

Université de Montréal

**Influence de la mécanoréception faciale sur les
comportements moteurs chez l’opossum nouveau-né,**

Monodelphis domestica

par

Marie-Josée Desmarais

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et des sciences
en vue de l’obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en sciences biologiques

Juillet, 2015

© Marie-Josée Desmarais, 2015

Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé :

**Influence de la mécanoréception faciale sur les
comportements moteurs chez l’opossum nouveau-né,
*Monodelphis domestica***

Présenté par :

Marie-Josée Desmarais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Sophie Breton, présidente

Dr Jean-Pierre Gossard, membre du jury

Dre Thérèse Cabana, directrice de recherche

Dr Jean-François Pflieger, co-directeur de recherche

Liste des abréviations

CPG : Générateur central de rythme (« central pattern generator »)

EMG : Électromyogramme

FB : Fast Blue

FL : Forelimb

G1, G2 et G3 : Groupes de marsupiaux distingués par leur état de développement à la naissance

MA : Membre antérieur

MC : Merkel cell

MP : Membre postérieur

P : Jour postnatal

P2 : Récepteurs purinergiques de type 2 (purinergic receptors 2)

PPADS : Acide pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic

SA I : Adaptation lente de type 1 (Slow adapting 1)

YM298198 : 6-Amino-N-cyclohexyl-N,3-dimethylthiazolo[3,2- α]benzimidazole-2-carboxamide hydrochloride

Résumé

L'opossum naît dans un état très immature, mais rampe avec ses membres antérieurs (MA) de l'orifice urogénital de la mère à une tétine, où il s'attache pour poursuivre son développement. Des informations sensorielles sont nécessaires pour guider le nouveau-né vers une tétine et déclencher son attachement. Des expériences précédentes ont montré que le système du trijumeau, dont dépend l'innervation somesthésique du museau, influence les mouvements précoces des MA. Le présent projet vise à déterminer si les mécanorécepteurs faciaux sont fonctionnels et exercent une influence sur les MA. On s'intéresse particulièrement aux cellules de Merkel, un mécanorécepteur épidermique innervé par des fibres à adaptation lente de type I (SA I). Ces cellules ont été localisées sur le pourtour du museau de l'opossum nouveau-né en utilisant un traceur cellulaire, l'AM1-43. Nous avons analysé les réponses musculaires des MA consécutives à l'application de forces calibrées au museau sur des préparations *in vitro*. Ces réponses sont bilatérales et simultanées, très variables, et leur intensité augmente avec la force de la stimulation. Lors de stimulations répétitives pendant 60 min, les réponses diminuent avec le temps. Le retrait de la peau faciale abolit presque ces réponses. De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate, qui affecte l'activité des fibres SA I, ou d'un antagoniste des récepteurs purinergiques les diminue fortement, suggérant une participation des cellules de Merkel. Ces résultats soutiennent que le sens du toucher facial relayé par le système du trijumeau est fonctionnel chez l'opossum nouveau-né et qu'il pourrait influencer les mouvements des MA.

Mots clés : Cellules de Merkel, Comportement moteur, Locomotion, Opossum, Système du trijumeau

Abstract

The opossum, *Monodelphis domestica*, is born very immature but crawls, unaided, with its forelimbs (FL) from the mother's birth canal to a nipple where it attaches to pursue its development. Sensory clues are needed to guide the newborn to the nipple and trigger its attachment to it. We postulated that the trigeminal system, responsible for sensory innervation of the face, is involved. Indeed, light pressure applied on the snout evokes FL movements *in vivo*, low intensity electrical stimulation of the trigeminal ganglion induces motor responses of the FL *in vitro*, and trigeminal fibers is distributed in the facial dermis and basal epidermis of the newborn. Also, slowly adapting mechanosensory receptors Merkel cells (AM1-43 positive) are present in the face epidermis. To determine if Merkel cells exert an influence on locomotion of newborn opossums, we analyzed the FL muscles responses following application of calibrated forces on the snout in *in vitro* preparations. Pressure applied to the face induced bilateral and simultaneous FL motor responses, which intensity is proportional to stimulation force. Following consecutive stimulations during 60 min, the responses tended to decrease. Removing the facial skin nearly abolished the responses. Bath applications of the glutamate metabotropic receptor antagonist YM298198, and of the purinergic receptors (P2) antagonist PPADS, decreased the muscles responses. These results support that touch sensitivity of the snout relayed by the trigeminal system is functional in newborn opossums and may influence FL movement, possibly contributing to guiding the animal to the nipple.

Keywords: Merkel cells, trigeminal system, locomotion, motor behavior, opossum

Tables des matières

| | |
|--|------|
| Liste des abréviations | iii |
| Résumé | iv |
| Abstract..... | v |
| Tables des matières | vi |
| Liste des figures | vii |
| Liste des figures de l'article..... | viii |
| Remerciements..... | ix |
| 1. INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Les marsupiaux..... | 3 |
| 1.2 La naissance chez les marsupiaux..... | 4 |
| 1.3 Morphologie des nouveau-nés marsupiaux..... | 11 |
| 1.4 Modèle de recherche | 14 |
| 1.4.1 Opossum nouveau-né..... | 15 |
| 1.4.2 Système nerveux à la naissance..... | 17 |
| 1.4.2.1 Moelle épinière | 17 |
| 1.4.2.2 Voies encéphalospinales et spinoencéphaliques..... | 19 |
| 1.4.2.3 Systèmes sensorielles céphaliques spéciaux..... | 22 |
| 1.4.2.4 Somesthésie faciale et système du trijumeau | 24 |
| Cellules de Merkel | 28 |
| 1.5 Problématique | 31 |
| 2. MATÉRIELS & MÉTHODES | 32 |
| 2.1 Préparation des animaux | 32 |
| 2.2 Stimulations faciales | 35 |
| 2.3 Expériences pharmacologiques..... | 35 |
| 2.4 Analyse des données | 36 |
| 3. Article scientifique produit au cours de ce travail | 38 |
| Marie-Josée Desmarais, France Beauregard, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger..... | 38 |
| Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums, <i>Monodelphis domestica</i> | 38 |
| 4. DISCUSSION & CONCLUSION | 67 |
| Bibliographie | 77 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Kangourou roux dans la posture de parturition. | 6 |
| Figure 2 : La naissance chez le bandicoot brun du nord. | 8 |
| Figure 3 : La naissance chez le chat marsupial du nord. | 9 |
| Figure 4 : Développement du rhinarium chez différents marsupiaux nouveau-nés..... | 13 |
| Figure 5 : Patte antérieure d'un opossum nouveau-né telle que vue en microscopie électronique à balayage..... | 16 |
| Figure 6 : Différents mécanorécepteurs de la peau. | 29 |

Liste des figures de l'article

| | |
|--|----|
| Figure 1 : (A) Schematic representation of an <i>in vitro</i> preparation of a newborn opossum. (B1) Raw EMG. (B2) EMG rectified and with a reduced sampling rate. | 59 |
| Figure 2 : Transverse section of newborn's head..... | 60 |
| Figure 3 : (A) Microphotographs of head sections showing AM1-43 labeled cells and neurites. (B) Schematic drawing of a sagittal and cross sections of the head of a newborn opossum..... | 61 |
| Figure 4 : Arm extensor response in relation to force stimulation..... | 62 |
| Figure 5 : Triceps response evoked by mechanical stimulation of the facial skin over time. | 63 |
| Figure 6 : Triceps responses evoked by mechanical stimulation of the face with and without the skin..... | 64 |
| Figure 7 : Effect of YM298198 bath application on triceps responses following mechanical pressure applied to the snout skin. | 65 |
| Figure 8 : Effect of P2X antagonist, PPADS, on triceps response evoked by pressure applied on the snout skin..... | 66 |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon codirecteur de recherche, Dr Jean-François Pflieger pour son aide lors de mes expérimentations ainsi que pour ses conseils, son soutien et ses encouragements tout au long de ma maîtrise. Je remercie aussi ma directrice de maîtrise, Dre Thérèse Cabana pour ses conseils et sa bonne humeur.

Je remercie le Dr Réjean Dubuc pour le prêt du transducteur de force qui m'a permis de rendre mes expérimentations beaucoup plus simples.

Je remercie mes très chers collègues de laboratoire : Thierry et Matthieu pour leur aide très précieuse lors de mes débuts dans le laboratoire. Je remercie Valérie, une stagiaire qui a mis de la joie dans le laboratoire, Naussicca et Frédéric pour leur aide, leur conseil et leur soutien moral. Il ne faut pas oublier tous les étudiants en initiation à la recherche et en stage qui ont amené de la vie dans le laboratoire.

Je remercie toute ma famille et mes amis pour leur appui moral et affectif tout au long de ces études.

1. INTRODUCTION

Les mammifères comprennent trois sous-classes - les protothériens (ou monotrèmes), les métathériens (ou marsupiaux) et les euthériens (ou placentaires) - qui sont distinguées le plus clairement par leur modes de reproduction très différents (Tyndale-Biscoe & Renfree, 1987). En effet, les monotrèmes pondent des œufs et les petits éclosent dans un état relativement immature, les marsupiaux donnent naissance à des petits très immatures qui poursuivent leur maturation hors de l'utérus, attachés aux tétines maternelles généralement protégées par une poche marsupiale, et les placentaires ont un développement prolongé dans l'utérus qui leur permet d'atteindre une plus grande maturité à la naissance. Même s'il a longtemps été allégué que le mode de reproduction des placentaires est plus évolué que celui des marsupiaux, il pourrait plutôt s'agir de stratégies différentes avec chacune ses avantages et ses désavantages (Edwards & Deakin, 2013).

En raison de l'état de développement très immature à la naissance des marsupiaux, il est possible d'étudier postnatalement chez ces animaux des évènements du développement qui se produisent *in utero* chez les mammifères placentaires, incluant des aspects comportementaux. C'est pourquoi notre laboratoire utilise un marsupial, l'opossum gris à queue courte *Monodelphis domestica*, comme modèle d'étude développementale des systèmes moteurs.

Cassidy et al. (1994) ont étudié l'apparition des réflexes sensorimoteurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Un réflexe sensorimoteur est caractérisé par une réponse motrice spontanée et involontaire qui est déclenchée par une stimulation sensorielle spécifique. La

majeure partie de ces réflexes commencent à apparaître à partir du jour postnatal 15 (P15), selon un double gradient rostrocaudal et proximodistal. Les réflexes sous contrôle strictement spinal (mono- ou oligosynaptiques) tels que le retrait suite à un pincement du membre ou l'agrippement, apparaissent avant les réflexes nécessitant la participation de l'encéphale (polysynaptiques), comme le redressement corporel et le placement tactile et visuel. De plus, les réflexes nécessitant une seule articulation, comme le sautellement, se développent avant ceux impliquant un membre entier. Enfin, les réflexes impliquant une seule ceinture, comme l'extension croisée, apparaissent avant ceux impliquant les deux ceintures, telle l'extension longue croisée.

Pflieger et al. (1996) ont étudié le développement de la locomotion spontanée de l'opossum *Monodelphis domestica*. Tel que mentionné précédemment, le nouveau-né exécute des mouvements rythmiques et alternés des membres antérieurs (MA), accompagnés de mouvement sinueux du corps qui lui permettent de ramper sur le ventre de la mère jusqu'à une tétine. Les membres postérieurs (MP) sont immobiles. De plus, le nouveau-né effectue des extensions et flexions des doigts pour agripper le poil de la mère, à la naissance. Ces mouvements des doigts semblent indissociables des mouvements locomoteurs car l'empoignement réflexe apparaît seulement après la deuxième semaine. Les petits sont incapables de supporter leur poids avant P10 : lorsque détachés de la mère et placés sur une surface, ils tombent sur le côté. Toujours lorsque les bébés sont détachés de leur mère, on a constaté que les MA commencent à pouvoir supporter le corps après P10, mais que les MP ne le peuvent qu'à partir de P20 environ, ce qui résulte en un mouvement de pivotement sur l'arrière-train. À partir de trois semaines, et lorsque les petits commencent à se détacher

naturellement de leur mère les MP peuvent supporter le poids du corps. Ainsi commence la locomotion quadrupède, mais elle est irrégulière. La bonne coordination entre les MA et les MP débute vers P30 et la locomotion est mature vers P50.

