-438.
- [151] **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- [152] **Lundberg, A., Malmgren, K. et Schomburg, E. D.** (1987a) Reflex pathways from group II muscle afferents. 1. Distribution and linkage of reflex actions to alpha-motoneurons, *Exp Brain Res*, **65**, 271-281.
- [153] **Lundberg, A., Malmgren, K. et Schomburg, E. D.** (1987b) Reflex pathways from group II muscle afferents. 2. Functional characteristics of reflex pathways to alpha-motoneurons, *Exp Brain Res*, **65**, 282-293.

## M

- [154] Mackie, M., Hughes, D. I., Maxwell, D. J., Tillakaratne, N. J. et Todd, A. J. (2003) Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord, *Neuroscience*, **119**, 461-472.
- [155] Maffiuletti, N. A., Martin, A., Van Hoecke, J. et Schieppati, M. (2000) The relative contribution to the plantar-flexor torque of the soleus motor units activated by the H reflex and M response in humans, *Neurosci Lett*, **288**, 127-130.
- [156] Malcangio, M. et Bowery, N. G. (1994) Spinal cord SP release and hyperalgesia in monoarthritic rats: involvement of the GABAB receptor system, *Br J Pharmacol*, **113**, 1561-1566.
- [157] Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T. et Takai, Y. (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin, *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 86-89.
- [158] Marvizon, J. C. G., McRoberts, J. A., Ennes, H. S., Song, B., Wang, X., Jinton, L., Corneliussen, B. et Mayer, E. A. (2002) Two N-Methyl-D-Aspartate receptors in different rat dorsal ganglia with different subunit composition and localization, *J Comp Neurol*, **446**, 325-341.
- [159] Matthews, B. H. C. (1933) Nerve endings in mammalian muscle, *J Physiol Lond*, **78**, 1-33.
- [160] Mayer, M. L., Vyklicky, L., Jr. et Westbrook, G. L. (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones, *J Physiol*, **415**, 329-350.
- [161] Meier, J., De Chaldee, M., Triller, A. et Vannier, C. (2000) Functional heterogeneity of gephyrins, *Mol Cell Neurosci*, **16**, 566-577.

- [162] **Meier, J., Meunier-Durmort, C., Forest, C., Triller, A. et Vannier, C.** (2000) Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses, *J Cell Sci*, **113 ( Pt 15)**, 2783-2795.
- [163] **Merrillees, N. C. R.** (1962) Some observations on the fine structure of a Golgi tendon organ of a rat, In *Symposium on muscle receptors*, edited by Barker, D. Hong Kong University, 199-206.
- [164] **Miller, T. A., Lesniewski, L. A., Muller-Delp, J. M., Majors, A. K., Scalise, D. et Delp, M. D.** (2001) Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**, R1710-1717.
- [165] **Molander, C., Xu, Q. et Grant, G.** (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord, *J Comp Neurol*, **230**, 133-141.
- [166] **Molander, C., Xu, Q., Rivero-Melian, C. et Grant, G.** (1989) Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord, *J Comp Neurol*, **289**, 375-385.
- [167] **Monti, R. J., Roy, R. R. et Edgerton, V. R.** (2001) Role of motor unit structure in defining function, *Muscle Nerve*, **24**, 848-866.
- [168] **Moore, J. C.** (1984) The Golgi tendon organ: a review and update, *Am J Occup Ther*, **38**, 227-236.
- [169] **Morey, E. R., Sabelman, E. E., Turner, R. T. et Baylink, D. J.** (1979) A new rat model simulating some aspects of space flight, *Physiologist*, **22**, S23-24.
- [170] **Morita, H., Petersen, N., Christensen, L. O., Sinkjaer, T. et Nielsen, J.** (1998) Sensitivity of H-reflexes and stretch reflexes to presynaptic inhibition in humans, *J Neurophysiol*, **80**, 610-620.
- [171] **Mori, H. et Mishina, M.** (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel, *Neuropharmacology*, **34**, 1219-1237.

- [172] **Myers, S. J., Dingledine, R. et Borges, K.** (1999) Genetic regulation of glutamate receptor ion channels, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 221-241.

## N

- [173] **Nakanishi, N., Axel, R. et Shneider, N. A.** (1992) Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8552-8556.
- [174] **Nemeth, P. M., Solanki, L., Gordon, D. A., Hamm, T. M., Reinking, R. M. et Stuart, D. G.** (1986) Uniformity of metabolic enzymes within individual motor units, *J Neurosci*, **6**, 892-898.
- [175] **Nitatori, T.** (1988) The fine structure of human Golgi tendon organs as studied by three-dimensional reconstruction, *J Neurocytol*, **17**, 27-41.
- [176] **Nomura, T., Kawano, F., Ishihara, A., Sato, Y., Mitarai, G., Iwase, S., Kamiya, A., Mano, T. et Ohira, Y.** (2001) Enhanced Hoffman-reflex in human soleus muscle during exposure to microgravity environment, *Neurosci Lett*, **316**, 55-57.
- [177] **Nordstrom, M. A., Enoka, R. M., Reinking, R. M., Callister, R. C. et Stuart, D. G.** (1995) Reduced motor unit activation of muscle spindles and tendon organs in the immobilized cat hindlimb, *J Appl Physiol*, **78**, 901-913.

## O

- [178] **Ohira, Y., Jiang, B., Roy, R. R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J. F. et Edgerton, V. R.** (1992) Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **73**, 51S-57S.
- [179] **Ottersen, O. P.** (1991) Excitatory amino acids neurotransmitters: anatomical systems, In *Excitatory amino acids antagonists*, Blackwell Oxford, 14-38.

## P

- [180] **Panter, S. S., Yum, S. W. et Faden, A. I.** (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury, *Ann Neurol*, **27**, 96-99.
- [181] **Patneau, D. K. et Mayer, M. L.** (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors, *J Neurosci*, **10**, 2385-2399.
- [182] **Paxinos, G.** (1996) The rat nervous system, *Academic Press*.
- [183] **Perrier, J. F., D'Incamps, B. L., Kouchtir-Devanne, N., Jami, L. et Zytnicki, D.** (2000) Cooperation of muscle and cutaneous afferents in the feedback of contraction to peroneal motoneurons, *J Neurophysiol*, **83**, 3201-3208.
- [184] **Peshori, K. R., Collins, W. F. et Mendell, L. M.** (1998) EPSP amplitude modulation at the rat Ia-alpha motoneuron synapse: effects of GABAB receptor agonists and antagonists, *J Neurophysiol*, **79**, 181-189.
- [185] **Peters, D. G., Mitchell-Felton, H. et Kandarian, S. C.** (1999) Unloading induces transcriptional activation of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 gene in muscle, *Am J Physiol*, **276**, C1218-1225.
- [186] **Petit, J., Davies, P. et Scott, J. J.** (1994) Static sensitivity of tendon organs to tetanic contraction of in-series motor units in feline peroneus tertius muscle, *J Physiol*, **481** (Pt 1), 177-184.
- [187] **Petit, J., Filippi, G. M., Gioux, M., Hunt, C. C. et Laporte, Y.** (1990) Effects of tetanic contraction of motor units of similar type on the initial stiffness to ramp stretch of the cat peroneus longus muscle, *J Neurophysiol*, **64**, 1724-1732.
- [188] **Petit, J. et Gioux, M.** (1993) Properties of motor units after immobilization of cat peroneus longus muscle, *J Appl Physiol*, **74**, 1131-1139.

- [189] **Pette, D. et Staron, R. S.** (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **116**, 1-76.
- [190] **Pette, D. et Staron, R. S.** (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions, *Int Rev Cytol*, **170**, 143-223.
- [191] **Pfeiffer, F., Graham, D. et Betz, H.** (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord, *J Biol Chem*, **257**, 9389-9393.
- [192] **Picquet, F., Canu, M. H. et Falempin, M.** (2000) Phenotypic changes in the composition of muscular fibres in rat soleus motor units after 14 days of hindlimb unloading, *Pflugers Arch*, **440**, 229-235.
- [193] **Picquet, F. et Falempin, M.** (2003) Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus, *Exp Neurol*, **182**, 186-194.
- [194] **Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J. et et al.** (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein, *Neuron*, **8**, 1161-1170.
- [195] **Proske, U.** (1981) The Golgi tendon organ. Properties of the receptor and reflex action of impulses arising from tendon organs, *Int Rev Physiol*, **25**, 127-171.
- [196] **Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S. et McNamara, J. O.** (1999) Neurosciences., *DeBoeck Université*.

## R

- [197] **Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H. et Schofield, P. R.** (1995) Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms beta-alanine and taurine from agonists into competitive antagonists, *Neuron*, **14**, 169-175.



- [198] **Regaud, C.** (1907) Les terminaisons nerveuses et les organes nerveux sensitifs de l'appareil locomoteur (Dispositifs nerveux kinesthésiques). II Les terminaisons nerveuses et les organes nerveux sensitifs des tendons, de leurs gaines, des enveloppes conjonctives musculo-tendineuses, du périoste et des tissus articulaires, *Rev Gen Histol*, **1**, 587-685.
- [199] **Reinking, R. M., Stephens, J. A. et Stuart, D. G.** (1975) The tendon organs of cat medial gastrocnemius: significance of motor unit type and size for the activation of Ib afferents, *J Physiol*, **250**, 491-512.
- [200] **Reschke, M. F., Anderson, D. J. et Homick, J. L.** (1986) Vestibulo-spinal response modification as determined with the H-reflex during the Spacelab-1 flight, *Exp Brain Res*, **64**, 367-379.
- [201] **Rexed, B.** (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat, *J Comp Neurol*, **100**, 297-379.
- [202] **Riddell, J. S. et Hadian, M.** (1998) Topographical organization of group II afferent input in the rat spinal cord, *J Comp Neurol*, **394**, 357-373.
- [203] **Riley, D. A., Slocum, G. R., Bain, J. L., Sedlak, F. R., Sowa, T. E. et Mellender, J. W.** (1990) Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography, *J Appl Physiol*, **69**, 58-66.
- [204] **Rock, D. M. et Macdonald, R. L.** (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 463-482.
- [205] **Roffino, S., Carnino, A., Charpiot, P. et Marini, J. F.** (1998) Increase in rat soleus myotendinous interface after a 14-d spaceflight, *C R Acad Sci III*, **321**, 557-564.
- [206] **Rosant, C. et Perot, C.** (2005) An index of spindle efficacy obtained by measuring electroneurographic activity and passive tension in the rat soleus muscle, *J Neurosci Methods*, .
- [207] **Roy, R. R., Baldwin, K. M. et Edgerton, V. R.** (1991) The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity, *Exerc Sport Sci Rev*, **19**, 269-312.

- [208] Roy, R. R., Gilliam, T. B., Taylor, J. F. et Heusner, W. W. (1983) Activity-induced morphologic changes in rat soleus nerve, *Exp Neurol*, **80**, 622-632.