Le travail faisant l'objet du présent mémoire s'inscrit dans le cadre plus spécifique de l'influence des sens pouvant influencer les comportements locomoteurs de l'opossum, particulièrement à la naissance. Dans cette introduction, je vais décrire la naissance chez les marsupiaux ainsi que certains aspects de la morphologie des nouveau-nés, puis j'aborderai l'état des systèmes sensorimoteurs à la naissance ainsi que leur développement chez l'opossum. Enfin, j'exposerai la problématique de mon projet.

1.1 Les marsupiaux

Tel que mentionné, le mode de reproduction des marsupiaux est caractérisé par une naissance précoce de petits très immatures. Entre 1 et 14 petits par portée, selon les espèces (Nelson & Gemmell, 2004), poursuivent leur développement en dehors du ventre de la mère, attachés aux tétines, le plus souvent à l'intérieur d'une poche marsupiale, mais pas toujours (Russell, 1982a). Pour ce faire, et puisque la mère ne l'y transporte pas, le nouveau-né encore dans un état embryonnaire doit pouvoir atteindre la poche puis trouver une tétine et s'y attacher pour pouvoir se nourrir et survivre (Gemmell et al., 2002; Nelson & Gemmell, 2004).

Sharman (1973) distingue quatre phases développementales des marsupiaux. La première phase est celle durant laquelle les petits se développent dans l'utérus et peut durer de

10.5 à 38 jours, selon les espèces. La deuxième phase, de quelques minutes, voit les nouveau-nés libres entre la sortie de l'orifice urogénital et l'attachement à une tétine, qu'ils doivent trouver par eux-mêmes. La troisième phase consiste en toute la période d'attachement à la tétine, généralement longue, et se déroule dans la poche. Les petits se nourrissent d'un lait dont la composition change au cours du temps, en relation avec leur développement. Cette phase varie selon les espèces de 2 semaines à 11 mois et correspond, chez les espèces sans poche, au temps où l'épithélium de la bouche est fusionné à la peau de la tétine (Cabana, 2000). Enfin, la quatrième phase est la période de durée variable durant laquelle les petits peuvent sortir de la poche, mais reviennent encore se nourrir du lait de la mère. Ils sont ensuite sevrés et indépendants.

1.2 La naissance chez les marsupiaux

La naissance a été étudiée de manière approfondie chez quelques espèces à l'intérieur de cinq familles de marsupiaux : une famille américaine, les Didelphidés (opossums américains) et quatre familles australiennes, les Dasyuridés (marsupiaux carnivores), les Peramélidés (bandicoots), les Phalangeridés (possums) et les Macropodidés (wallabies et kangourous) (Nelson & Gemmell, 2004). Ces études reconnaissent trois positions différentes que peut prendre la mère lors de la parturition, qui sont grandement liées au type de poche marsupiale qu'elle possède : ouverte vers l'avant, ouverte vers l'arrière ou sans poche délimitée (parfois désigné par le terme « champ marsupial ») (Gemmell et al., 2002).

Parmi ces familles, des espèces de trois familles possèdent une poche ouverte vers l'avant et un mode de parturition semblable. Chez les Didelphidés, il y a l'opossum d'Amérique (*Didelphis virginiana*) (McCrary, 1938; Reynold, 1952) et la souris-opossum de Robinson (*Marmosa robinsoni*) (Barnes & Barthold, 1969), chez les Phalangeridés, le phalanger-renard (*Trichosurus vulpecula*) (Lyne et al., 1959; Veitch et al., 2000) et chez les Macropodidés, le kangourou géant (*Macropus giganteus*) (Poole, 1975), le kangourou roux (*Macropus rufus*) (Sharman & Calaby, 1964), le wallaby de l'île Eugène (*Macropus eugenii*) (Renfree et al., 1989) et le quokka (*Setonix brachyurus*) (Cannon et al., 1976). Lors de la parturition, la mère s'assied sur la base de sa queue qui est disposée vers l'avant entre ses pattes postérieures (Fig. 1). Ainsi, l'ouverture de la poche et l'orifice urogénital sont orientés vers le haut. Avant la naissance des petits, la mère lèche vigoureusement le pourtour de l'orifice urogénital et la poche. Un peu avant l'apparition des petits, du fluide est expulsé, puis la mère lèche vigoureusement les petits et enlève un sac rempli de fluide en tirant sur le cordon ombilical qui se brise du même fait. Peu importe l'orientation des petits à la sortie du sinus, ils se réorientent immédiatement avec la tête vers le haut dans la direction de l'ouverture de la poche. La naissance est très rapide, il s'écoule de 2,5 à 3 min entre la sortie de l'orifice et l'entrée dans la poche (Tyndale-Biscoe & Renfree, 1987; Veitch et al., 2000; Gemmell et al., 2002).



Figure 1 : Kangourou roux dans la posture de parturition.

Tiré de : Gemmell et al., 2002

Chez les bandicoots tels que le bandicoot brun du nord (*Isodon macrourus*, Famille des Péramélidés), la poche est ouverte vers l'arrière (Lyne, 1974). Un peu avant la naissance, la mère se place sur le côté avec une patte arrière soulevée dans les airs et le corps courbé de manière à ce que sa tête soit près du sinus urogénital. Dans cette position, l'orifice est au-dessus de la poche, mais décalé horizontalement (Fig. 2a). Quelques minutes avant la parturition, la mère lèche vigoureusement le pourtour de l'orifice urogénital et de la poche de même que l'intérieur des pattes arrières. Il n'y a pas de fluide expulsé avant la sortie du premier bébé. La mère lèche les nouveau-nés pour les libérer de la membrane amniotique, mais le cordon ombilical reste attaché jusqu'à leur fixation aux tétines (Fig. 2b). La mère change de côté lors de la naissance et du voyage des petits vers la poche. Ainsi, ceux-ci « glissent » sur le chemin

de poils humidifié dans la poche et sont même parfois balancés au bout du cordon ombilical. Leur transfert du sinus à la poche prend environ 5 min (Gemmell et al., 1999; Gemmell, 2002; Nelson & Gemmell, 2004).

Chez les Dasyuridés, tel que le chat marsupial du nord (*Dasyurus hallucatus*), la poche rudimentaire consiste en un repli de peau abdominale qui se forme lors de la gestation. Quelques heures avant la naissance, la mère se lèche les pattes, la queue, le sinus urogénital, la poche ainsi que la surface entre les deux. Peu de temps avant la parturition, elle se positionne sur ses quatre pattes avec les hanches soulevées et la queue loin de l'orifice (Fig. 3a). À la naissance, quelques gouttes de fluide sont expulsées, suivies d'une colonne de fluide gélatineux qui contient les bébés. Les nouveau-nés « nagent » rapidement vers le haut dans cette colonne (Fig. 3b), s'accrochent aux poils et continuent de se déplacer vers la poche située plus bas. La naissance dure environ 10 min. Chez cette espèce, le nombre de nouveau-nés excède le nombre de tétines et il n'est pas rare que plusieurs tombent au sol (Tyndale-Biscoe & Renfree, 1987; Gemmell et al., 2002; Nelson & Gemmell, 2003, 2004).

La façon dont les nouveau-nés se rendent de l'orifice urogénital aux tétines varie selon la position de la mère à la naissance (Nelson & Gemmell, 2004). Les nouveau-nés Macropodidés, dont la gestation est la plus longue, grimpent d'abord vers le haut du ventre où se situe l'ouverture de la poche en effectuant des mouvements des MA alternés tandis que la tête se balance d'un côté à l'autre, puis se tournent de 180° pour entrer dans la poche. Les nouveau-nés Péramélidés rampent latéralement puis vers le bas par des mouvements de tortillement semblables à ceux d'un serpent. Les petits Dasyuridés voyagent vers le haut dans

le fluide gélatineux, puis vers le bas en utilisant les mêmes mouvements que les Péramélidés, mais plus rapides pour pouvoir remonter contre la gravité dans la colonne de gel (Gemmell et al., 2002; Nelson & Gemmell, 2004).

a)



b)



Figure 2 : La naissance chez le bandicoot brun du nord. a) Une mère dans la position de naissance dont le sinus urogénital (flèche) est au-dessus de la poche. **b)** Les petits sont toujours attachés aux cordons ombilicaux (flèches). Un petit (y) est visible attaché à une tétine (t). **Tiré de :** Gemmell et al., 1999

a)



b)

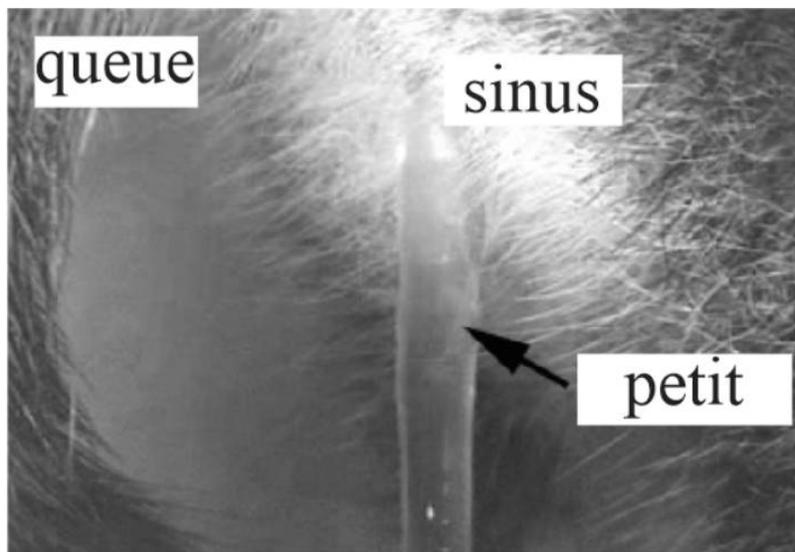


Figure 3 : La naissance chez le chat marsupial du nord. a) Une mère dans la position de naissance. **b)** Un nouveau-né qui nage dans la colonne gélatineuse.
Tiré de : a) Gemmell et al., 2002; b) Nelson & Gemmell, 2003

Par ailleurs, la taille et l'état de développement des nouveau-nés correspondent à la tâche à effectuer et sont corrélés à l'intervalle de temps entre le début de la gastrulation et la naissance, menant Hughes & Hall (1988) à décrire trois groupes de nouveau-nés marsupiaux. Le groupe 1

(G1) inclut les Dasyuridés, tels que le diable de Tasmanie et le chat marsupial du nord, qui présentent le stade de développement le moins avancé. Le deuxième groupe (G2) est intermédiaire, il comporte les Didelphidés (incluant l’opossum d’Amérique et l’opossum gris à queue courte), les Péramélidés (incluant le bandicoot brun du nord), et les Phalangéridés (incluant le phalanger-renard). Enfin, les Macropodidés (incluant le kangourou géant et le kangourou roux) montrent le stade de développement le plus avancé, ils font partie du troisième groupe (G3). Le laps de temps entre le début de la gastrulation et la naissance est d’environ 3 jours pour le G1, 6 jours pour le G2 et 11 à 12 jours pour le G3. La durée de développement étant beaucoup plus longue chez les Macropodidés (G3), il en résulte un poids plus élevé et un niveau de spécialisation structurale plus grand qui leur permettent de grimper sur le ventre de la mère grâce à des mouvements des MA. En effet, une musculature et une ossature des MA mieux développées leur permettent de soutenir leur poids (Hughes et al., 1989). De plus, leur réserve d’énergie est assez élevée pour qu’ils puissent refaire le parcours entre l’orifice urogénital et la poche. Par comparaison, les Dasyuridés (G1) sont moins développés, donc ils ont un poids peu élevé qui peut faciliter la nage contre la gravité dans la colonne gélatineuse et sur une distance moins grande que pour les Macropodidés. En raison de leur petite taille, la tâche relative à accomplir pourrait néanmoins être équivalente (Veitch et al., 2000; Nelson & Gemmell, 2004).

Dans tous les cas, des sens céphaliques sont présumément nécessaires pour guider le nouveau-né de l’orifice urogénital vers la poche, pour localiser une tétine et pour s’y attacher. En raison du parcours et du niveau de maturation des nouveau-nés chez les différentes espèces de marsupiaux, il est possible, voire probable, que les sens utilisés ne soient pas les mêmes chez tous. Il en sera discuté plus en détail dans la section 1.4.2.3.

1.3 Morphologie des nouveau-nés marsupiaux

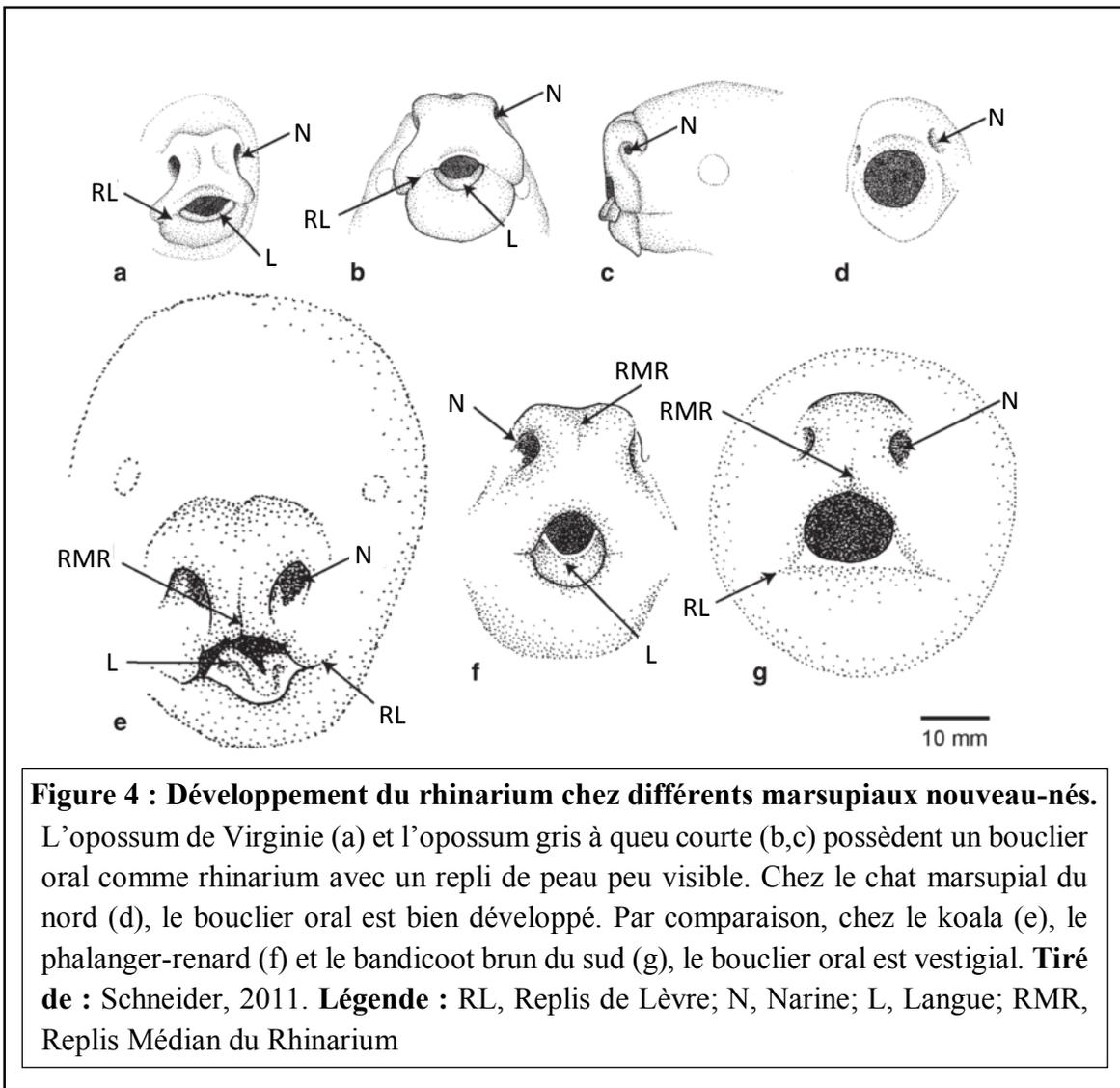
Même si, comme vu précédemment, il existe des différences interspécifiques, les marsupiaux ont atteint à la naissance un stade de développement beaucoup moins avancé que n'importe quelle espèce placentaire. Plusieurs de leurs organes sont dans un état embryonnaire. Néanmoins, le nouveau-né doit atteindre une tétine et s'y attacher pour boire le lait maternel et survivre. Le stade de développement atteint à la naissance correspond assez bien à la taille (Hughes & Hall, 1988).

Le poids des nouveau-nés varie beaucoup selon les espèces et est assez bien corrélé aux poids de la femelle adulte (Tyndale-Biscoe, 2005). Par exemple, le nouveau-né du kangourou géant (*Macropus giganteus*) ou du kangourou roux (*M. rufus*) pèse en moyenne 800 mg et une femelle adulte pèse en moyenne 28 kg alors qu'une femelle de souris à miel (*Tarsipes rostratus*) pèse environ 10 g et donne naissance à des petits d'environ 5 mg.

Les nouveau-nés ont une peau glabre comportant un épiderme parfois recouvert d'une membrane imperméable composée d'une couche de cellules pavimenteuses partiellement kératinisée qui permet d'éviter le dessèchement. Cette membrane, appelée périderme, est perdue environ 1 semaine après la naissance (Hill & Hill, 1955; Krause et al., 1978). Les yeux sont recouverts de peau et le pavillon de l'oreille est inexistant. Les narines sont ouvertes et grandes (Russell, 1982b). Selon le groupe, les commissures des lèvres sont plus ou moins fusionnées à la naissance, ce qui fait en sorte que la bouche ne peut pas s'ouvrir très grand ni se fermer, aspirant la tétine et la maintenant à l'intérieur. L'ouverture orale est entourée par un « bouclier

oral », une région aplatie du bout du museau comprenant le rhinarium (ou truffe) et les lèvres, qui permettrait un meilleur attachement à la tétine. L'attachement du nouveau-né à la tétine serait plus prononcé chez les espèces qui possèdent une poche rudimentaire ou pas de poche du tout (Hill & Hill, 1955; Hughes & Hall, 1988). En effet, le bouclier oral présente un développement différent selon les espèces. Chez l'opossum d'Amérique (Fig. 4a) et l'opossum gris à queue courte (Fig. 4b, c), qui sont du G2, le bouclier oral est peu proéminent et les portions supérieure et inférieure de la bouche peuvent être différenciées par des replis de peau peu visibles. De plus, le phalanger-renard (Fig. 4f) et le bandicoot brun du sud (Fig. 4g), aussi du G2, possèdent un bouclier oral simple, mais dont le repli de peau est plus visible, et les lèvres ne sont pas gonflées. Par comparaison, chez le chat marsupial du nord (G1), il est bien développé : les lèvres et le rhinarium forment un anneau plat autour de la bouche sans distinction notable entre les régions supérieures et inférieures de la bouche (Fig. 4d). Enfin, chez le koala (G3), le phalanger-renard et le bandicoot le bouclier oral est vestigial (**Fig. 4e-g**) (Hill et Hill, 1955; Lillegraven, 1974; Russell, 1982b; Hughes et al., 1989; Schneider, 2011).

La langue des marsupiaux nouveau-nés est bien développée et possède des muscles striés intrinsèques et extrinsèques montrant une forte innervation par le nerf hypoglosse. Lorsque l'extrémité de la tétine entre dans la bouche, elle se gonfle en un renflement bulbeux qui induit une légère dépression à la surface de la langue et du palais, ce qui réduit le risque de détachement du petit. La langue pourrait agir comme une pompe qui permettrait de faire s'écouler le lait dans la bouche. De plus, l'organisation de la partie supérieure du système respiratoire permet au petit de respirer et de boire simultanément (Hill & Hill, 1955; Merchant & Sharman, 1966; Russell, 1982b; Hughes & Hall, 1988).



Les MA possèdent un squelette cartilagineux. Chez les espèces du G1, les métacarpes sont à peine individualisés, tandis que chez celles du G3 les phalanges et les métacarpes sont bien formés et séparés par une capsule articulaire. De plus, chez les G2 et G3, l'ossification est commencée au niveau des phalanges distales. La musculature est bien développée chez les trois groupes. Les doigts sont différenciés, munis de griffes recourbées et pointues, et capables de s'étendre et de se fléchir. Ils peuvent agripper le substrat, comme le poil sur le ventre de la mère.

À l'opposé, les MP sont très peu différenciés chez toutes les espèces, ils ressemblent à des bourgeons embryonnaires peu ou pas mobiles; leur ossature et leur musculature sont d'ailleurs très peu développées. Les orteils ne sont pas visibles chez le G1, mais ils ont commencé à se séparer et à se différencier chez le G3. Les muscles paraxiaux sont suffisamment développés pour permettre les mouvements sinueux du corps effectués lors de la progression sur le ventre de la mère (Hill & Hill, 1955; Hughes & Hall, 1988; Barthélemy & Cabana, 2005).

1.4 Modèle de recherche

Tel que mentionné plus tôt, notre laboratoire utilise l'opossum *Monodelphis domestica* comme modèle d'étude du développement des systèmes sensorimoteurs. Cette espèce appartient à la famille des Didelphidés, qui comprend la majeure partie des marsupiaux américains. Son aire de distribution naturelle couvre une bonne partie du Brésil, de la Bolivie, du Paraguay et quelque peu de l'Argentine (Fadem et al., 1982; Kraus & Fadem, 1987; Harder et al., 1993; Macrini, 2004). C'est un animal nocturne et omnivore qui ressemble à un petit rat, avec un museau allongé, un pelage grisâtre et une queue relativement courte et semi-préhensile. L'opossum adulte mesure 10 à 15 cm de longueur, plus 6 à 8 cm pour la queue. En captivité, les femelles adultes pèsent en moyenne 60 à 100 g et les mâles 90 à 150 g. Les femelles ne possèdent pas de poche marsupiale ni de repli peaucier à ce niveau, leurs 13 tétines sont exposées. Elles ne présentent pas de cycle œstral : l'œstrus est déclenché par la présence persistante d'un mâle dans l'environnement. Ainsi, les femelles peuvent se reproduire tout au long de l'année, mais elles ont un maximum de 4 portées comportant de 2 à 13 bébés chacune. En fait, il peut y avoir

jusqu'à 15 petits à la naissance, mais un maximum de 13 peut survivre en raison du nombre de tétines (VandeBerg & Robinson, 1997). La période de gestation est de seulement 14 à 15 jours.

Vandeberg & Williams-Blangero (2010) ont décrit la parturition chez *Monodelphis domestica*, qui est une variation du premier mode décrit précédemment. La femelle devient plus active quelques minutes avant de mettre bas, puis s'allonge sur un flanc de manière à stabiliser le bassin tout en gardant les pieds dans les airs et se replie en rapprochant la tête de l'orifice urogénital et en soulevant ce dernier. Les petits sont ainsi expulsés près des tétines.