## S

- [209] Sabatini, D. M., Barrow, R. K., Blackshaw, S., Burnett, P. E., Lai, M. M., Field, M. E., Bahr, B. A., Kirsch, J., Betz, H. et Snyder, S. H. (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling, *Science*, **284**, 1161-1164.

- [210] Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Sieghart, W. et Fritschy, J. M. (2000) Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites, *J Comp Neurol*, **420**, 481-498.

- [211] Schiaffino, S. et Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle, *J Appl Physiol*, **77**, 493-501.

- [212] Schiaffino, S. et Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle, *J Appl Physiol*, **77**, 493-501.

- [213] Schmidt, R. F. (1971) Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system, *Ergeb Physiol*, **63**, 20-101.

- [214] Schmitt, B., Knaus, P., Becker, C. M. et Betz, H. (1987) The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein, *Biochemistry*, **26**, 805-811.

- [215] Schomburg, E. D. et Behrends, H. B. (1978) The possibility of phase-dependent monosynaptic and polysynaptic excitation to homonymous motoneurons during fictive locomotion, *Brain Res*, **143**, 533-537.

- [216] Schoultz, T. W. et Swett, J. E. (1972) The fine structure of the Golgi tendon organ, *J Neurocytol*, **1**, 1-26.

- [217] Scott, J. J. et Young, H. (1987) The number and distribution of muscle spindles and tendon organs in the peroneal muscles of the cat, *J Anat*, **151**, 143-155.

- [218] **Shah, S. B., Peters, D., Jordan, K. A., Milner, D. J., Friden, J., Capetanaki, Y. et Lieber, R. L.** (2001) Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle, *J Exp Biol*, **204**, 1703-1710.
- [219] **Shapiro, S.** (1997) Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord, *Neurosurgery*, **40**, 168-176; discussion 177.
- [220] **Sklenska, A.** (1973) [Ultrastructure of the Golgi tendon organ in the cat], *Acta Anat (Basel)*, **86**, 205-221.
- [221] **Shimizu, S., Honda, M., Tanabe, M. et Ono, H.** (2004) GABA<sub>B</sub> receptors do not mediate the inhibitory actions of gabapentin on the spinal reflex in rats, *J Pharmacol Sci*, **96**, 444-449.
- [222] **Shorten, R. M.** (1987) Muscle elasticity and human performance, In *Medecine and Sport Science (Karger Basel)*, **25**, 1-18.
- [223] **Soukup, T.** (1983) The number, distribution and size of Golgi tendon organs in developing and adult rat muscles, *Physiol Bohemoslov*, **32**, 211-224.
- [224] **Soukup, T. et Zelena, J.** (1977) The number and size of Golgi tendon organs in rat muscles during postnatal development, *Folia Morphol (Praha)*, **25**, 79-82.
- [225] **Soukup, T. et Zelena, J.** (1977) The number and size of Golgi tendon organs in rat muscles during postnatal development, *Folia Morphol (Praha)*, **25**, 79-82.
- [226] **Spielmann, J. M. et Stauffer, E. K.** (1986) Morphological observations of motor units connected in-series to Golgi tendon organs, *J Neurophysiol*, **55**, 147-162.
- [227] **Stauffer, E. K. et Stephens, J. A.** (1975) The tendon organs of cat soleus: static sensitivity to active force, *Exp Brain Res*, **23**, 279-291.
- [228] **Stegenga, S. L. et Kalb, R. G.** (2001) Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kainate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord, *Neuroscience*, **105**, 499-507.

- [229] **Stephens, J. A., Reinking, R. M. et Stuart, D. G.** (1975) Tendon organs of cat medial gastrocnemius: responses to active and passive forces as a function of muscle length, *J Neurophysiol*, **38**, 1217-1231.
- [230] **Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R. et Colquhoun, D.** (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors, *Proc Biol Sci*, **250**, 271-277.
- [231] **Stevens, L., Bastide, B., Kischel, P., Pette, D. et Mounier, Y.** (2002) Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle, *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C1025-1030.
- [232] **Stevens, L. et Mounier, Y.** (1992) Ca<sup>2+</sup> movements in sarcoplasmic reticulum of rat soleus fibers after hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **72**, 1735-1740.
- [233] **Stevens, L., Mounier, Y. et Holy, X.** (1993) Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness, *Am J Physiol*, **264**, R770-776.
- [234] **Stevens, L., Mounier, Y., Holy, X. et Falempin, M.** (1990) Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **68**, 334-340.
- [235] **Stevens, L., Sultan, K. R., Peuker, H., Gohlsch, B., Mounier, Y. et Pette, D.** (1999) Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat, *Am J Physiol*, **277**, C1044-1049.
- [236] **Stevens, L., Toursel, T., Lenfant, A. M., Falempin, M. et Mounier, Y.** (2000) Suppression of motor innervation induces diversity in soleus muscle, *Basic Appl Myol*, **10**, 181-190.
- [237] **Stewart, K. T., Rosenwasser, A. M. et Adler, N. T.** (1985) Interactions between nocturnal feeding and wheel running patterns in the rat, *Physiol Behav*, **34**, 601-608.
- [238] **Storm-Mathisen, J., Danbolt, N. C. et Ottersen, O. P.** (1994) Localization of glutamate and its membrane transport proteins, In *Glutamate*, Stone, T. W. edition.

- [239] **Stuart, D. G., Mosher, C. G., Gerlach, R. L. et Reinking, R. M.** (1972) Mechanical arrangement and transducing properties of Golgi tendon organs, *Exp Brain Res*, **14**, 274-291.
- [240] **Swett, J. E. et Schoultz, T. W.** (1975) Mechanical transduction in the Golgi tendon organ: a hypothesis, *Arch Ital Biol*, **113**, 374-382.

## T

- [241] **Talmadge, R. J.** (2000) Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms, *Muscle Nerve*, **23**, 661-679.
- [242] **Talmadge, R. J., Roy, R. R. et Edgerton, V. R.** (1996a) Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers, *J Appl Physiol*, **81**, 2540-2546.
- [243] **Talmadge, R. J., Roy, R. R. et Edgerton, V. R.** (1996b) Alterations in the glycinergic neurotransmitter system are associated with stepping behavior in neonatal spinal cord transected rats, *Soc Neurosci Abstr*, **22**, 1397.
- [244] **Templeton, G. H., Padalino, M., Manton, J., Glasberg, M., Silver, C. J., Silver, P., DeMartino, G., Leconey, T., Klug, G., Hagler, H. et et al.** (1984) Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle, *J Appl Physiol*, **56**, 278-286.
- [245] **Templeton, G. H., Sweeney, H. L., Timson, B. F., Padalino, M. et Dudenhoeffer, G. A.** (1988) Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension, *J Appl Physiol*, **65**, 1191-1195.
- [246] **Tesch, P. A., Berg, H. E., Haggmark, T., Ohlsen, H. et Dudley, G. A.** (1991) Muscle strength and endurance following lowerlimb suspension in man, *Physiologist*, **34**, S104-106.
- [247] **Tidball, J. G. et Daniel, T. L.** (1986) Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading, *Cell Tissue Res*, **245**, 315-322.

- [248] **Tillakaratne, N. J., de Leon, R. D., Hoang, T. X., Roy, R. R., Edgerton, V. R. et Tobin, A. J.** (2002) Use-dependent modulation of inhibitory capacity in the feline lumbar spinal cord, *J Neurosci*, **22**, 3130-3143.
- [249] **Tillakaratne, N. J., Mouria, M., Ziv, N. B., Roy, R. R., Edgerton, V. R. et Tobin, A. J.** (2000) Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection, *J Neurosci Res*, **60**, 219-230.
- [250] **Todd, A. J., Watt, C., Spike, R. C. et Sieghart, W.** (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord, *J Neurosci*, **16**, 974-982.
- [251] **Toursel, T., Stevens, L., Granzier, H. et Mounier, Y.** (2002) Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions, *J Appl Physiol*, **92**, 1465-1472.

## U

- [252] **Ullstrom, M., Parker, D., Svensson, E. et Grillner, S.** (1999) Neuropeptide-mediated facilitation and inhibition of sensory inputs and spinal cord reflexes in the lamprey, *J Neurophysiol*, **81**, 1730-1740.

## W

- [253] **Watt, D. G., Stauffer, E. K., Taylor, A., Reinking, R. M. et Stuart, D. G.** (1976) Analysis of muscle receptor connections by spike-triggered averaging. 1. Spindle primary and tendon organ afferents, *J Neurophysiol*, **39**, 1375-1392.
- [254] **Willis, W. D., Tate, G. W., Ashworth, R. D. et Willis, J. C.** (1966) Monosynaptic excitation of motoneurons of individual forelimb muscles, *J Neurophysiol*, **29**, 410-424.

[255] **Winiarski, A. M., Roy, R. R., Alford, E. K., Chiang, P. C. et Edgerton, V. R.** (1987) Mechanical properties of rat skeletal muscle after hind limb suspension, *Exp Neurol*, **96**, 650-660.

[256] **Wood, M. W., VanDongen, H. M. et VanDongen, A. M.** (1996) The 5'-untranslated region of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit controls efficiency of translation, *J Biol Chem*, **271**, 8115-8120.

## Y

[257] **Yates, B. J., Kasper, J., Brink, E. E. et Wilson, V. J.** (1988) Peripheral input to L4 neurons whose activity is modulated by neck rotation, *Brain Res*, **449**, 377-380.

[258] **Yates, B. J., Kasper, J. et Wilson, V. J.** (1989) Effects of muscle and cutaneous hindlimb afferents on L4 neurons whose activity is modulated by neck rotation, *Exp Brain Res*, **77**, 48-56.

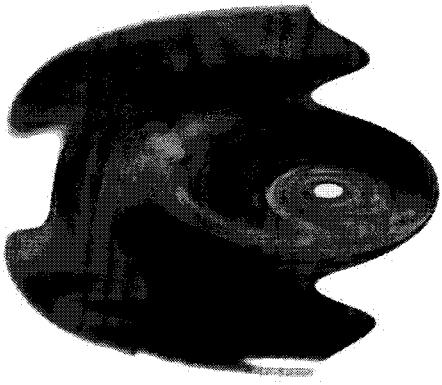
## Z

[259] **Zamora, A. J., Carnino, A., Roffino, S. et Marini, J. F.** (1995) Respective effects of hindlimb suspension, confinement and spaceflight on myotendinous junction ultrastructure, *Acta Astronaut*, **36**, 693-706.

[260] **Zehr, P. E.** (2002) Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies, *Eur J Appl Physiol*, **86**, 455-468.

[261] **Zelena, J. et Soukup, T.** (1977) The development of Golgi tendon organs, *J Neurocytol*, **6**, 171-194.

[262] **Zelena, J. et Soukup, T.** (1983) The in-series and in-parallel components in rat hindlimb tendon organs, *Neuroscience*, **9**, 899-910.