1.4.1 Opossum nouveau-né

Les nouveau-nés pèsent approximativement 100 mg et mesurent environ 1 cm du bout du museau à la base de la queue (Fig. 5) (Cassidy et al., 1994). Leur peau est glabre et rosée, presque transparente. Leur tête est volumineuse par rapport au reste du corps, correspondant au tiers de la longueur de l'animal. Le museau et la langue sont proéminents, la mâchoire inférieure comprend le cartilage de Meckel ainsi qu'un peu de tissu ossifié (futur os dentaire), mais les dents ne sont pas formées. Lorsque la tétine entre dans la bouche, il y a fusion entre l'épithélium des lèvres et celui de la tétine (Cabana, 2000). Cette fusion est primordiale pour que les petits ne tombent pas des tétines avant d'être suffisamment matures, chez cette espèce sans poche. Comme chez les autres marsupiaux, les paupières et les pavillons des oreilles ne sont pas visibles. Les MA possèdent un squelette cartilagineux et une musculature encore immature, mais qui a une apparence striée au microscope photonique (Barthélemy & Cabana, 2005), leur permettant d'effectuer des mouvements rythmiques alternant légère extension et flexion. De

plus, les doigts sont individualisés, quelque peu flexibles et leur extrémité est totalement cornée (Fig. 6), ce qui leur permet de s'accrocher à la fourrure du ventre de la mère. Les articulations de l'épaule, du coude et du poignet sont toutefois peu visibles extérieurement. Les MP présentent une grande immaturité, le squelette est cartilagineux et les fibres musculaires ne sont pas striées (Barthélemy & Cabana, 2005). Ils sont immobiles et ressemblent à des bourgeons embryonnaires; aucune articulation n'est visible. La queue est courte.

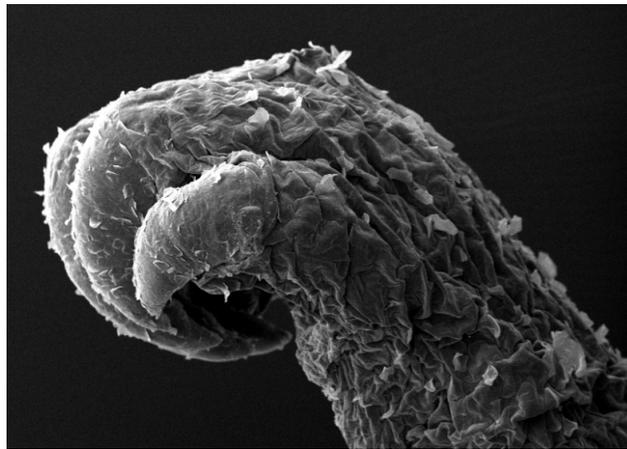


Figure 5 : Patte antérieure d'un opossum nouveau-né telle que vue en microscopie électronique à balayage.

Les doigts se terminent par des régions cornées en forme de griffes.
(Microphotographie : gracieuseté de Cynthia Brassard-Hébert)

Après leur expulsion de l'orifice urogénital, les nouveau-nés rampent sur le ventre de la mère en se servant de leurs pattes antérieures pour s'agripper sur la fourrure, trouvent une tétine et s'y attachent pour continuer leur développement postnatalement. Ils commencent à pouvoir se détacher de la mère à la fin de la 3^e semaine, mais dépendent de la mère jusqu'au moment du sevrage qui survient à 7 ou 8 semaines. La maturité sexuelle est atteinte à 5 mois chez les

femelles et 6 mois chez les mâles. La longévité moyenne est d'un peu plus de deux ans en captivité.

1.4.2 Système nerveux à la naissance

De manière générale, le système nerveux de l'opossum est grandement immature à la naissance et bien plus que celui d'embryons de rongeurs à des stades embryonnaires similaires (Smith, 2001, 2006). Sa formation se poursuit grandement postnatalement. Certains phénomènes importants dans les comportements moteurs, tels que la myélinisation, ont d'ailleurs lieu entièrement après la naissance (Leblond & Cabana, 1997; Lamoureux et al., 2005).

1.4.2.1 Moelle épinière

La moelle épinière de l'opossum nouveau-né a un diamètre de 500 μm . Le renflement cervical qui innerve les MA et le renflement lombaire qui innerve les MP sont peu distincts du reste de la moelle, une grande partie de l'innervation des membres se produisent postnatalement (voir ci-bas). En coupe histologique transversale, la moelle épinière a une apparence embryonnaire caractérisée par un grand canal épendymaire allongé dorsoventralement, lui-même entouré par trois régions concentriques : une zone ventriculaire peu épaisse qui borde le canal, une épaisse zone intermédiaire et une mince zone marginale. La zone intermédiaire, la matière grise présomptive, contient beaucoup de cellules de petite taille et peu différenciées, et les motoneurones présomptifs se reconnaissent à leur plus gros diamètre et leur localisation ventrale et ventrolatérale. La zone marginale est la matière blanche présomptive, quoique

complètement dépourvue de myéline pour le moment, et est mieux démarquée dans la moitié ventrale de la moelle que dans la moitié dorsale. Les funicules dorsaux sont quasiment inexistantes.

Les motoneurones sont des neurones spécialisés qui innervent les membres par le relâchement du neurotransmetteur acétylcholine. Dès la naissance, il y a de l'expression cholinergique dans des motoneurones de la moelle épinière de l'opossum selon des gradients décroissants rostrocaudal et latéromédial (Barthélemy & Cabana, 2005). Le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine est présent dans les MA, son expression diminuant proximodistalement, et il augmente significativement durant plusieurs semaines postnatalement, en lien avec l'apparition et la maturation des comportements moteurs déjà mentionnés; les MP sont en retard de quelque jours à 1 semaine sur les MA (Barthélemy & Cabana, 2005). Des études immunohistochimiques de trois protéines synaptiques (synaptophysine, synaptotagmine-I et SNAP-25) ont révélé que la synaptogénèse se produit en grande partie postnatalement dans la moelle épinière et selon trois gradients : rostrocaudal, ventrodorsal et latéromédial (Gingras & Cabana, 1999). À la naissance, le marquage de ces trois protéines dans la matière grise présomptive se situe à la périphérie ventrolatérale de la corne ventrale, où se retrouvent les motoneurones, et dans la zone marginale adjacente. Selon ce qu'on connaît de la localisation des voies nerveuses chez l'opossum adulte et de leur croissance postnatale, on a pu déterminer que les premières synapses seraient d'axones propriospinaux. La présence transitoire d'un marqueur des synapses électrotoniques (GAP-43) a été démontrée au niveau des motoneurones de l'opossum nouveau-né, ce marqueur est exprimé de manière maximale à la naissance et diminue postnatalement au point de ne plus être détectable (Lemieux et al., 2010).

La locomotion demande une coordination de l'activité des motoneurones afin de permettre le fonctionnement adéquat des membres lors du cycle locomoteur. Chez les mammifères, le premier niveau de coordination s'effectue au niveau de la moelle épinière grâce à des réseaux d'interneurones appelés « générateurs centraux de rythme » (ou « central pattern generators », CPG), situés dans les renflements spinaux (Grillner, 1975; Kiehn, 2006). Les CPG n'ont pas encore été étudiés chez l'opossum. Cependant, la capacité des nouveau-nés à engendrer les mouvements rythmiques et alternés des MA en quasi absence des voies supraspinales bien développées suggère que les CPG sont en place, au moins sous une forme immature, dès la naissance ainsi que les connexions entre les côtés gauche et droit (Pflieger et al., 1996; Amalric et al., 2012). La coordination entre les ceintures, qui apparaît très tard chez l'opossum comme on a vu, est possible grâce aux longues voies propriospinales, dont le développement postnatal a été étudié par Cassidy & Cabana, (1993). Pour fonctionner adéquatement, les réseaux moteurs spéciaux doivent recevoir de l'information sur la périphérie, tel que l'état d'étirement des muscles, le substrat de locomotion (glissant ou rugueux, plat ou en pente ascendante ou descendante, présence d'obstacles). La locomotion doit être adaptée à l'environnement. Finalement, les fonctions motrices et sensorielles de la moelle épinière doivent être coordonnées avec celles du cerveau pour un contrôle optimal des actes moteurs. Nous en traitons dans les sections suivantes.

1.4.2.2 Voies encéphalospinales et spinoencéphaliques

Des voies descendantes de l'encéphale exercent un contrôle sur la moelle épinière chez les mammifères adultes.

Avec la moelle épinière rostrale, le bulbe rachidien du tronc cérébral est probablement la région la moins immature du système nerveux central chez l'opossum nouveau-né. En coupes histologiques colorées au Nissl on peut distinguer à ce niveau les principaux noyaux moteurs des nerfs crâniens ainsi que certains des noyaux sensoriels (du trijumeau et vestibulaires, principalement). Les olives inférieures et la formation réticulée montrent aussi une certaine agrégation nucléaire. Les noyaux pontiques et le locus coeruleus ne sont pas bien distincts. Le cervelet est encore moins développé, on ne voit en fait que les lèvres rhombiques embryonnaires. Au niveau mésencéphalique, on distingue le faisceau longitudinal médial et la substance noire ainsi que certains groupes réticulaires dans le tegmentum. Le noyau rouge ne peut pas être identifié clairement et le tectum n'est pas bien différencié histologiquement (Wang et al., 1992; observations personnelles).

Le cortex cérébral est particulièrement immature à la naissance, ne comprenant que deux couches, ce qui se compare au rat embryonnaire de 13 à 15 jours (Saunders et al., 1989; Nicholls et al., 1990). La majeure partie du développement du néocortex s'effectue postnatalement (Puzzolo & Mallamaci, 2010). Par exemple, la plaque corticale embryonnaire, à l'origine de la majeure partie des neurones corticaux, n'apparaît que quelques jours après la naissance chez l'opossum *Monodelphis*. Plus précisément, la plaque corticale est visible dans la partie dorsolatérale du télencéphale à partir de P3 (Sharman, 1973). L'état d'immaturité du cortex cérébral rend extrêmement improbable son implication dans les comportements moteurs précoces.

Plusieurs études utilisant des techniques de traçage axonal ont mis en évidence des fibres provenant des régions de l'encéphale qui croissent dans la moelle épinière à la naissance (Wang et al., 1992; Pflieger & Cabana, 1996; Cabana, 2000; Adadja et al., 2013). Wang et al. (1992) ont étudié l'origine des fibres d'origine supraspinale présentes aux niveaux cervical et lombaire de la moelle épinière à différents âges postnataux à l'aide du traceur neuroanatomique rétrograde Fast Blue (FB). Suite à l'injection de FB dans la moelle au niveau lombaire d'un nouveau-né, ils ont retrouvé des neurones marqués dans divers noyaux de la formation réticulée myélocéphalique et pontique (rétroambigu, médullaires ventral et dorsal, gigantocellulaire, paragigantocellulaire latéral, pontique), le noyau vestibulaire latéral, et le locus coeruleus présomptif (distingué par la présence du traceur). Des neurones marqués se retrouvent dans des régions caudales des noyaux du raphé (*obscurus* et *pallidus*) ainsi que dans le noyau interstitiel du faisceau longitudinal médian mésencéphalique. Plus rarement, quelques neurones ont été marqués dans l'hypothalamus. Les injections de FB au niveau cervical de la moelle épinière ont résulté en marquage plus abondant dans ces régions et dans le noyau réticulaire gigantocellulaire ventral et le noyau spinal du trijumeau. Des injections similaires à P3 entraînent du marquage dans des noyaux supplémentaires : le noyau rouge, les noyaux vestibulaires médial et inférieur, le noyau mésencéphalique du trijumeau, et le noyau Edinger-Westphal présomptif (Wang et al., 1992). Le nombre de neurones marqués dans toutes ces régions augmente ensuite avec l'âge. Les axones du cortex cérébral ne se projettent qu'au premier segment cervical de la moelle épinière vers P22 où ils ne pénètrent pas dans la matière grise, ceci même chez l'adulte (Cabana et al., 1992). Ainsi, le cortex ne peut exercer qu'un contrôle indirect sur la moelle épinière, via des projections aux régions sous-corticales.

Les afférences sensorielles de la périphérie envoyées à la moelle épinière ou directement à l'encéphale apportent aux centres moteurs de l'encéphale la rétroaction nécessaire pour que ces derniers modulent adéquatement les centres spinaux responsables de la locomotion. Or, les afférences primaires dans la moelle épinière, les voies spinoencéphaliques, sont peu développées chez l'opossum nouveau-né, tel que l'ont démontré les études de Qin et al. (1993), de Desrosiers, (1994) et de Knott et al. (1999). Les études de traçage neuronales de Desrosiers, (1994) ont montré que le développement des fibres ascendantes provenant des segments lombaires de la moelle épinière s'effectue postnatalement et selon un gradient caudorostral.

1.4.2.3 Systèmes sensorielles céphaliques spéciaux

Malgré la posture facilitante qu'adopte la mère à la parturition, le nouveau-né marsupial ne semble pas être aidé ou guidé par elle pour atteindre la poche (chez les espèces marsupiales qui en possèdent) et la tétine et pour s'accrocher à celle-ci. L'opossum ne fait pas exception. Les informations somesthésiques véhiculées par les systèmes spinaux-encéphaliques ne peuvent expliquer à eux seuls le guidage de l'opossum nouveau-né vers la tétine et déclencher son attachement à celle-ci (Gemmell et al., 1988). Pour cela, des sens céphaliques sont fort probablement impliqués. Parmi les modalités sensorielles qui ont été envisagées chez les marsupiaux en général, on retrouve les quatre sens spéciaux: auditif, visuel, vestibulaire, olfactif, et le sens général de la somesthésie faciale (Gemmell et al., 2002; Nelson & Gemmell, 2004; Adadja et al., 2013).

Chez l'opossum, l'audition et la vision peuvent être éliminées en raison de leur très grande immaturité à la naissance. En effet, des potentiels évoqués auditifs ne peuvent être enregistrés dans le tronc cérébral qu'à partir de 24 jours après la naissance (Aitkin et al., 1997) et les méats auditifs ne s'ouvrent que vers 30 jours (Sánchez-Villagra et al., 2002). Les yeux sont fermés et recouverts d'une mince couche de peau à la naissance, les premières fibres rétinofoves n'atteignent le chiasma optique que vers P3 (Taylor & Guillery, 1994) et des réflexes visuels ne peuvent être induits qu'à partir de la 5^e semaine postnatale (Cassidy et al., 1994).

Quant au système olfactif des études anatomiques et immunohistochimiques suggèrent que les bulbes olfactifs ainsi que certaines portions de l'épithélium olfactif sont moins immatures à la naissance (Tarozzo et al., 1995). Toutefois, il n'existe aucune évidence de l'existence de projections des voies olfactives vers des régions centrales contrôlant la motricité (Nelson & Gemmell 2004) et Adadja et al. (2013) ont montré que la stimulation des bulbes olfactifs à des seuils physiologiques n'induisaient pas de mouvements des MA dans des préparations *in vitro* de névraxe avec les membres attachés, contrairement à la stimulation d'autres régions, comme on le verra sous peu.

En ce qui concerne le système vestibulaire, l'utricule, le saccule et les canaux semi-circulaires sont formés à la naissance et l'utricule a une apparence moins immature chez le nouveau-né *Monodelphis domestica* (Pflieger & Cabana, 1996). En effet, les macules utriculaires présentent des otolithes et reçoivent des afférences sensorielles qui se distribuent centralement dans le complexe vestibulaire, qui lui-même est à l'origine de projections à la moelle cervicale. En outre, la stimulation électrique du complexe vestibulaire induit des

réponses motrices à des intensités relativement faibles sur des préparations *in vitro* d'opossums nouveau-nés (Adadja et al., 2013). Il est donc possible que le système vestibulaire soit impliqué dans le guidage vers la tétine, puisqu'il fournit des informations sur les changements de position de la tête ainsi que sur sa position par rapport à la gravité (Pflieger et al., 1996; Nelson & Gemmell, 2004). Toutefois, des études actuellement en cours au laboratoire, qui utilisent l'immunohistochimie pour révéler la présence d'un marqueur de l'activité neuronale (c-Fos) suite à des perturbations vestibulaires ne montre son expression qu'à partir de la 3^e semaine postnatale dans les noyaux du complexe vestibulaire, ce qui suggère une maturation tardive (Lanthier et al., 2014) et jette un doute sur la fonctionnalité de ce système chez l'opossum nouveau-né. Cela dit, et même si le système vestibulaire était impliqué dans le guidage du nouveau-né, il semble raisonnable de croire que ce sens ne suffit pas à percevoir la tétine et à s'y attacher. Seule la somesthésie véhiculée par le système du trijumeau le permettrait.

1.4.2.4 Somesthésie faciale et système du trijumeau

Une étude en microscopie électronique a révélé la présence de fibres nerveuses ainsi que de cellules de Merkel, un mécanorécepteur épidermique (voir sous-section *Cellule de Merkel*), dans la peau du visage de l'opossum nouveau-né (Jones & Munger, 1985). Aussi, la stimulation répétée du museau du nouveau-né intact engendre des mouvements rythmique et alternée des MA (observation personnelle). Plus récemment, Adadja et al., (2013) ont démontré que, de tous les systèmes sensoriels céphaliques investigués dans leurs préparations *in vitro* d'opossums nouveau-nés, c'est le ganglion du trijumeau qui requérait l'intensité de stimulation la plus faible pour évoquer des extensions des MA comparables à celles observées chez l'animal intact. De

plus, en utilisant l'immunohistochimie contre le Neurofilament-200, un marqueur des fibres nerveuses qui ont atteint un niveau de maturité presque complet, et du traçage neuronal, ils ont démontré que de nombreuses fibres issues du ganglion du trijumeau sont présentes dans la peau faciale du nouveau-né.

On sait que le système du trijumeau est très important pour la perception des informations sensorielles de la tête, particulièrement les sensations extéroceptives au niveau du museau. Chez les vertébrés, le nerf trijumeau (nerf V) est le plus volumineux des nerfs crâniens. Il est composé d'afférences permettant principalement de percevoir les sensations du toucher, de la pression, de la douleur et de la température de la face et d'une partie des cavités orale et nasale. Il comporte en plus une portion motrice responsable de l'innervation des muscles masticateurs. Ce nerf est composé de trois branches, qui émergent du ganglion trijumeau ou ganglion de Gasser : ophtalmique (V1), maxillaire (V2) et mandibulaire (V3). La branche ophtalmique, sensorielle, traverse la fissure orbitaire supérieure puis innerve la cornée, la paupière supérieure, le nez, les muqueuses nasales, la partie antérieure de la tête, le front et une partie des méninges. La branche maxillaire relaie les influx sensitifs des joues, de la mâchoire supérieure, de la paupière inférieure, des dents et des lèvres supérieures. La branche mandibulaire transporte les informations sensorielles du menton, de la mâchoire inférieure, des gencives, des dents, de la langue et des lèvres supérieures. De plus, la division mandibulaire fournit l'innervation motrice des muscles masticateurs (Langlois-Wils & Lepresle, 1998; Kandel et al., 2012). Au niveau central, le système du trijumeau comprend trois noyaux sensoriels - le trijumeau spinal, le trijumeau principal et le trijumeau mésencéphalique - et un noyau moteur, soit le noyau moteur du trijumeau.

Les informations sensorielles relayées par le système du trijumeau influencent de nombreux comportements, notamment la mastication et des comportements d'exploration de l'environnement (Ishii et al., 2006). Ce système joue aussi un rôle dans des comportements moteurs contrôlés par la moelle épinière. Par exemple, plusieurs études chez le chat adulte décérébré placé sur un tapis roulant montrent que la stimulation mécanique ou électrique du nerf du trijumeau ou de ses champs récepteurs peut activer la locomotion (Aoki & Mori, 1981; Noga et al., 1988, 1991; Beresovskii & Bayev, 1991). Les voies d'activation de la locomotion passeraient par des structures intermédiaires telles que la région locomotrice ponto-médullaire ou encore le noyau spinal du trijumeau. Des études anatomiques chez le rat adulte ont montré des connexions directes entre les afférences primaires du trijumeau et la moelle cervicale ayant essentiellement pour origine la branche mandibulaire du nerf V, mais aussi la branche ophtalmique dans une moindre mesure (Diagne et al., 2006).

Une étude électrophysiologique sur des préparations *in vitro* de rats nouveau-nés a démontré l'existence d'une voie polysynaptique fonctionnelle entre les afférences trigéminales et le niveau lombaire de la moelle épinière. En effet, la stimulation électrique du nerf V entraîne des potentiels post-synaptiques dans les neurones spinaux ainsi que des bouffées de potentiels d'action dans les racines ventrales (Vinay et al., 1995). Chez le wallaby nouveau-né, une étude utilisant le traceur DiI a mis en évidence que, dès le jour de la naissance, de nombreux neurones ganglionnaires trijumeaux ont des prolongements périphériques bien développés qui innervent les follicules pileux présomptifs et la peau qui les entoure au niveau de la face, et des prolongements centraux qui pénètrent dans le tronc cérébral au niveau pontique et forment le faisceau trijumeau spinal qui s'étend environ du niveau du noyau principal, rostralement,

jusqu'au niveau cervical de la moelle, caudalement (Waite et al., 1994). Chez l'opossum *Monodelphis domestica*, le système du trijumeau a été étudié par Adadja et al., (2013) déjà mentionnée à quelques reprises ci-haut.

La peau, composée de ses deux couches, l'épiderme et le derme, constitue une barrière physique de protection et joue un rôle dans la perception des stimuli externes. Ainsi, il y a plusieurs récepteurs sensoriels présents dans la peau, incluant les mécanorécepteurs qui sont sensibles au toucher fin, les nocicepteurs qui répondent à la douleur, les thermorécepteurs qui perçoivent les changements de température et les récepteurs polymodaux qui sont sensibles à la douleur et à la chaleur (Lucarz & Brand, 2007). Les mécanorécepteurs étant les plus susceptibles d'être impliqués dans le contrôle de la locomotion du nouveau-né ou de sa perception de la tétine, je ne m'attarderai donc que sur la description de ces derniers, basée sur Tsunozaki & Bautista (2009) et Kandel et al., (2012). Les cellules (ou disques) de Merkel (**Fig. 4A**) sont des cellules généralement épidermiques au niveau des papilles dermiques ou des follicules pileux qui perçoivent la pression superficielle et sont innervées par des afférences trigéminales de type terminaisons nues à adaptation lente de type 1. Les corpuscules de Meissner (**Fig. 4B**) sont les terminaisons mêmes, encapsulées et situées dans le derme à la limite de l'épiderme, qui détectent la pression légère; elles sont à adaptation rapide de type 1. Les corpuscules de Pacini (**Fig. 4C**), des terminaisons encapsulées de grand diamètre situées profondément dans le derme, perçoivent les pressions fortes et la vibration et sont à adaptation rapide de type 2. Les corpuscules de Ruffini (**Fig. 4D**), toujours des terminaisons encapsulées situées dans le derme, perçoivent l'étirement des tissus et sont à adaptation lente de type 2.

Si la peau de la face de l'opossum nouveau-né contient de nombreuses fibres nerveuses, elle ne contient pas encore de terminaisons encapsulées de Meissner ou de Vater-Pacini (observation personnelle). Une étude en microscopie électronique a toutefois démontré la présence de cellules de Merkel, dont plusieurs semblent immatures et ne pas être innervées mais d'autres semblent assez matures pour être fonctionnelles (Jones & Munger, 1985). Ceci a conduit les auteurs à suggérer qu'elles pourraient servir au nouveau-né à localiser une tétine.