## Annexes



Regular Article

# The structure and response properties of Golgi tendon organs in control and hypodynamia–hypokinesia rats

Nicolas Treffort<sup>a,\*</sup>, Florence Picquet<sup>a</sup>, Julien Petit<sup>b</sup>, Maurice Falempin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, UPRES EA 1032, IFR 118, Bât. SN4, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Neurophysiologie, UMR 5543, Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 33000 Bordeaux, France

Received 25 March 2005; revised 13 May 2005; accepted 13 May 2005

Available online 5 July 2005

## Abstract

The Golgi tendon organs (GTOs) are encapsulated mechano-receptors that, in normal conditions, monitor via Ib afferent fibers the contractile force. A 14-day period of hypodynamia, absence of weight bearing and hypokinesia, and reduction of motor activity (HH) is known to induce changes in postural muscles such as the soleus. At present, there is no data available regarding the Ib afferent feedback in normal rats (CONT group) and in rats after a hypodynamia–hypokinesia (HH group) period. Consequently, the aim of our study was to determine the HH effects on the morphological (histochemistry on gross morphology) and electrophysiological properties of the GTOs in rat soleus muscle. In the histological study, nine CONT and nineteen HH GTOs of the soleus muscle were identified. The results demonstrated that HH GTOs were morphologically similar to the CONT GTOs. Regarding the electrophysiological study, a L<sub>2</sub>–L<sub>6</sub> laminectomy was performed under deep anesthesia (sodium pentobarbital, 60 mg kg<sup>-1</sup>). Responses in single Ib fibers from the L<sub>5</sub> dorsal root to the isometric twitch and tetanic fused contractions of “in-series” motor units (MUs) were recorded. Twenty-three and twenty-eight GTO/MU pairs were studied in the CONT and HH groups, respectively. In the HH group, the Ib afferent response exhibited a decrease in dynamic peak for the high stimulation frequencies and an increase in static sensitivity for all stimulation frequencies. Our results suggest that after an HH period, the GTOs continue to fulfil their mechano-sensory function to signal the contractile force but with a higher static sensitivity.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Golgi tendon organ; Simulated microgravity; Muscle atrophy

## Introduction

Microgravity is well-known to induce changes in postural slow muscles such as the soleus. In our experimentations, we used Morey's model (Morey et al., 1979) to simulate microgravity conditions. In this model, hypodynamia (absence of weight bearing) and hypokinesia (reduction of motor activity) (HH) can be observed as in real microgravity. Among the muscle changes, a shift of muscle characteristics towards a faster type is the result of changes in motor unit types (MU), which are normally homogenous but become heterogeneous after HH (Picquet et al., 2000). Furthermore, with the same experimental

model, Miller et al. (2001) have demonstrated that during slow to fast muscular changes, the relative proportion of collagen isoforms is modified. Indeed, the amount of type I collagen was gradually replaced by type III collagen isoform, which is more compliant. Moreover, as concluded by Canon and Goubel (1995), the compliance of the whole soleus muscle could be changed after 3 weeks of HH since fast fibers have been reported to be more compliant than slow fibers (Petit et al., 1990).

Previous studies carried out in our laboratory have demonstrated that the physiological response properties and the histochemical characteristics of the muscle spindle mechanoreceptor are modified after an HH period. On the contrary, there is no data concerning the possible changes in the morphological and electrophysiological properties of the second muscular mechanoreceptor: the Golgi tendon organ

\* Corresponding author. Fax: +33 3 20 43 68 88.

E-mail address: [nicolas\\_treffort@yahoo.fr](mailto:nicolas_treffort@yahoo.fr) (N. Treffort).



(GTO). Taking into account the results described above (changes in MU type and collagen isoform), it is tempting to suggest that the structural and functional properties are modified after an HH period. It is known that GTOs are tension-sensitive mechanoreceptors present in skeletal muscles. The encapsulated collagen bundles within the GTOs are connected at one end to the whole muscle tendon or aponeurosis and at the other end to muscle fibers, called "in-series" fibers. These proprioceptors are innervated by fast conducting Ib afferent fibers (Jami, 1992). The deformations of the nerve endings, which are interlaced between the collagen bundles, generate receptor potentials (Fukami, 1981). Because the electrophysiological studies on GTOs have only been conducted in cat leg muscles (Jami, 1992), there is no physiological data available for rat GTOs. Therefore, the first and innovative aim of the present study was to establish the electrophysiological properties of normal GTOs in a rat hindlimb muscle. The second aim of the study was to observe eventual physiological and morphological changes in GTOs after a microgravity period.

## Material and methods

### *Animals and experimental groups*

The experiments were performed on 22 Wistar rats (Harlan, Gannat, France) weighing 300–320 g and randomly divided into two groups: control (CONT:  $n = 13$ ) and hypodynamia–hypokinesia rats (HH:  $n = 9$ ). All the rats were housed individually in separate cages and were allowed food and water ad libitum. They were maintained at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  with a 12/12-h circadian cycle. Animals of the HH group were hindlimb unloaded for 14 days using Morey's model (Morey et al., 1979). Briefly, the tail of each rat was washed, cleaned, dried and wrapped in an antiallergic orthopedic tape-adhesive plaster. This cast, covering less than half of the tail, was secured to an overhead swivel mounted at the top of the cage and which permitted free  $360^\circ$  rotation of the animals. The rats were unloaded at a  $30^\circ$  head-down angle to mimic fluid shifts classically observed in weightlessness. All the experiments as well as the maintenance conditions of the animals received authorizations from the Agricultural and Forest Ministry, National Education Ministry (Veterinary Service of Health and Animal Protection: authorization B 59-00913).

### *Surgical technique*

The rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Supplementary injections ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) were provided when necessary. The depth of the anesthesia was assessed by the absence of blink reflexes.

The dorsal and ventral spinal roots were exposed by a lumbar laminectomy from  $L_2$  to  $L_6$ . The right limb was carefully denervated except for the nerve to the soleus muscle. The right soleus muscle and its tendon were dissected free and the soleus nerve was isolated without compromising the blood supply. Under a stereomicroscope, the soleus nerve was totally freed and cleaned from its surrounding tissues over about 3 mm.

The right hindlimb was placed in a bath filled with circulating thermostatically controlled ( $37^\circ\text{C}$ ) mineral oil. The vertebral column and the hindlimb were rigidly fixed using wire frame. The distal tendon of the soleus muscle was attached with a silk thread (gauge 2, Crepin, Paris, France) to a force transducer (FT 10, 700 Hz, Grass Instruments, Quincy, MA, USA). A pool filled with mineral oil was built with the dorsal skin of the rat to prevent the roots and the spinal cord from drying. The animal body temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$  with a servo control heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Phymep, Paris, France). The soleus muscle length was set to  $L_0$ , the length at which the muscle twitch is maximal. The amplitude of the electrical stimulation (pulse duration 0.2 ms; Grass Instruments stimulator, S8800, Quincy, MA, USA) was the minimum voltage necessary to elicit the maximal muscle twitch  $P_t$ . A monopolar recording platinum electrode was placed under the soleus nerve to record the electroneurogram. A second monopolar platinum electrode lying on an adjacent denervated muscle was used as reference. After the opening of the dura-mater, the right  $L_4$  and  $L_5$  dorsal and ventral roots were transected near their entry into the spinal cord.

### *Identification of GTOs*

Ib afferent fibers were functionally isolated in the dorsal roots using the technique of Hunt and Kufler (1951). The  $L_4$  and  $L_5$  dorsal roots were split into fine filaments. Each filament was placed on a bipolar platinum electrode and stimulated. A filament contained a single afferent fiber if its stimulation elicited an all-or-none response in the soleus muscle nerve electroneurogram. The delay between the stimulation and the evoked response was measured.

The dorsal root filaments were placed individually on a bipolar recording platinum electrode and the soleus muscle nerve was placed on a monopolar stimulating platinum electrode. The Ib afferent fibers were identified and functionally differentiated from the muscle spindle afferents (Ia and II fibers) on the basis of (i) their discharge during the rising phase of a whole muscle twitch contraction and (ii) an absence of response during a ramp-and-hold stretch (Houk and Henneman, 1967; Matthews, 1933; Petit et al., 1997).

Then, to isolate MUs acting on the isolated GTOs, the  $L_4$  and  $L_5$  ventral spinal roots were split into nine or ten filaments placed individually on a bipolar stimulating platinum electrode. Each filament was subsequently divided into fine filaments until the stimulation of some of those



filaments elicited an all-or-none response in the soleus muscle nerve electroneurogram. Additional verification of MU isolation was sometimes performed by stimulating the soleus nerve and recording the all-or-none evoked response on the ventral root filament. The all-or-none response indicated that a single MU from the soleus muscle was stimulated. The effect of the stimulation of each isolated MU on the response of each isolated GTO was tested. When the response of the GTO occurred during the rising phase of the MU twitch contraction, the MU was classified as “in-series” MU (Gregory and Proske, 1979). An example of such a record is shown in Fig. 1A.

*Data recording*

All recordings were made under isometric conditions. For both whole muscle and MU twitch contractions, the following mechanical parameters were determined: the time-to-peak (TTP, the time from the initiation of the force until the peak force,  $P_t$ ) and the half-relaxation time (HRT, duration of the decrease in force between the maximal force and the half-maximal force). For both whole muscle and MU tetanic contractions, the maximal tetanic force ( $P_0$ ) and the index  $P_{20}/P_0$  (ratio between the tetanic force developed at 20 Hz and  $P_0$ ) were measured. MUs were

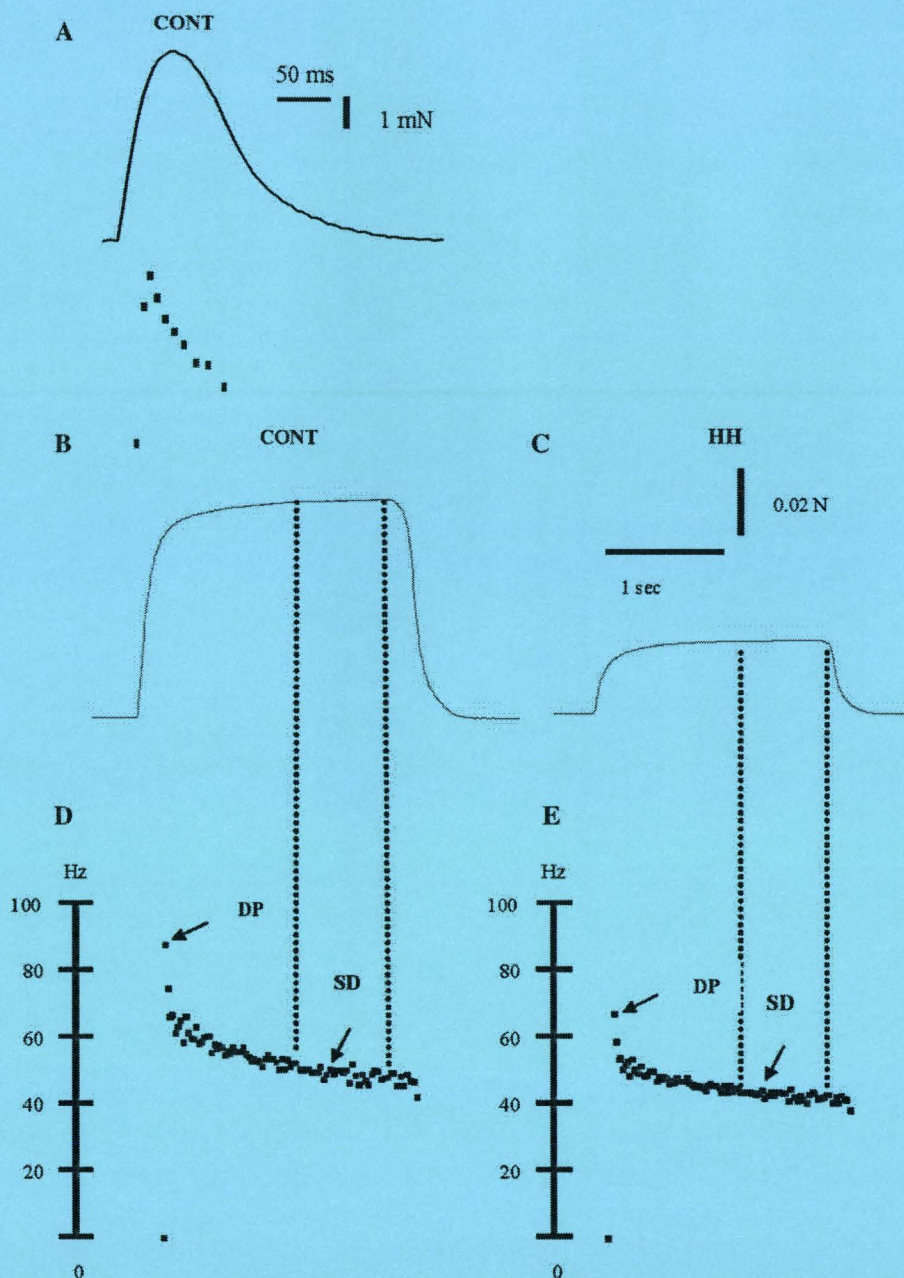


Fig. 1. (A) Discharge of a GTO during the rising phase of an MU twitch contraction. GTO spikes are represented as an instantaneous frequency display. (B–E) Response of a GTO to the representative contractions of an MU stimulated at 80 Hz in an HH muscle (right panel) and a control muscle (left panel). (B and C) MU tetanic fused force (80 Hz). (D and E) GTO responses in instantaneous frequencies. DP: dynamic peak; SD: static discharge.



classified as slow-fatigue resistant (S) or fast-fatigue resistant (FR), according to the TTP and the presence or absence of a force sag (Burke et al., 1973; Picquet et al., 2000).

For each MU/GTO couple, the motor axon was stimulated using 4 successive pulse trains (2 s duration, 2 min interval) with increasing frequencies (20, 40, 80 and 100 Hz) while the GTO afferent discharge was recorded. The dynamic peak (DP) (Davies et al., 1995; Jami and Petit, 1976), the static discharge (SD) and the MUs' tetanic force (Petit et al., 1994) were measured (Figs. 1B–E). Using these parameters, the static sensitivity (SS) was obtained by calculating the ratio between the static discharge and the tetanic force, both measured at the end of the tetanic plateau. The initial component of the dynamic sensitivity (DS) was the instantaneous frequency between the first two impulses of Ib afferent discharge divided by the rate of force development during the same time interval (Davies et al., 1995).

#### Histochemical analysis

At the end of each experiment, the soleus muscle was removed and the muscle wet weight (MWW) determined. Next, the muscle was cut into 3 blocks and only the distal and proximal blocks were kept. These latter blocks were then frozen in liquid isopentane precooled in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further histochemical analysis. At the end of each experiment, the animal was killed by injection of an overdose of anesthetic ( $100\text{ mg kg}^{-1}$ ).

The soleus muscle blocks of the CONT and HH groups were cut into serial transverse sections ( $10\text{ }\mu\text{m}$  thick) using a cryostat microtome (Leica CM 1800, Heidelberg, Germany) set at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Along each extremity, fourteen  $10\text{-}\mu\text{m}$  sections perpendicular to the muscle longitudinal axis were made, the 14-section series being separated by a  $100\text{-}\mu\text{m}$  interval. The sections were stained using the myofibrillar ATP<sub>ase</sub> method (Brooke and Kaiser, 1970; Guth and Samaha, 1969) alternatively with acid (pH 4.3) and alkaline (pH 10.4) preincubations. The histochemical method allowed the characterization of type I (slow Myosin Heavy Chain I), IIa (fast Myosin Heavy Chain IIa) and hybrid (Myosin Heavy Chain I + IIa) soleus muscle fibers. The mean cross-sectional area (CSA) of each fiber type was calculated by measuring the CSA of 200 fibers of the same type.

The GTOs were identified according to the identification criteria of Zelena and Soukup (1983) and Spielmann and Stauffer (1986). The mean CSA of each muscle fiber type, the CSA of each GTO (GTO-CSA) and the GTO intracapsular CSA were measured on ATP<sub>ase</sub> sections using an image analyzer (SAMBA, Grenoble, France). GTO capsular CSA corresponded to the difference between GTO-CSA and GTO intracapsular CSA. The GTO diameter was calculated from the CSA, assuming that the transverse section of the GTO was circular.

The muscle length was always measured under the same conditions, i.e. the knee joint set at  $90^{\circ}$  and the ankle joint set at  $30^{\circ}$  (Riley et al., 1990). To normalize the data, the muscle CSA and the GTO-CSA were measured on the same slice.

#### Statistical analysis

The statistical analyses were made with the GraphPad software Prism 3.0. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant differences were determined using a non-paired Student's *t* test to analyze GTO electrophysiological and muscle histochemical results and a Mann–Whitney test to analyze GTO morphological data. The number of asterisks (\*) indicates the level of significance for the difference between values of a parameter measured in the HH group and in the CONT group, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Symbols (†) indicate a significant difference between the values of a parameter measured for the slow MUs and the fast MUs within the HH group, † $P < 0.05$ ; †† $P < 0.01$ ; ††† $P < 0.001$ .

## Results

#### Body weight, muscle weight and morphological characteristics

After 14 days of HH, the rat body weights (BW:  $294.6 \pm 6.7\text{ g}$ ,  $P < 0.05$ ) and the soleus MWW ( $94.9 \pm 5.4\text{ mg}$ ,  $P < 0.001$ ) were significantly lower than those of the CONT group:  $319.5 \pm 3.9\text{ g}$  and  $169.3 \pm 5.7\text{ mg}$ , respectively. The MWW/BW ratio was significantly different ( $P < 0.001$ ) between the CONT ( $0.53 \pm 0.01$ ) and HH ( $0.32 \pm 0.01$ ) rats.

In the CONT group, type I fiber CSA ( $5123 \pm 131.6\text{ }\mu\text{m}^2$ ) was higher than that of IIa ( $3097 \pm 88.56\text{ }\mu\text{m}^2$ ) and hybrid types ( $2352 \pm 51.53\text{ }\mu\text{m}^2$ ). The percentage differences between type I fiber CSA versus IIa or hybrid fiber CSA were 39% and 54%, respectively, while this difference was 24% between IIa and hybrid fibers. In the HH group, both IIa and hybrid fibers had smaller CSA ( $1185 \pm 27.75\text{ }\mu\text{m}^2$  and  $1115 \pm 29.31\text{ }\mu\text{m}^2$ , respectively) than type I fibers ( $1369 \pm 34.80\text{ }\mu\text{m}^2$ ), but the percent differences were only  $-13\%$  and  $-18.5\%$ , respectively. These values can be explained by the larger atrophy observed in type I fibers after 14 days HH. Compared to the CONT group, the percent decrease in the CSA of type I, IIa and hybrid fibers was  $-73\%$ ,  $-61\%$  and  $-52.5\%$ , respectively.

#### Whole muscle and MUs forces

Whole muscle and MUs mechanical properties are reported in Table 1.  $P_t$ ,  $P_0$ ,  $P_0/\text{MWW}$ , TTP and  $P_{20}/P_0$  were lower in HH group muscles than in CONT group muscles. The percentage decreases were  $-53\%$ ,  $-68\%$ ,  $-45\%$ ,  $-14\%$  and  $-26\%$ , respectively. In the CONT group



Table 1  
Contractile properties of both whole muscle and “in-series” MUs

	Whole muscle		Motor unit		
	CONT ( <i>n</i> = 13)	HH ( <i>n</i> = 9)	CONT ( <i>n</i> = 19)	HH ( <i>n</i> = 15)	
			Slow ( <i>n</i> = 19)	Slow ( <i>n</i> = 11)	Fast ( <i>n</i> = 4)
$P_t$ (mN)	233 ± 11.3	109.3 ± 8.2***	10.5 ± 0.5	6 ± 1***	7 ± 3
$P_0$ (mN)	1478 ± 110.5	478.1 ± 44.2***	5.82 ± 0.41	2.56 ± 0.37***	2.27 ± 0.77
$P_t$ /MWW (mN.mg <sup>-1</sup> )	134.7 ± 5.5	116.9 ± 10.7	–	–	–
$P_0$ /MWW (mN.mg <sup>-1</sup> )	9.36 ± 90	5.18 ± 60**	–	–	–
TTP (ms)	67.4 ± 1.9	58 ± 3.9*	63.47 ± 2.8	57.14 ± 2.9	32.6 ± 5.8††
HRT (ms)	67.3 ± 4.4	66.8 ± 6.4	75.43 ± 6.2	87 ± 5.5	36.9 ± 6.7†††
$P_{20}/P_0$	0.85 ± 0.02	0.63 ± 0.03***	0.88 ± 0.03	0.75 ± 0.03**	0.52 ± 0.16††

The contractile properties of whole soleus muscles and “in-series” MUs were measured in CONT and HH rats, the number being given in parentheses. The contractile parameters are reported as follows:  $P_t$ : Peak twitch tension, maximal isometric strength;  $P_0$ : maximum tetanic tension;  $P_{20}$ : tetanic tension at 20 Hz; TTP: time-to-peak, the time from the initiation of the force until peak force; HRT: half-relaxation time, measured from the peak force to the moment when force decreased to half its highest value; MWW: muscle wet weight.

\*  $P < 0.05$  significant difference with the CONT group.

\*\*  $P < 0.01$  significant difference with the CONT group.

\*\*\*  $P < 0.001$  significant difference with the CONT group.

†  $P < 0.05$  significant difference between slow MUs and fast MUs within the HH group.

††  $P < 0.01$  significant difference between slow MUs and fast MUs within the HH group.