Cellules de Merkel

Les cellules de Merkel ont été découvertes en 1875 par Friedrich S. Merkel, qui les nomma « Tastzellen » ou « cellules du toucher », présumant leur fonction tactile dans la peau (Polakovicova et al., 2011). Elles peuvent être dispersées dans l'épiderme, particulièrement dans la peau glabre, et parfois regroupées en structures nommées « touch domes » qui établissent des contacts étroits avec des terminaisons nues de fibres nerveuses sensorielles myélinisées (Lucarz & Brand, 2007). Elles sont aussi retrouvées dans certaines muqueuses. Les cellules de Merkel sont reconnaissables à leur forme ovale, mesurant 15 μm sur l'axe de la longueur, et par leur noyau plurilobé. De plus, leur cytoplasme renferme des mélanosomes et de nombreux granules à cœur dense contenant des neuropeptides et des filaments intermédiaires particulièrement denses autour du noyau. Leur membrane cellulaire montre des villosités de différentes longueurs et des desmosomes très courts permettant l'adhésion aux kératinocytes (Tachibana & Nawa, 2002; Boulais & Misery, 2007).

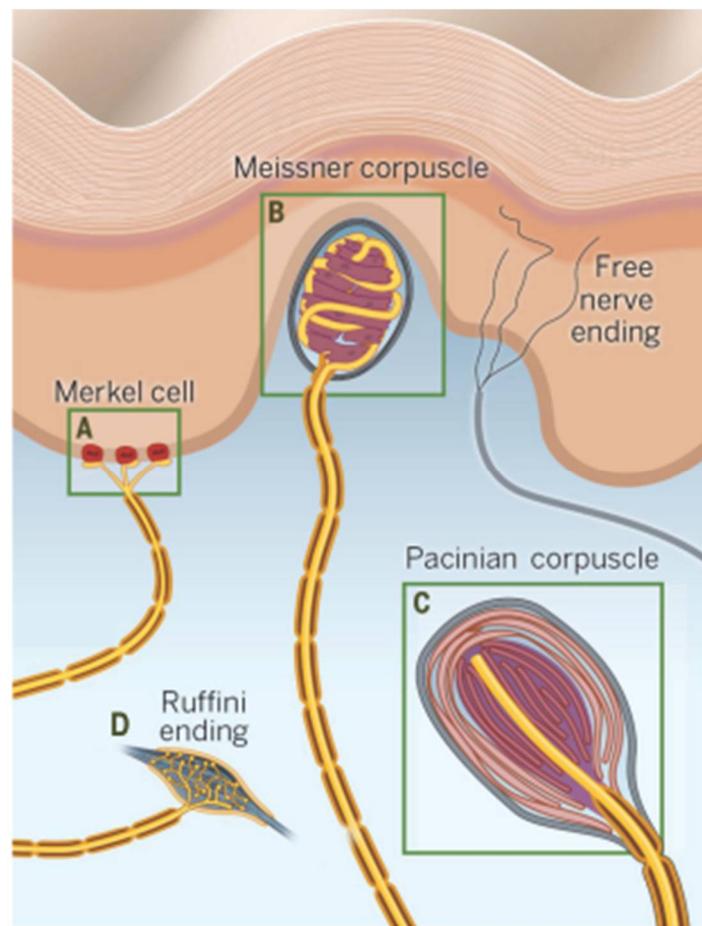


Figure 6 : Différents mécanorécepteurs de la peau. A) Cellules de Merkel, B) Corpuscule de Meissner, C) Corpuscule de Pacini, D) Corpuscule de Ruffini.
Tiré de : Zimmerman et al., 2014.

Les cellules de Merkel peuvent être identifiées en microscopie photonique grâce à leurs granules neurosécrétoires caractéristiques, du moins dans la peau adulte. Elles peuvent aussi être mises en évidence par immunomarquage des filaments intermédiaires, souvent il s'agit de la cytokératine 20 (CK20) (Tanaka & Narisawa, 2000). Il est important de noter que les cellules de Merkel acquièrent leur affinité immunohistochimique avec les anticorps anti-CK20 lors de la maturation, ce qui signifie que ces anticorps sont peu utiles pour identifier les cellules

immatures (Tachibana et al., 2000). Plus récemment, les cellules de Merkel ont aussi été démontrées en utilisant la FM1-43 et l'AM1-43, des styril pyrimidines pouvant servir de colorants cellulaires fluorescents (Meyers et al., 2003; Marasco et al., 2006). La FM1-43 est utilisée dans les études portant sur l'endocytose chez des cellules vivantes mais ne résiste pas à la fixation des tissus, contrairement à son analogue, l'AM1-43. Ces substances ne marquent pas spécifiquement les cellules de Merkel, mais toute une gamme de cellules, surtout associées à des fonctions sensorielles (neurones ganglionnaires, fuseaux neuromusculaires, cellules ciliées de l'oreille), ainsi que quelques autres types cellulaires (e.g. neurones entériques, cellules rénales). Toutefois, la localisation épidermique des cellules de Merkel, si marquées par la FM1-43, les rend aisément identifiables. Les deux colorants possèdent une queue lipophile et portent, en tête, un groupe cationique fortement hydrophile. Ainsi, lors de leur injection dans l'espace extracellulaire, l'un ou l'autre s'insère dans le feuillet externe de la membrane plasmique, mais ne peut pas passer à travers elle, en raison de la tête chargée, puis la portion de membrane marquée est endocytosée (Nishikawa, 2011). La FM1-43 et l'AM1-43 ne sont pas fluorescentes en solution aqueuse mais le deviennent lorsque leur queue lipophile s'insère dans la membrane. Ces colorants peuvent aussi entrer dans les cellules en passant à travers des canaux cationiques non sélectifs. Une étude sur des préparations *in vitro* de cochlée a montré que l'application d'agonistes des récepteurs vanilloïdes de type 1 (« Transient Receptor Potential Vanilloïde 1 », TRPV1) ou des récepteurs purinergiques de type 2 (P2X₂) augmentait la pénétration de la FM1-43 dans les cellules (Meyers et al., 2003). À l'inverse, l'application d'antagonistes des récepteurs P2 en bloque l'entrée sur le même type de préparation (Crumling et al., 2009).

1.5 Problématique

Tel que dit précédemment, l'opossum nouveau-né effectue des mouvements des MA leur permettant d'atteindre une tétine sans aide de la mère. Des informations sensorielles sont présumément nécessaires pour le guider et la somesthésie faciale véhiculée par le système trijumeau semble la meilleure candidate, ce que nous voulons vérifier.

Mon projet vise à tester l'efficacité des stimulations tactiles de la face à induire des réponses motrices des MA. Il s'agit en premier lieu de démontrer que de telles stimulations induisent des réponses musculaires au niveau des MA de manière reproductible et d'analyser ces réponses, puis d'évaluer la possibilité que les cellules de Merkel sont impliquées dans ces réponses motrices des MA à des stimuli mécaniques.

Des expériences employant des techniques électrophysiologiques et pharmacologiques ont été jumelées au marquage à l'AM1-43 pour identifier la présence des cellules de Merkel dans la peau faciale. Ces expériences anatomiques ont été conduites avec l'aide de France Beauregard lors d'un stage d'été.

L'ensemble des résultats de ces expériences, qui seront exposés plus loin, permet d'affirmer que la sensibilité tactile du système du trijumeau influence la motricité chez l'opossum nouveau-né et ceci très probablement par les cellules de Merkel.

2. MATÉRIELS & MÉTHODES

Les opossums *Monodelphis domestica* ont été obtenus à partir d'un élevage maintenu à l'animalerie du Département des sciences biologiques de l'Université de Montréal dans les conditions favorables pour cet animal (Fadem, 1982; Kraus & Fadem, 1987; Harder et al., 1993; VandeBerg & Robinson, 1997). De plus, toutes les méthodes présentées respectent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et les protocoles ont été approuvés par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal.

Les opossums adultes ont été maintenus dans des cages individuelles car ils peuvent être assez agressifs les uns envers les autres. Comme l'œstrus chez la femelle est déclenché par la présence du mâle, les animaux des deux sexes ont été maintenus dans des pièces séparées sauf en vue des accouplements. Dans ce cas, une femelle et un mâle sont placés dans une grande cage pourvue d'un séparateur perforé, chacun dans son compartiment respectif, pour qu'ils s'habituent l'un à l'autre, ce qui diminue le risque d'agression. Au bout de 5 jours, le séparateur est retiré puis le mâle et la femelle sont laissés en contact durant les 5 jours suivants, puis séparés après 9 jours. La présence d'une portée chez la femelle est vérifiée quotidiennement durant 6 jours.

2.1 Préparation des animaux

Un total de 37 opossums âgés entre P0 (jour de la naissance) et P4 ont été utilisés pour les expériences de stimulation par pression. Même si l'objectif est de déterminer si la

somesthésie faciale est impliquée dans le guidage du nouveau-né, des opossums plus âgés que P0 ont été utilisés pour s'assurer d'un nombre suffisant d'animaux puisqu'une ou parfois deux expériences seulement sont faisables en une journée. La différence peu significative entre les quelques premiers jours postnataux en ce qui concerne le développement neural permet de regrouper ces âges (voir Lavallée & Pflieger, 2009). Chaque animal a été prélevé sur la mère puis anesthésié profondément par hypothermie pour une durée 3 à 5 minutes à une température de -20 °C. Quand l'animal ne présentait plus de réflexes, il a été disséqué rapidement dans une boîte de pétri au fond recouvert de Sylgard et remplie d'une solution physiologique servant à maintenir les tissus fonctionnels (125 mM NaCl; 3 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 1 mM NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂ et 15 mM dextrose, équilibré par un mélange gazeux O₂ à 95% et de CO₂ à 5%, et titrée pour s'assurer d'un pH 7.40 ± 0.04). Chaque animal a été disséqué à l'aide de microciseaux sous une loupe à dissection (Olympus SZ61): la mâchoire inférieure, la langue et les viscères ont été enlevés, en prenant garde de ne pas toucher les MA. Ensuite, la peau au-dessus du crâne et de la colonne vertébrale a été retirée afin de permettre une craniotomie et une laminectomie dans le but d'exposer le système nerveux central. La dissection a été terminée par une hémisphérectomie complète au niveau du diencéphale. La préparation ainsi obtenue, le système nerveux laissé dans la carcasse avec les MA attachés, a été fixée au fond d'un bain, face dorsale vers le haut, et perfusée en continu avec de la solution physiologique oxygénée. Avant les manipulations, le spécimen a été laissé un minimum de 2 heures sans perturbation pour stabiliser la préparation du spécimen disséqué. Toutes les manipulations ont été effectuées à la température de la pièce entre 21-24 °C.

À la suite de cette période de repos, les pattes de l'animal ont été stabilisées avec des minuties dans le fond du pétri pour les enregistrements électromyographiques (EMG). Sous une loupe à dissection, une électrode constituée d'un fil d'argent d'un diamètre de 76.2 μm recouvert d'une gaine isolante en teflon (diamètre total : 139.7 μm ; A-M Systems, Inc.) a été insérée dans le triceps de chaque MA (Fig. 1 de l'article). Le triceps est le muscle extenseur de l'avant-bras impliqué dans les mouvements locomoteurs exécutés par l'animal intact. Bien qu'il soit comparativement plus gros que d'autres muscles du membre, son immaturité et son faible diamètre aux âges étudiés font en sorte qu'il est possible que l'activité d'autres muscles ait été enregistrée chez certains spécimens, mais ceci n'invalide pas les résultats puisque c'est une mesure de l'activité du MA. Enfin, à son niveau d'insertion chaque électrode a été recouverte de petits morceaux de bande de teflon (Belanger) pour l'isoler le plus possible du liquide. Les électrodes ont été connectées à un module d'entrée à haute impédance (HZP, Grass Technologies), lui-même connecté à un système d'amplification (Grass CP511 AC Amplifier, Grass Technologies). Les pressions ont été appliquées sur la peau de la face (voir plus bas) et les signaux ont été amplifiés (10000x) et filtrés (bande passante : 3 Hz - 3 kHz) avant d'être digitalisés (Digidata 1322A, Axon instruments) puis enregistrés sur ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition (Clampex 9.2; Axon Instruments). Après l'implantation des électrodes, la boîte de pétri contenant les spécimens a été placée sous un microscope (Olympus BX61 WIF) et la solution physiologique a été continuellement renouvelée grâce à une pompe péristaltique (Waston-Marlow 120S/DM3).