†††  $P < 0.001$  significant difference between slow MUs and fast MUs within the HH group.

muscles, only slow MUs ( $n = 19$ ) were found, while in the HH group, 11 slow MUs and 4 fast MUs were identified on the basis of their contractile properties, according to Burke et al. (1973) and to Picquet et al. (2000) criteria. Fast MUs in the HH group muscles presented significant smaller values in TTP (–43%), HRT (–57%) and  $P_{20}/P_0$  (–31%) than those observed for slow MUs in the same muscles. Slow MUs in HH group muscles had significant smaller values in  $P_t$  (–43%),  $P_0$  (–56%) and in  $P_{20}/P_0$  (–15%) than those observed for slow MUs in CONT group muscles.

#### Comparison of the GTO properties in CONT versus HH group

The electrophysiological properties were studied in the CONT ( $n = 13$  rats) and in the HH ( $n = 9$  rats) groups. In each experiment, between 1 and 5 Ib afferent fibers were isolated for the CONT group and between 1 and 7 Ib afferent fibers for the HH group. The identified GTOs were activated by 1 to 5 MUs in the CONT group, and by 1 to 7 MUs in the HH group. However, our study was not exhaustive and the totality of both soleus MUs and GTO were not identified. Twenty-three and twenty-eight GTO/MU pairs were studied in the CONT and HH groups, respectively.

#### Ib afferent fibers conduction velocity

No significant difference was observed in Ib afferent fiber conduction velocity between the CONT and HH groups ( $36.8 \pm 3.2$  m s<sup>-1</sup> and  $37.4 \pm 1.9$  m s<sup>-1</sup>, respectively).

#### Response during a tetanic contraction

The GTO's discharge exhibited a 1:1 driving (Jami et al., 1985) only during the unfused contraction (20 Hz stim-

ulation frequency) for the 4 HH fast “in-series” MUs, i.e. they discharged one impulse for each force oscillation. In contrast, the GTOs had a typical response during the fused contraction of the slow “in-series” MUs at the same stimulation frequency (Figs. 1B–E). Therefore, the GTO's responses to HH fast “in-series” MUs contractions at 20 Hz stimulation frequency were removed from statistical analysis. Since the DP and SD of GTO responses had similar values during the fused contractions of slow and fast HH group MUs, we pooled the values of the response parameters obtained during these contractions.

The isometric tetanic contractions of a CONT MU and an HH MU eliciting a GTO response are illustrated in Figs. 1B–E. The shapes of the GTO discharges elicited by “in-series” MUs were basically similar and characteristic of an GTO response, but, as detailed below, the discharge frequencies were somewhat different.

#### Absolute response frequencies

Since a GTO was activated by several MUs and since the GTO response in terms of DP and SD values are slightly different as a function of the number of in-series fiber with a given GTO, we have voluntarily selected the more characteristic response of the GTO.

**Dynamic peak (DP).** After a period of HH, the DP of GTO responses to single MU isometric contraction was significantly smaller ( $P < 0.05$ ) than that observed in the CONT group. With a stimulation frequency of 80 Hz, we obtained the following values:  $102 \pm 18$  Hz and  $67 \pm 8$  Hz for the CONT and HH groups, respectively. For a stimulation frequency of 100 Hz, we obtained the same decrease (CONT:  $110 \pm 20$  Hz, HH:  $66 \pm 6$  Hz). The DP was not significantly different in GTOs responses for both groups when the MU stimulation frequency was 20 Hz or 40 Hz.



**Static discharge (SD).** After a period of HH, the SDs of GTO responses were similar to those observed with CONT GTOs. For the CONT group, they were  $42.3 \pm 6.2$ ,  $42.4 \pm 7.1$ ,  $42.4 \pm 7.5$  and  $40 \pm 8.8$  Hz for 20, 40, 80 and 100 Hz stimulation frequencies, respectively. For the HH group, these values were  $35.9 \pm 3.7$ ,  $38.7 \pm 3.7$ ,  $42 \pm 3.9$  and  $39.8 \pm 3.8$  Hz for 20, 40, 80 and 100 Hz stimulation frequencies, respectively.

In the CONT group, as previously described in the cat by Jami and Petit (1976), the values of these parameters were very scattered. After HH, although the scattering was still present, it was reduced compared to the CONT group. We therefore chose to use the dynamic sensitivity and the static sensitivity to objectively quantify the GTO's discharge properties since they are less influenced by MU type and myo-tendinous junction. These more reliable parameters are presented below.

### Sensitivities

**Dynamic sensitivity (DS).** The DS of the GTO response is the ratio between the instantaneous frequency of the first spike interval in the Ib afferent discharge and the mean rate of tension development during the same interval (Davies et al., 1995). After a period of HH, the DS of GTOs responses was similar to that observed with CONT GTOs. For the CONT group, they were  $0.63 \pm 0.13$ ,  $0.43 \pm 0.09$ ,  $0.65 \pm 0.13$  and  $0.78 \pm 0.16$  Hz for 20, 40, 80 and 100 Hz stimulation frequencies, respectively. For the HH group, these values were  $0.82 \pm 0.17$ ,  $0.32 \pm 0.06$ ,  $0.56 \pm 0.11$  and  $0.74 \pm 0.14$  Hz for 20, 40, 80 and 100 Hz stimulation frequencies, respectively.

**Static sensitivity (SS).** After a period of HH, the SS of GTO's responses was significantly higher than that observed in the CONT GTOs responses to MUs contractions: percent increase was +111.6% at 20 Hz stimulation ( $P < 0.05$ ), +125.9% at 40 Hz ( $P < 0.01$ ), +118.7% at 80 Hz ( $P < 0.01$ ) and +91.9% at 100 Hz ( $P < 0.05$ ). This is illustrated by the SS histograms in Fig. 2 for HH and CONT groups. For the 20 Hz stimulation frequency, only the GTO responses to fused contractions were considered for analysis.

### GTOs morphological analysis

Nine and nineteen GTOs were studied in the CONT and HH groups, respectively. Fig. 3 presents serial cross-sections near the midsection of an HH GTO and a CONT GTO. For both GTOs, the capsule is black and the intracapsular collagen is grey.

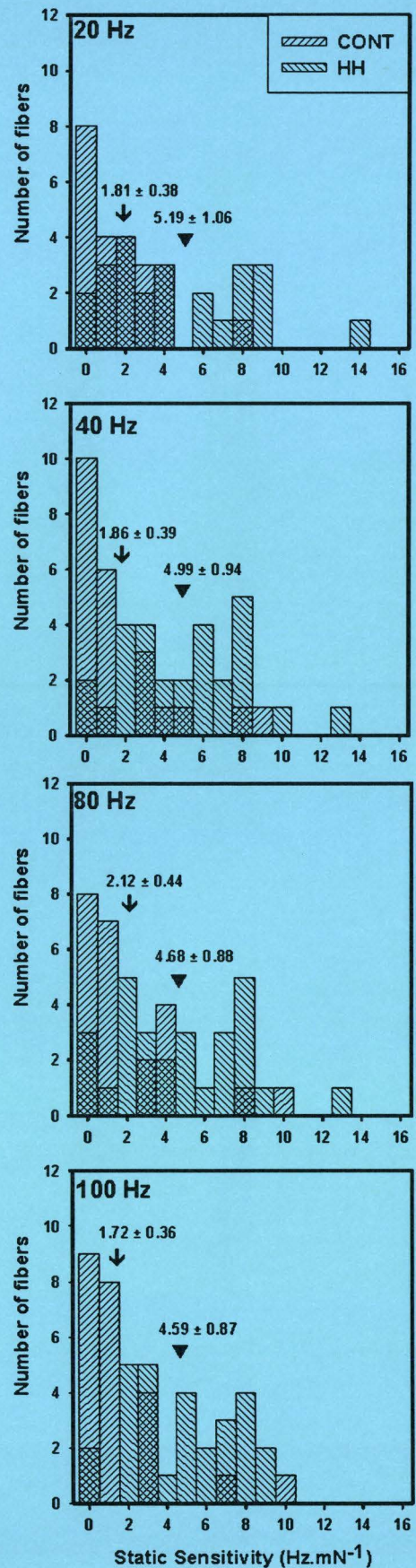


Fig. 2. Frequency distribution of the static sensitivity of GTOs in the CONT and HH groups. The number of fibers indicates the number of GTO/MU pairs. The black arrow represents the CONT group average value ( $\pm$ SEM) and the triangle represents the HH group average value ( $\pm$ SEM).



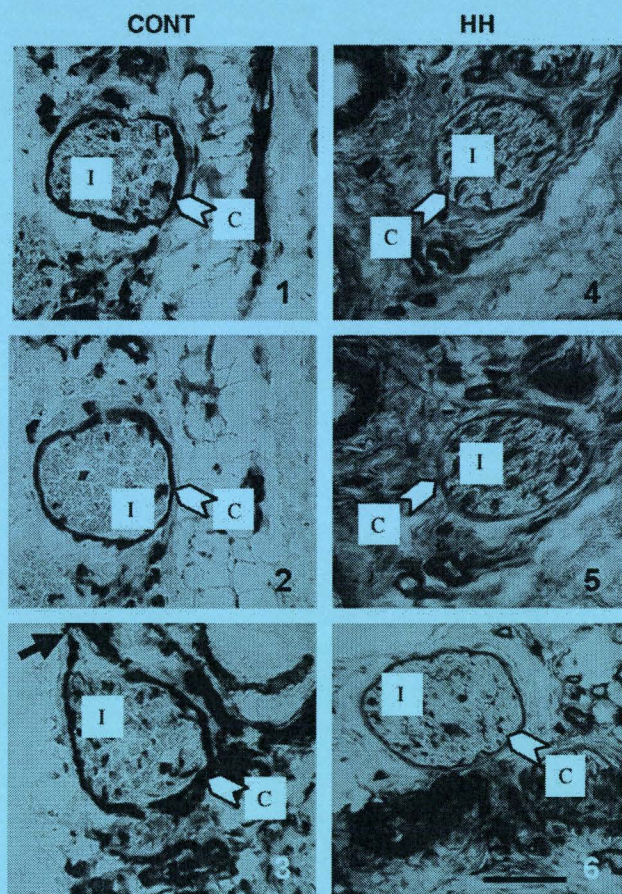


Fig. 3. Serial illustrations of GTOs. Pictures 1, 2, and 3 present a control GTO and pictures 4, 5, and 6 present an HH GTO. Pictures of the midsection are separated by 20  $\mu\text{m}$ . The white arrows labelled C point the capsule. The black arrow points an excrescence that marks the exit of the Ib afferent fiber from the GTO's capsule. I: intracapsular area. Scale bar: 40  $\mu\text{m}$ .

The values of the morphological parameters are shown in Table 2. After a period of HH, the ratio GTO length/muscle length and the ratio GTO diameter/GTO length were unchanged. The GTO length, the GTO capsular CSA, the GTO intracapsular CSA and the GTO-CSA remained the same in both the CONT and HH groups. The ratio GTO-CSA/muscle CSA was increased 16.8 times, by  $0.058 \pm 0.014$  for CONT and  $1.03 \pm 0.3$  for the HH group, respectively.

## Discussion

Our results confirm that morphological and functional modifications occur in whole muscle after HH. Muscle atrophy is concomitant with the decrease in TTP and in  $P_{20}/P_0$ . The changes in kinetic parameters indicate a slow-to-fast muscle phenotype transition which has already been described in several papers (Falempin and In-Albon, 1999; Picquet and Falempin, 2003; Winiarski et al., 1987).

However, the present study examined for the first time the responses of soleus muscle GTOs to the contraction of

single MUs in both CONT rats and in rats exposed to a 14-day period of HH.

### GTOs identification and "in-series" MUs characteristics

In CONT rat soleus muscles, Zelena and Soukup (1983), using a histochemical method, identified an average of sixteen GTOs. In our study, by use of an electrophysiological approach, we functionally isolated, in each experiment, between one and seven Ib afferent fibers. We found one to seven MUs acting on a GTO and one to three GTOs activated by the same MU. We also observed that: (i) the rat GTO response to an "in-series" MU twitch was restricted to the rising phase of the twitch, (ii) the response to a fused MU tetanic contraction had a dynamic peak and a static discharge, and (iii) the GTO was silent during a ramp-and-hold stretch within the physiological range.

### The HH effects on GTOs characteristics

After an HH period, the length, the maximal cross-sectional area (CSA), the GTO capsular CSA and the GTO intracapsular CSA were unchanged. This contrasts with the results of Józsa et al. (1988), who observed after tenotomy or muscle immobilization at a short muscle length a reduction in the intracapsular space. Consequently, the area of the capsule was increased. We found that, on the one hand, the ratio GTO diameter/GTO length, which is considered as a strain marker (Bridgman, 1970; Jami, 1992), remained unchanged, and on the other hand, that the ratio GTO-CSA/muscle CSA was increased 16.8 times after HH. The steadiness of the first ratio indicates that the morphology of GTOs is similar to CONT. The increase in the second ratio proves that the muscle fibers atrophied in HH muscles while the GTOs remained unchanged. Therefore, the stress applied to a GTO by a contracting muscle fiber should be stronger in HH than in CONT muscles. Indeed, it is commonly admitted that one GTO is activated by several MUs, which are named "in-series" MUs. However, within one "in-series" MU, only a few number of fibers really activated the GTO, these fibers are called "in-series", the rest of fibers in the MU are named "in-

Table 2

GTOs and morphological muscle parameters of the CONT and HH groups

	CONT (n = 9)	HH (n = 19)
GTO length/Muscle length	$2.934 \pm 0.403$	$3.507 \pm 0.214$
GTO diameter/GTO length	$2.731 \pm 0.384$	$2.559 \pm 0.35$
GTO length ( $\mu\text{m}$ )	$1041 \pm 143$	$968.6 \pm 137.1$
GTO capsular CSA ( $\mu\text{m}^2$ )	$1834 \pm 505.3$	$2330 \pm 349$
GTO intracapsular CSA ( $\mu\text{m}^2$ )	$3844 \pm 1258$	$5915 \pm 1227$
GTO-CSA ( $\mu\text{m}^2$ )	$5678 \pm 1677$	$8245 \pm 1516$
GTO-CSA/Muscle CSA	$0.058 \pm 0.014$	$1.03 \pm 0.3^{**}$

GTOs: Golgi tendon organs; CSA: Cross-sectional area.

\*\*  $P < 0.01$  significant difference with the CONT group.



parallel". In case of MU stimulation, both the "in-parallel" and "in-series" fibers are activated and the "in-parallel" fibers counteracted the GTO activation by the "in-series" fibers (Spielmann and Stauffer, 1986; Zelena and Soukup, 1983). Then the GTO response was modulated as a function of the proportion of "in-series" and "in-parallel" fibers within an MU. After HH, the GTO discharge is changed. Our hypothesis is a modification of the relative proportion of "in-series" and "in-parallel" fibers. Moreover, Picquet et al. (2000) have also demonstrated that after a period of HH, the MUs became heterogeneous in their phenotypical composition. Consequently, the influence of "in-series" or "in-parallel" fiber could be related to the fiber phenotype. However, our morphological analysis only refers to the gross morphology of the GTOs, then our data did not allow to verify eventual changes both in the Ib ending or in the afferent innervation structure.

As regards the values of the discharge characteristics (DP and SD), we have already mentioned that many influences can account for their scattering (Jami and Petit, 1976). In order to overcome this difficulty, we decided to use sensitivities, and more especially, the dynamic and static sensitivities of GTOs.

The dynamic sensitivity (Davies et al., 1995) did not change in our conditions. The GTOs have a high dynamic sensitivity (Davies et al., 1995; Jami et al., 1985), which depends not only on the MU rate of force and on the GTO mechanical characteristics but also on ionic properties of the nerve terminal (Fukami and Wilkinson, 1977; Proske and Gregory, 1976).

The static sensitivity increased for the fused tetanic contraction after HH. This could be due to the decrease in MU's contractile force after a period of HH, a decrease already shown by Picquet et al. (2000). However, it is known that the GTO's SS is low and almost constant for MU tetanic forces above a level which probably depends on the muscle (Petit et al., 1994). If MU forces are below this level, which is the case for single motor units showing low force generation, the GTO SS is not constant and much higher than the SS observed with high level of contraction. These differences in SS have been ascribed to changes in unloading by the "in-parallel" muscle fibers (Petit et al., 1994). Consequently, if the unloading effect is weak for low contractions, it increases with increasing contractions and tends to saturate at high contractions. After an HH period, the forces developed by slow and fast MUs are much smaller than the forces developed by CONT MUs, as demonstrated by our data and those of Picquet et al. (2000). To explain the maintenance of static discharge after HH, we propose the following hypothesis: The "in-parallel" fibers coming from MU "in-series" with the studied GTO showed a decrease in strength level; therefore, their unloading effect could also be decreased. In these conditions, the balance between "in-series" and "in-parallel" muscle fibers within a given MU could be modified in favor of "in-series" muscle fibers. Consequently, the GTO could be more

activated and its static discharge maintained. This increase could be enhanced by two main factors: firstly, a decrease in the stiffness of contractile and series elastic components (specifically actin-myosin bridges) when the muscular fibers phenotype shifts from type I (slow) to type II (fast), which results in a compliance increase (Canon and Goubel, 1995; Petit et al., 1990); and secondly, the transition in collagen isoform (from type I to type III), which also induces an increase in the compliance of series elastic components (specifically tendon) after HH (Miller et al., 2001).

In conclusion, our results suggest that, after an HH period, the afferent information provided by a GTO activated by a fused tetanic contraction is maintained despite a weak developed tension. The GTOs "become more sensitive" since they keep their high dynamic sensitivity and increase their static sensitivity. After a 14-day period of HH, the GTOs continue to complete their function, which is to signal the muscular force. The afferent message from GTO is conserved, but the isometric muscular tension is weakened, which could modify the organism interaction with its environment.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. M.H. Canu, Ms. L. Cochon and Mr. A. Bous for their helpful technical support. This work was supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES: 8411) and the Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais.

#### References

- Bridgman, C.F., 1970. Comparisons in structure of tendon organs in the rat, cat and man. *J. Comp. Neurol.* 138, 369–372.
- Brooke, M.H., Kaiser, K.K., 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23, 369–379.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., Zajac III, F.E., 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* 234, 723–748.
- Canon, F., Goubel, F., 1995. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. *Pfluegers Arch.* 429, 332–337.
- Davies, P., Petit, J., Scott, J.J., 1995. The dynamic response of Golgi tendon organs to tetanic contraction of in-series motor units. *Brain Res.* 690, 82–91.
- Falempin, M., In-Albon, S.F., 1999. Influence of brief daily tendon vibration on rat soleus muscle in non-weight-bearing situation. *J. Appl. Physiol.* 87, 3–9.
- Fukami, Y., 1981. Responses of isolated Golgi tendon organs of the cat to muscle contraction and electrical stimulation. *J. Physiol.* 318, 429–443.
- Fukami, Y., Wilkinson, R.S., 1977. Responses of isolated Golgi tendon organs of the cat. *J. Physiol.* 265, 673–689.
- Gregory, J.E., Proske, U., 1979. The responses of Golgi tendon organs to stimulation of different combinations of motor units. *J. Physiol.* 295, 251–262.
- Guth, L., Samaha, F.J., 1969. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.* 25, 138–152.



- Houk, J.C., Henneman, E., 1967. Responses of Golgi tendon organs to active contractions of the soleus muscle of the cat. *J. Neurophysiol.* 30, 466–481.
- Hunt, C.C., Kufner, S.W., 1951. Stretch receptor discharges during muscle contraction. *J. Physiol.* 113, 298–315.
- Jami, L., 1992. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol. Rev.* 72, 623–666.
- Jami, L., Petit, J., 1976. Heterogeneity of motor units activating single Golgi tendon organs in cat leg muscles. *Exp. Brain Res.* 24, 485–493.
- Jami, L., Petit, J., Proske, U., Zytynski, D., 1985. Responses of tendon organs to unfused contractions of single motor units. *J. Neurophysiol.* 53, 32–42.
- Józsa, L., Kvist, M., Kannus, P., Järvinen, M., 1988. The effect of tenotomy and immobilization on muscle spindles and tendon organs of the rat calf muscles. A histochemical and morphometrical study. *Acta Neuropathol.* 76, 465–470.
- Matthews, B.H.C., 1933. Nerve endings in mammalian muscle. *J. Physiol. Lond.* 78, 1–33.
- Miller, T.A., Lesniewski, L.A., Muller-Delp, J.M., Majors, A.K., Scalise, D., Delp, M.D., 2001. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* 281, R1710–R1717.
- Morey, E.R., Sabelman, E.E., Turner, R.T., Baylink, D.J., 1979. A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist* 22, S23–S24.
- Petit, J., Filippi, G.M., Gioux, M., Hunt, C.C., Laporte, Y., 1990. Effects of tetanic contraction of motor units of similar type on the initial stiffness to ramp stretch of the cat peroneus longus muscle. *J. Neurophysiol.* 64, 1724–1732.
- Petit, J., Davies, P., Scott, J.J., 1994. Static sensitivity of tendon organs to tetanic contraction of in-series motor units in feline peroneus tertius muscle. *J. Physiol.* 481, 177–184.
- Petit, J., Scott, J.J., Reynolds, K.J., 1997. Tendon organ sensitivity to steady-state isotonic contraction of in-series motor units in feline peroneus tertius muscle. *J. Physiol.* 500, 227–233.
- Picquet, F., Falempin, M., 2003. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Exp. Neurol.* 182, 186–194.
- Picquet, F., Canu, M.H., Falempin, M., 2000. Phenotypic changes in the composition of muscular fibres in rat soleus motor units after 14 days of hindlimb unloading. *Pfluegers Arch.* 440, 229–235.
- Proske, U., Gregory, J.E., 1976. Multiple sites of impulse initiation in a tendon organ. *Exp. Neurol.* 50, 515–520.
- Riley, D.A., Slocum, G.R., Bain, J.L., Sedlak, F.R., Sowa, T.E., Mellender, J.W., 1990. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.* 69, 58–66.
- Spielmann, J.M., Stauffer, E.K., 1986. Morphological observations of motor units connected in-series to Golgi tendon organs. *J. Neurophysiol.* 55, 147–162.
- Winiarski, A.M., Roy, R.R., Alford, E.K., Chiang, P.C., Edgerton, V.R., 1987. Mechanical properties of rat skeletal muscle after hind limb suspension. *Exp. Neurol.* 96, 650–660.
- Zelena, J., Soukup, T., 1983. The in-series and in-parallel components in rat hindlimb tendon organs. *Neuroscience* 9, 899–910.