2.2 Stimulations faciales

Pour réaliser les stimulations sur le museau, un transducteur de force consistant en une pointe de plastique d'environ 1 mm de diamètre à la pointe couplé à une jauge de contrainte a été utilisé (Fig. 1A de l'article). Le principe de ce transducteur est qu'un déplacement donné de la pointe induit une force sur la jauge, qui résulte en une déviation reproductible du signal électrique. Le signal de la pression est amplifié (FT-03, Grass) et digitalisé avant d'être enregistré. La déviation du signal correspond à une pression exprimée en gramme par l'appareil qui a été, préalablement aux expériences, calibré en suspendant des poids de masse connue sur la pointe de l'appareil. Cet appareil est un prêt du professeur Réjean Dubuc (pour des détails voir Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

Au début de l'expérience, le transducteur a été approché de la tête de l'animal grâce à un micromanipulateur, le tout sous contrôle visuel facilité par microscope (Olympus BX61 WIF). Une fois en place, la pointe a été mise en contact avec un côté de la face de l'animal, afin d'induire des pressions calibrées sur la peau. Ces pressions ont été appliquées à une fréquence de 1 ou 2 min pendant 300 à 5000 msec et à une intensité de 1 à 9 g.

2.3 Expériences pharmacologiques

Pour tester l'implication possible des cellules de Merkel dans les réponses des MA observées, 40 μ m de YM298198 (6-amino-N-cyclohexyl-N,3-dimethylthiazolo[3,2- α]benzimidazole-2-carboxamide hydrochloride, axon MEDCHEM), un antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate de type 1, a été dissous dans la solution physiologique

avant d'être perfusé dans le pétri durant 20 à 40 min. Ce composé bloque les réponses induites par des stimulations mécaniques dans des fibres à adaptation lente de type I (SAI), ces fibres étant celles associées avec les cellules de Merkel, sur des préparations de follicules pileux de rat à une concentration d'au moins 10 μ M (Cahusac & Mavulati, 2009). Dans des préparations différentes, on a testé l'implication des récepteurs purinergiques (P2), souvent associés avec des terminaisons sensorielles du système nerveux central (revue dans Burnstock, 2013), dans le déclenchement des réponses musculaires des MA induit par la stimulation mécanique de la face. Suivant la démonstration qu'un antagoniste des P2, le PPADS (acide pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic; 200 μ M; Sigma-Aldrich), bloque l'entrée de l'AM1-43 dans les cellules ciliées de la cochlée *in vitro* (Meyers et al., 2003; Crumling et al., 2009), ce composé a été dissous à une concentration de 200 μ m dans la solution physiologique et appliqué pendant 30 à 40 min dans le bain. Les réponses aux stimulations effectuées avant l'application du composé ont servi de contrôle. La récupération des réponses a aussi été vérifiée après le rinçage avec la solution physiologique seule.

2.4 Analyse des données

Les résultats électromyographiques obtenus ont été analysés avec le logiciel Clampfit 9.2 (Axon Instruments, Molecular Device). Les tracés bruts ont d'abord été rectifiés et réduits de 0.1 KHz pour faciliter l'analyse (Fig. 1B de l'article). Par la suite, la valeur de base moyenne est utilisée pour réajuster le signal à 0 V. Ensuite, à partir de la fonction statistique du programme, l'aire sous la courbe des réponses est mesurée à partir du début de la stimulation, soit lorsque la déflexion du signal est supérieure aux valeurs de base, jusqu'au retour aux valeurs de repos (Fig. 1B de l'article). Ensuite, l'aire est normalisée pour permettre de faire des

comparaisons de l'activité des EMG des deux MA d'un même spécimen et entre les différents spécimens. Pour la normalisation, les mesures obtenues sur un spécimen ont été exportées dans Excel (Microsoft Office 2013) et la valeur maximale (définie comme 100%) pour chaque membre a été utilisée comme valeur de référence pour la normalisation des données du membre. Les réponses aux 4 ou 5 premières stimulations n'ont pas été incluses dans la normalisation car elles étaient anormalement élevées par rapport au reste de l'expérience, suggérant une hyperexcitabilité initiale. L'amplitude maximale du signal de la gauge est considérée comme la mesure de la force maximale appliquée sur la peau du museau. La latence est mesurée entre le début de la déflexion du signal de la gauge et le début de la réponse. Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel Prism 5 (Graphpad, USA). Les résultats présentés dans le texte et dans les figures sont sous la forme de moyenne \pm SEM.

3. Article scientifique produit au cours de ce travail

Marie-Josée Desmarais, France Beauregard, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger.

Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*.

Article en préparation.

Contributions des auteurs de l'article.

MJD a réalisé les expériences de stimulation, analysé les résultats, écrit le premier jet de l'article et revu celui-ci. FB a réalisé les analyses du marquage suite aux injections d'AM1-43. TC a participé à la rédaction de l'article en plus de soutenir financièrement ce projet (CRSNG #3595).

JFP a conçu l'ensemble du projet, réalisé les injections d'AM1-43, participé à la rédaction de l'article et financé ces recherches (CRSNG #312015).

Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums,
Monodelphis domestica

Authors : Marie-Josée Desmarais, France Beauregard, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger

Affiliations : Département de sciences biologiques, Université de Montréal,

C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, QC, Canada, H3C 317

Corresponding author:

Jean-François Pflieger

Département de sciences biologiques, Université de Montréal,

C.P. 6128,

Succ. Centre-ville,

Montréal, QC, Canada, H3C 317

Acknowledgments : Ha-Loan Phan, Thierry Adadja, Janie Mayeux, Réjean Dubuc, Jean-François Bouchard, Bruno Cécyr, Michel Anctil

Abstract

The opossum, *Monodelphis domestica*, is born very immature but crawls, unaided, with its forelimbs (FL) from the mother's birth canal to a nipple where it attaches to pursue its development. What sensory cues guide the newborn to the nipple and trigger its attachment to it? Previous experiments showed that low intensity electrical stimulation of the trigeminal ganglion induce FL motor responses in *in vitro* preparations. Combined with the observation of trigeminal fibers in the facial skin in the newborn, these suggest that touch conveyed by the trigeminal system may influence FL movements. To determine the distribution of sensory cells such as Merkel cells (MC) in the snout skin of newborn opossums, the fluorescent styryl pyridinium dye AM1-43 was used. It revealed a large number of cells in the facial epidermis, especially around the snout. Moreover, pressure applied to the snout in *in vitro* preparations induced bilateral and simultaneous FL responses proportional to the stimulation intensity, as recorded using electromyography (EMG). Removing the facial skin nearly abolished these responses. Finally we have tested the effects on these responses of pharmacological agents associated with MC transmission. The results obtained support a strong influence of facial mechanoreception on FL motor movement in newborn opossums, and that this influence could be exerted via MC.

Keywords: Locomotion, Merkel cells, Motor behavior, Opossum, Trigeminal system

Introduction

Like other marsupials, the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) is born in a very immature state but must travel, unaided by the mother, from the urogenital opening to a nipple where it attaches to pursue its maturation (Fadem et al., 1982; VandeBerg & Robinson, 1997). The newborn opossum crawls with rhythmic and alternating movements of the forelimbs (FL) while the trunk sways from side to side, but its hindlimbs are immobile (Pflieger et al., 1996). Even though limb movements depend on neuronal networks located in the spinal cord (Kiehn, 2006; McCrea & Rybak, 2008), sensory clues are certainly needed to guide the newborn opossum to a nipple and trigger its attachment to it. Could sensory input from the face be such a clue? When crawling towards the teat, the newborn's head is in regular contact with the mother's belly, presumably stimulating facial afferents. Moreover, we observed that the newborn reacts to light pressure exerted on the snout by extending its FL.

Using *in vitro* preparations of newborn opossums, Adadja et al. (2013) showed that low intensity electrical stimulations of the trigeminal ganglion elicited FL extensions resembling the movements performed by the intact animal. Moreover, trigeminal stimulations were more efficient than vestibular, visual or olfactory stimulations in triggering FL movements. The use of immunohistochemistry for NF-200, a marker of nerve fiber maturation, revealed the presence of trigeminal fibers into the head skin, predominantly in the snout (Adadja et al., 2013). These findings suggest that mechanoreception of the facial skin relayed by trigeminal afferents to the central nervous system may influence the motor spinal centers involved in FL movement in newborn opossums.

Nissl stained histological sections reveal that the snout skin is devoid of large encapsulated receptors such as Vater-Pacini and Meissner corpuscles and that the developing hair follicles are all internal in newborn opossums (unpublished observation). However, Jones & Munger (1985) observed numerous Merkel cells (MC) in the derm and the epiderm in electron microscopy, which seemed immature and not yet connected to nerve terminals in newborn opossums, but which matured in the following days. MC are epidermal mechanoreceptors which convey light touch and are contacted by slowly adapting type I (SA I) fibers (reviews in Tachibana & Nawa, 2002; Boulais & Misery, 2007, 2008; Lucarz & Brand, 2007; Polakovicova et al., 2011).

To investigate the possible role of mechanoreception conveyed by the trigeminal system on motor guidance of newborn opossums, firstly we have used AM1-43 labeling *in vivo* to reveal the presence and distribution of putative MC in the epidermis of newborn opossums. AM1-43 is the fixable analog of FM1-43, both styryl pyridinium dyes used to study endocytosis because their fluorescence increases after insertion and division into cell membranes (Betz et al., 1996; Meyers et al., 2003). They have been used to label a large range of sensory cell types *in vivo*, including MC in the epidermis of mammals (Meyers et al., 2003; Marasco et al., 2006). Secondly, we have recorded the electromyographic response of the triceps muscle of the FL following application of calibrated forces on the snout skin in *in vitro* preparations of newborn opossums. Bath applications of the metabotropic glutamate 1 receptor antagonist YM298198 or of the purinergic receptor antagonist PPADS decreased the FL EMG. These results support the hypothesis that touch sensitivity of the snout relayed by the trigeminal system is functional in newborn opossums and may influence FL movement, possibly contributing to guiding the

animal to the nipple. Preliminary reports of this study have been presented in abstract form (Desmarais et al., 2013, 2014).

Material & Method

This research was performed under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care using protocols approved by the University Animals Ethics Committee. Gray, short-tailed opossums *Monodelphis domestica* were obtained from a colony maintained at the departmental animal facility according to Fadem et al. (1982), Kraus & Fadem (1987); Harder et al. (1993) and Vandeberg & Williams-Blangero (2010). For specific details, see Cassidy et al. (1994).