**Variations in amino acid neurotransmitters in the rat ventral spinal cord after hindlimb unloading**

Treffort N.<sup>1</sup>, Dubreucq G.<sup>2</sup>, Canu M.H. <sup>1</sup>, Guérardel Y.<sup>3</sup>, Falempin M.<sup>1</sup> and Picquet F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, UPRES EA 1032, IFR 118, Bât. SN4, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, <sup>2</sup>Biodex, 59230 St Amand-les-Eaux, <sup>3</sup>Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle, UMR CNRS 8576, IFR 118, Bât C9, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France,

Corresponding author :

Phone : 33 (0) 3 20 43 42 04

Fax : 33 (0) 3 20 43 68 88

E-mail address : nicolas\_treffort@yahoo.fr



### **Abstract**

We have measured by HPLC the neurotransmitter content in L4 and L5 spinal segmental levels in CONT rats, after 7 (HU7) and after 14 days (HU14) of hindlimb unloading. These segments are known to contain the hindlimb muscle motoneurons. The main result is the increase of two neuroexcitators (glutamate and aspartate) and two neuroinhibitors (glycine and GABA) at the L<sub>5</sub> spinal segmental level in HU7 group. Our data indicated that the neurotransmitter changes are restricted to spinal segmental level containing motoneurons from muscles which are strongly modified by HU condition.

Key words: Ventral spinal cord, hindlimb unloading, amino acid neurotransmitters



## 1. Introduction

Motor hindlimb outputs are modulated by supraspinal inputs and peripheral sensory information, [1]. It can be assumed that motor neurons are an integrator center of both inhibitory and excitatory inputs [2]. A modification in the neurotransmitter content could, in turn, modify their discharge properties.

In spinal cord, the main inhibitory neurotransmitters are glycine, taurine, serine, alanine,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) which are agonists of ionotropic glycinergic and GABA receptors [3, 4]. The main excitatory amino acid neurotransmitters are glutamate and aspartate. Glutamate has the specificity to be both a GABA precursor and a neurotransmitter [5]. Moreover, its metabolism is dependent on the content in glutamine [6].

In experimental low-thoracic spinal cord transection in the cat, the supraspinal influences are suppressed and the peripheral sensory information including proprioceptive and cutaneous inputs is disrupted, since the animals are hindlimb paralysed. In this condition, modifications in enzymatic activity linked to GABA and glutamate metabolism and changes in the activity of such post-synaptic receptors have been observed [7]. Moreover, the administration of a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, improved the ability of cats to recover locomotor stepping [8].

On the other hand, it is possible to experimentally reduce the locomotor activity in rat without modifying the integrity of the neuronal circuitry by using hindlimb unloading model (HU model). The impact of HU are more marked in the hindlimb. Indeed, after a 14-day HU period, a postural instability, a decrease in locomotor ability and changes in soleus electromyographic and kinematic activities have been described [9]. These modifications have been attributed to a change in motoneuron activation [10]. It has been shown [11] that during a 14-day HU period, the peripheral afferent inputs recorded at the L<sub>5</sub> segmental level, were immediately diminished on the first four days of HU. This decrease in afferent activity was concomitant with a reduction of soleus electromyographic (EMG) activity. Consequently,



a deprivation of afferent inputs could, through the neurotransmitters, alter the motor nervous message by modification of neuron excitability, firing discharge and recruitment.

Until now, no information has been provided concerning neurotransmitter concentrations after a HU period. In this study, for the first time, we chose to examine amino acids, particularly the neurotransmitters, content at the L<sub>5</sub> and L<sub>4</sub> segmental level. Since it has been established that the major part of motoneuron soma from soleus, medial and lateral gastrocnemius (MG and LG) muscles are localized in the L<sub>5</sub> spinal segment and the motoneuron soma from extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) and plantaris are localized in the L<sub>4</sub> segmental spinal level [11].



## 2. Materials and methods

### *Animals and experimental groups*

The experiments were performed on 48 male Wistar rats (Harlan, Gannat, France) weighing 330-350 g and randomly divided into control (CONT: n = 16) and hindlimb unloading rats (HU: n = 32). The circadian rhythm of these animals was maintained as follows, the light period was set between 12 am and 12 pm, since the rats develop a maximal activity during dark cycle.

Animals of the HU group were hindlimb unloaded by the tail for 7 (HU7 group, n = 16) and 14 (HU14 group, n = 16) days using Morey's model [12], which mimics microgravity effects, such as hypodynamia (absence of weight bearing) and hypokinesia (reduction of activity). Briefly, the tail of each rat was washed, cleaned, dried and wrapped in an antiallergic orthopedic tape-adhesive plaster. This cast, covering less than half of the tail, was secured to an overhead swivel, mounted at the top of the cage and permitting free 360° rotation of the animals. The rats were unloaded at 30° head-down angle.

All the experiments as well as the maintenance conditions of the animals received authorizations from both the Agricultural and Forest Ministry and National Education Ministry (Veterinary Service of Health and Animal Protection : authorization B59-00913).

### *Tissue processing*

To standardize the experiments, animal care and manipulations, sacrifice method and tissue processing timing were strictly similar.

Rats were weighed (BW) and killed by decapitation, without anaesthesia, between 1.30 and 2.30 pm to avoid possible circadian fluctuations in the metabolism of amino acids and to take the samples during the maximal spontaneous activity phase [13]. Moreover, to assess the reality of a muscle atrophy, the soleus muscles were excised and weighed (MWW), since soleus is reported to be atrophied after HU [11].



Immediately after decapitation, L<sub>4</sub> and L<sub>5</sub> spinal segmental levels were exposed by a laminectomy. These segments were chosen since they contained EDL, TA, plantaris and soleus, MG, LG motoneuron soma, respectively [11]. These segments were removed in less than 4 minutes to prevent tissue degradation. The ventral and the dorsal horn were separated according to Paxinos [14] and Malcangio and Bowery [15]. The ventral samples were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen.

#### *Tissue preparation*

The ventral spinal cord segments were homogenized by adding 5 µl of 18 megaohm-cm-deionised water per milligram of tissue and by sonification. Ten µl of the homogenate were collected to determine the protein content using the method of Folin-Lowry [16].

The homogenate was then centrifuged (15000 g × 15 minutes, 4° C), diluted to 100<sup>th</sup> and filtered through a 0.2 µm Millex-GV filter (Nihon Millipore Ltd., Yonezawa, Japan).

#### *Reagents and standard preparation*

All chromatography eluents, standards and samples were prepared using 18 megaohm-cm-deionised water, free of electrochemically active impurities. Amino acids investigated in this study were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France) and from Pierce Chemical Co. (Pierbo Science France, Brebières, France).

Amino acid standard mix containing arginine, lysine, alanine, threonine, glycine, valine, serine, proline, isoleucine, leucine, methionine, histidine, phenylalanine, glutamate, aspartate, cystine, tyrosine, glutamine, GABA and taurine were diluted to 5 µM, 10 µM and 20 µM.

#### *Anion-exchange chromatography analysis*

The chromatography method has already been described in the study of Hanko and Rohrer [17]. Briefly, the chromatography system used for this study was a Dionex BioLC



system configured for *AAA-Direct* (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France). The anion-exchange column set we used was the AminoPac PA 10 (2 X 250 mm; P/N 55406; Dionex) with its PA10 guard (2 X 50 mm; P/N 55407; Dionex). A gradient mixer GM4 (2 mm; P/N 49135; Dionex) was added to homogenize the eluent mix.

The electrochemical waveform was +0.13 V from 0.00 to 0.04 s, + 0.28 V from 0.05 to 0.11 s, +0.55 V from 0.12 to 0.41 s, +0.28 V from 0.42 to 0.56 s, -1.67 V from 0.57 to 0.58 s, +0.93 at 0.59 s, and +0.13 V at 0.60 s, using the pH reference mode. Electric current was integrated between 0.11 and 0.56 s for detection. Disposable gold working electrode was used. Eluents (water in channel A; 250 mM NaOH in channel B; 1 M sodium acetate in channel C) were prepared according to the supplier's recommendations. All amino acids were separated using a flow rate of 0.25 mL/min and a column temperature of 30 °C.

The standards and the samples were placed in an autosampler (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France) for a 24-hour maximal period. The sampling sequence was randomly determined to avoid a possible assay effect and to make sure that each sample would remain less than 24 hours in the autosampler. The chromatograms were analysed and integrated with Chromeleon software, version 6.40 (Dionex Corporation).

### *Statistical analysis*

The statistical analyses were made with GraphPad software Prism 3.0. The significant differences of results expressed as means  $\pm$  SEM were determined by using repeated measures one-way ANOVA analyses for three group comparison and non-paired Student's t-tests with a Welch's correction for two group comparison ( $P < 0.05$ ). Asterisk (\*) indicated a significant difference with the CONT group, \*:  $P < 0.05$ .



### 3. Results

#### *Body and muscle weights*

Sixteen CONT and 32 HU rats were used in this study. After 7 and 14 days of HU, the rat body weights (BW : respectively  $330 \pm 5$  g and  $335 \pm 4$  g) were similar to those of CONT rats ( $335 \pm 1$  g).

The soleus muscle wet weights (MWW) were respectively  $149 \pm 6$  mg for the CONT rats,  $95 \pm 6$  mg for the HU7 rats and  $76 \pm 3$  mg for the HU14 rats. The ratio MWW/BW were respectively  $0.44 \pm 0.02$  mg.g<sup>-1</sup> (CONT rats),  $0.29 \pm 0.04$  mg.g<sup>-1</sup> (HU7 rats) and  $0.22 \pm 0.02$  mg.g<sup>-1</sup> (HU14 rats). The MWW and MWW/BW values were significantly different ( $P < 0.05$ ) between the three groups.

#### *Amino acid variations*

The whole amino acids were identified according to their elution time and in comparison with standard solution. The amino acid concentrations were then normalized to the protein amount and the results were expressed as means  $\pm$  SEM ( $\mu$ mol per gram of protein).

For CONT, HU7 and HU14 groups, the content in alanine ( $F = 1.638$ ;  $P < 0.05$ ), arginine ( $F = 1.867$ ;  $P < 0.05$ ), aspartate ( $F = 2.554$ ;  $P < 0.001$ ), cystine ( $F = 2.086$ ;  $P < 0.01$ ), GABA ( $F = 2.084$ ;  $P < 0.01$ ), glutamate ( $F = 2.595$ ;  $P < 0.001$ ), glycine ( $F = 2.125$ ;  $P < 0.01$ ), lysine ( $F = 2.121$ ;  $P < 0.01$ ), taurine ( $F = 2.058$ ;  $P < 0.01$ ), threonine ( $F = 3.422$ ;  $P < 0.001$ ) and tyrosine ( $F = 2.078$ ;  $P < 0.01$ ) was significantly different between L<sub>4</sub> and L<sub>5</sub> levels.

Within a segmental level between CONT, HU7 and HU14 groups, the results are following:

- **At the L<sub>4</sub> segmental level**, there was no difference for all preceedingly mentioned amino acid concentrations and for the Lowry assays between the three groups.

- **At the L<sub>5</sub> segmental level**, among the preceedingly mentioned amino acids, only the content in GABA ( $t = 2.450$ ;  $P < 0.05$ ) , glycine ( $t = 2.295$ ;  $P < 0.05$ ) ,

Figure 1



glutamate ( $t = 2.158$ ;  $P < 0.05$ ) and aspartate ( $t = 2.229$ ;  $P < 0.05$ ) was modified after HU. The results relative to the changes in amino acid contents are reported in Figure 1. These 4 amino acids showed an increase in HU7 group, respectively + 36 %, 53.7 %, 25.7 % and 37.9 %, in comparison with CONT group. There was no significant difference between CONT and HU14 groups and between HU7 and HU14 groups. In addition, the Lowry assays presented no difference between the three groups. In order to verify a possible imbalance between varying excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters, we normalized each HU7 glycine, GABA, aspartate and glutamate value according to the CONT glycine, GABA, aspartate and glutamate average. The percentages of variation obtained were then compared and presented no difference.



#### 4. Discussion

The main result of this study was the increase in 4 amino acid normalized concentrations, only after 7 days of HU and only in the L<sub>5</sub> segmental level. The muscular atrophy was effective with the change in MWW/BW ratio. Two of these amino acids are inhibitory (glycine and GABA) and excitatory (glutamate and aspartate) neurotransmitters. Glutamate is also the GABA precursor [5], the content in measured glutamate thus included a part devoted to GABA synthesis. Therefore, the measured increase in glutamate content could reflect an increase in glutamate neurotransmitter and/or could participate in the GABA synthesis increase. The other amino acids, reported as "minor" amino acid neurotransmitters (serine, taurine, alanine) [3], and a non-neurotransmitter (glutamine) were not modified after HU at both L<sub>4</sub> and L<sub>5</sub> levels. Taken together, these results confirmed our hypothesis that HU specifically and solely modifies the amino acid neurotransmitters. However, there was no imbalance between excitators and inhibitors. After 14 days of HU, these amino acids did not show any more variation when compared with both CONT and HU7 groups. After the increase in HU7, we highlighted that their values tend to return to their basic levels in HU14. Since there is no significant difference between CONT and HU14 groups and between HU7 and HU14 groups, our hypothesis rest on the existence of an adaptative process occurring about 7 days after HU. Our results could be related to those of Kawano *et al.* [11], who described transitional changes both in afferent and efferent L<sub>5</sub> neurograms. Indeed, they were decreased during the first week of HU and afterwards, they gradually reached their pre-HU values. We suggest that these neurogram variations could be linked to the neurotransmitter changes that we observed. These results could explain in part the modifications observed in locomotion after HU [19, 9].

The results of Tillakaratne *et al.* [18] observed after spinal cord transection, that the changes in GABAergic and glycinergic mediated inhibition occur in parallel in the spinal cord. In the present study, we detected concomitant variations in GABA and glycine, but we did not



get any information about the GABA synthesis from glutamate. However, GABA and glutamate showed similar increase while glutamine (glutamate precursor) did not vary. These observations suggest a change in glutamate turn over. Both glutamate and aspartate were also seen to be increased. Like glutamate, aspartate is the second important excitatory amino acid neurotransmitter in the spinal cord. Glutamate and aspartate metabolisms are linked [5]. We therefore hypothesize that their metabolisms are similarly modified. Moreover, our data showed that L<sub>4</sub> level could be considered as a negative control, since the neurotransmitter content was not modified. This spinal level has been reported to contain motoneurons of TA whose EMG activity is not modified during HU [11]. Unfortunately, no data relative to EMG activity of EDL and plantaris are available in the literature.

In conclusion, our results showed that the neurotransmitters are only modified at the L<sub>5</sub> segmental spinal level. Further studies about the neurotransmitter pathways are necessary to explain the modification observed in locomotion after HU.

*Acknowledgements:* This work was supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales (8632).



## References

- [1] Ribotta, M.G., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A. and Orsal, D. (2000) Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci.*, 20,5144-5152.
- [2] Dietz, V. (2003) Spinal cord pattern generators for locomotion. *Clin Neurophysiol.*, 114,1379-1389.
- [3] Legendre, P. (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 760-793
- [4] Cupello, A. (2003) Neuronal transmembrane chloride electrochemical gradient: a key player in GABA<sub>A</sub> receptor activation physiological effect. *Amino Acids*, 24, 335-346.
- [5] Johnson, J.L. (1972) Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. *Brain Res.*, 37,1-19.
- [6] Balazs, R., Machiyama, Y., Hammond, B.J., Julian, T. and Richter, D. (1970) The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem. J.*, 116, 445-461.
- [7] Tillakaratne, N.J., De Leon, R.D., Hoang, T.X., Roy, R.R., Edgerton, V.R. and Tobin, A.J. (2002) Use-dependent modulation of inhibitory capacity in the feline lumbar spinal cord. *J Neurosci.*, 22,3130-3143.
- [8] Edgerton, V.R., De Leon, R.D., Tillakaratne, N., Recktenwald, M.R., Hodgson, J.A. and Roy, R.R. (1997) Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing. *Adv Neurol.*, 72, 233-247.
- [9] Canu, M.H. and Falempin, M. (1998) Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, 78, 509-515.
- [10] Canu, M.H., Garnier, C., Lepoutre, F.X. and Falempin, M. (2005) A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav Brain Res.*, 157, 309-321.



- [11] Kawano, F., Ishihara, A., Stevens, J.L., Wang, X.D., Ohshima, S., Horisaka, M., Maeda, Y., Nonaka, I. and Ohira, Y. (2004) Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 287, R76-86.
- [12] Morey, E.R., Sabelman, E.E., Turner, R.T. and Baylink, D.J. (1979) A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist.*, 22, S23-S24.
- [13] Stewart, K.T., Rosenwasser, A.M. and Adler, N.T. (1985) Interactions between nocturnal feeding and wheel running patterns in the rat. *Physiol. Behav.*, 34, 601-608.
- [14] Paxinos, G. (1995) *The rat nervous system*. Academic Press, pp. 39-44.
- [15] Malcangio, M. and Bowery, N.G. (1994) Spinal cord SP release and hyperalgesia in monoarthritic rats: involvement of the GABA<sub>B</sub> receptor system. *Br. J. Pharmacol.*, 113, 1561-1566.
- [16] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- [17] Hanko, V.P. and Rohrer, J.S. (2004) Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 324, 29-38.
- [18] Tillakaratne, N.J., Mouria, M., Ziv, N.B., Roy, R.R., Edgerton, V.R. and Tobin, A.J. (2000) Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection. *J Neurosci Res.*, 60, 219-230.
- [19] Canu, M.H. and Falempin, M. (1997) Effect of hindlimb unloading on two hindlimb muscles during treadmill locomotion in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, 75, 283-288.



Figure legends:

Figure 1.

Variations of amino acid neurotransmitter concentrations normalized with the protein amount. We have voluntarily chosen to illustrate only the amino acid neurotransmitters which are significantly modified during HU.

Asterisk (\*) indicates a significant difference with the CONT group, \*:  $P < 0.05$ .

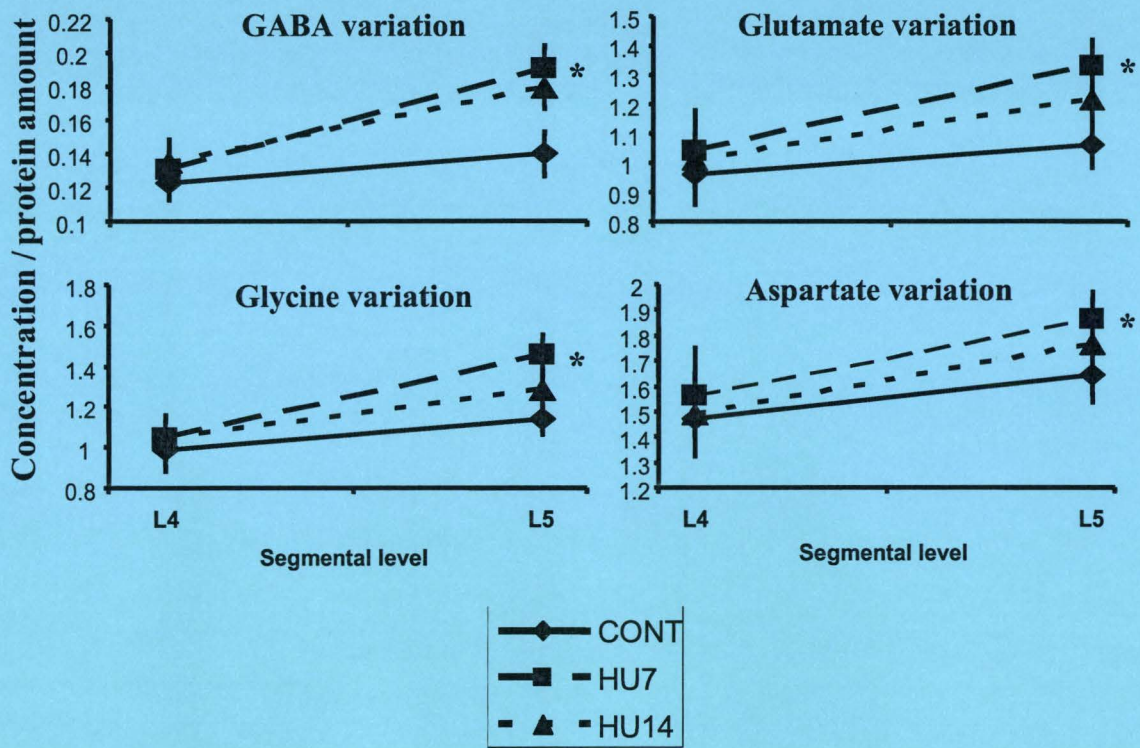


Figure 1 : Treffort et al