AM1-43 labeling

22 opossums were removed from their mother on the day of birth (Postnatal day 0, P0). They were lightly anesthetized by hypothermia (1-2 min at -20 °C in a gauze-covered petri dish) before being injected i.p. with 0.03 ml of phosphate buffer saline (0.1 M PBS, 0.9% NaCl) alone for control specimens ($n = 5$) or with AM1-43 (Biotium, USA) (3 mg/kg body weight) for the experimental specimens ($n = 17$). Each opossum was then put on moistened gauze in a petri dish under a lamp (30°C) for one hour before being deeply anesthetized by hypothermia (4-5 min at -20 °C) until unresponsive to tactile stimulation (pinching of the tail or limbs). It was rapidly decapitated and eviscerated, the head and the body with the FL attached were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (in 0.1 M PBS) for 48 h before being transferred to a sucrose solution (30% in PBS) for 24 h, and separately embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Miles Scientific) solidified in a 2-methylbutane bath frozen in carbon ice-ethanol. Each tissue block was cut at 20 µm on a cryostat (CM3050S Leica), the sections were mounted

onto Superfrost slides (Fisher) and allowed to dry for 24 h before being coverslipped using Fluoromount-G (Southern Biotech, USA).

The sections were observed with a BX51 Olympus microscope equipped for epifluorescence using filters to detect AM1-43 (excitation 450-490 nm, emission 560-620 nm) (Chroma Technology Corp) and UV (excitation 358 nm; emission 461 nm) to verify the specificity of the labeling. Microphotographs were acquired with a color digital camera (QImaging) and digitized using the image analysis software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics). Microphotographs were also taken using a laser scanning confocal microscope (TCS SP2, Leica Microsystems) with 40X (NA:1.25) or 100X (NA:1.40) 488 nm and 633 nm lasers. When needed, conversion to monochrome format and manual adjustment of contrast were made in Corel Photo-Paint12. Figures and drawings were made using CorelDraw12. Counts of AM1-43 labeled cells were made from serial sections in one specimen.

FL EMG responses to mechanical stimulation of the snout and pharmacological manipulation

A total of 37 opossums aged P0 to P4 were used for electrophysiological experiments. Opossums older than P0 were used to ensure a sufficient number of animals because only 1 sometime 2 experiments could be done in one day. *In vitro* preparations of the neuraxis of newborn opossums with the limbs attached were obtained as described by Adadja et al. (2013). Briefly, each opossum, deeply anaesthetized by hypothermia, was placed in a Sylgard-lined petri dish filled with physiological solution (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Glucose 15 mM; 95% O₂ / 5% CO₂; pH 7.4; adapted from

Nicholls et al., 1990; Stewart et al., 1991). It was eviscerated and the lower part of the jaw was removed. The skin of the body and the FL was sectioned, but the facial skin was left intact. The dorsal surface of brain and spinal cord was exposed and the cerebral hemispheres were sectioned from the rest of the neuraxis, which was left in the carcass with the FL attached. The specimen was then pinned to the petri dish coating, dorsal side up. The oxygenated physiological solution was perfused continually into the dish using a peristaltic pump (Waston-Marlow 120S/DM3). The preparation was kept undisturbed for at least 2 hours before the experiments began. All manipulations were carried out at room temperature (21-24 °C).

For FL movement recording, the triceps muscle was selected because its contraction yields FL extensions similar to what is observed in intact animals left on the mother. To record its EMG, a teflon-insulated silver wire (wire diameter: 76.2 μm ; total diameter: 139.7 μm ; A-M Systems, Inc.) was inserted into the muscle in each FL (Figure 1A). A small piece of teflon tape was tightly apposed over the muscle in order to increase stability and isolate the insertion site. The wires were connected to amplifiers (CP511, Grass Technologies) through high-impedance modules (HZP, Grass). Pressure was applied to the facial skin as described below and the amplified signals ($\times 10$ KHz; bandwidth: 3 Hz-3 KHz) were digitized (Digidata 1322A, Axon instruments), recorded (sampling rate: 11.1 KHz) and saved on disk with Clampex 9.2 software (Axon Instruments).

Mechanical pressure was applied to the facial skin using a rod probe attached to a strain gauge installed on a micromanipulator (for more details see Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

Pressure intensity was recorded with a Grass force displacement transducer (FT-03). The signal was amplified ($\times 10000$) and filtered (bandwidth: 3Hz – 3kHz) before being digitized.

The possible involvement of MC in the recorded triceps responses was tested by using YM298198 (6-amino-N-cyclohexyl-N,3-dimethylthiazolo[3,2- α]benzimidazole-2-carboxamide hydrochloride, axon MEDCHEM). The latter is a non-competitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor which has been shown to block responses induced by mechanical stimulation in slowly adapting type I (SAI) fibers, the fibers associated with MC, in isolated rat sinus hair follicle preparations (Cahusac & Mavulati, 2009), YM298198 was dissolved at 40 μ M in physiological solution before being perfused in the dish of 7 of the 37 specimens during 20 to 40 min. We also investigated the possible implication of purinergic receptors (P2) in the elicitation of triceps responses by facial mechanosensory stimulation using the P2 antagonist PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, Sigma-Aldrich). P2 are often associated with sensory endings of central neurons (review in Burnstock, 2013), and PPADS have been shown to block the entry of AM1-43, the dye used herein to identify MC in newborn opossums, in cochlear ciliated cells (Meyers et al., 2003; Crumling et al., 2009). We have dissolved PPADS in physiological solution at 200 μ M and applied it to the bath for 30 to 40 min in 6 others of the 37 specimens. The responses to the stimulations performed before application of the compounds served as control. Recovery of the responses following YM298198 or PPADS application was also tested after rinsing with the physiological solution alone.

Data analysis

The EMG signals were analyzed with Clampfit 9.2 software (Axon Instruments). Raw EMG and force signal traces (Figure 1B₁) were rectified and the sampling rate reduced to 0.1 KHz (Figure 1B₂). The averaged baseline trace (before the response) was adjusted at 0 V. Then, the area under the curve was measured (Figure 1B₂) from the onset of the response, when the trace deflected upward from the baseline values, up to the return to baseline values (pre-stimulation level). In order to pool the results from different limbs and different preparations, the values obtained for a given limb were normalized as a percentage of the maximal area obtained for that limb. The intensity of the first 4 or 5 responses being abnormally high, presumably due to hyperexcitability (see Results), they were not included in the normalization. Response latency was measured from the onset of the deflection of the gauge signal to the onset of the response (Figure 1B₂). Statistical analyses were done using Prism 5 (Graphpad, USA). Data are presented as averages \pm SEM in the text and the figures.

Results

AM1-43 labeling

The facial epidermis of the newborn opossum consists of a 4 to 6 cell layer epithelium which is not yet keratinized. AM1-43 labeling was absent in uninjected, control specimens. In AM1-43 injected specimens, fluorescence was observed in the cytoplasm, not in the nucleus, of epidermal cells (Figure 3A₁), (arrows in Figure 2) located at the base of the epidermis of the head, and in the peg of developing hair follicles (Figure 3A₃). Labeled nerve fibers were occasionally observed close to labeled epidermal cells (Figure 3A₂). AM1-43 labeled epidermal cells were most abundant in the snout region, especially around the nares (Figure 3A₄), and less

abundant elsewhere on the head. They also occurred in the neck skin, some groupings resembling presumptive touch domes. The distribution of labeled cells is represented on drawings of transverse head sections in Figure 3B and of sagittal sections from a different specimen in Figure 3C. The number of labeled cells were counted on 16 head sections, one every 200 μm , over a length of 3160 μm (every 20 sections) from the specimen illustrated in Figure 3B. About 160 labeled cells per section were found at snout levels (Figure 3B₁) and only 8 to 15 at caudal most head levels (Figure 3B₄), for a total of 1044 labeled cells.

Occasional labeled cells were found in the buccal and nasal mucosae, as well as in the tongue epithelium, possibly presumptive taste buds, but they were difficult to discern. No labeled cells were observed in the cephalic ganglia and in the brain, or in the epidermis of the lower neck or back. However, labeling was seen in epidermal cells of the hands and fingers, but these were fewer than 10 per section.

FL responses to mechanical stimulation

As mentioned above, FL movement can be elicited by tactile stimulation of the snout in intact newborn opossums. In the present *in vitro* preparations, calibrated mechanical pressure exerted on one side of the face elicited left and right triceps contractions, as revealed by their EMG recording. The average response latency was 136.2 ± 15.9 ms for the ipsilateral FL and 100.2 ± 16.0 ms for the contralateral FL ($n = 137$ stimulations), the difference between the two limbs not being significant in the 6 specimens studied ($P = 0.2327$, Wilcoxon matched-pairs rank t-test). The first 4 or 5 responses at the beginning of each recording session were generally higher than the following (Figure 7A) and were followed by responses of lower amplitude but

more stable over time. These initial values were not included in the calculation of the normalization necessary to allow comparison between limbs and between specimens. In the same 6 specimens, response intensity was $27.9 \pm 2.2\%$ for the triceps ipsilateral to the stimulation and $21.6 \pm 2.0\%$ for the contralateral triceps ($n = 137$ stimulations) (Figure 5A-B). The responses of the ipsilateral and contralateral triceps to each given stimulation were significantly different ($P < 0.0001$, Wilcoxon matched-pairs rank t-test). However, when pooling the results of all stimulations, the difference between the ipsilateral and contralateral triceps was no longer statistically different ($P = 0.1479$, Mann-Whitney t-test) (Figure 5B). This allowed us to pool the data obtained for the two FL in the analyses of the next experiments.

The EMG intensity increased in proportion to the force applied to the face, from 2 g to 9 g, as can be appreciated in Figure 4A, where seven rectified traces were superposed. Figure 4B shows the relationship between the intensity of the responses of the two FL of one specimen over the range of the applied forces. The linear regressions indicated by lines of different specimen show the same trend in response intensities for the left and the right FL. In Figure 4C, the linear regression for three specimens tested appears as color lines and for the three of them pooled as a black line. The correlation is statistically significant ($r = 0.6642$; $P < 0.0001$, Spearman non-parametric two-tail).

Whatever the strength of the force applied to the face in any of the experiments reported here, no rhythmical bouts of contractions, such as normally associated with locomotor rhythm, were induced, except in 1 of the 37 specimens tested. Double or triple consecutive stimulations at different forces did not either induce rhythmical activity.

The effect of long term facial mechanical stimulation on triceps response was tested in 6 preparations by applying a constant force every 1 or 2 min for 60 min. In 3 specimens a decrease in response intensity was observed, as might be expected from muscle fatigue, but in two specimens the response remained at the same level during the entire hour and one specimen even showed a slight increase in triceps response intensity (color lines in Figure 5B). The trend was thus a decrease, from $34.2 \pm 2.9\%$ for the responses recorded after 10 to 20 min of stimulation, to $19.9 \pm 2.3\%$ after 50 to 60 min ($n = 96$ stimulations at each timeframe). Triceps contractions could still be induced in the 4 specimens which were stimulated for more than 60 min (data not shown).

To determine if the facial skin is necessary for the triceps to contract following pressure stimulation, it was removed in 5 preparations. Figure 6A presents the results obtained in one representative specimen and shows that the responses were nearly abolished (blue box), compared to what they were before removing the facial skin (orange box). The average responses for the 5 specimens decreased from $38.88 \pm 2.13\%$ when the skin was present (with; Figure 6B) to $4.03 \pm 1.05\%$ after skin removal (without; Figure 6B), this 90% reduction being highly significant ($P < 0.0001$, Mann-Whitney non-parametric t-test).

To determine the possible involvement of Merkel cells in the triceps response induced by pressure to the skin, the metabotropic glutamate receptor 1 (YM298198) antagonist, necessary for signal transmission between MC and the SA I fibers that innervate them (see Cahusac & Mavulati, 2009), was applied in the bath. Figure 7A shows in one representative specimen that triceps contractions decreased after YM298198 perfusion in the bath (green box)

compared to before its application (control; orange box), and that the effect is reversible after rinsing the product (washout; blue box). The average responses for the 6 specimens tested (Figure 7B) were $20.1 \pm 1.3\%$ before YM298198 application, $9.42 \pm 0.75\%$, during application and $17.8 \pm 1.3\%$ after rinsing ($n = 236$ stimulations in each condition). This decrease is statistically highly significant ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA with Dunn's post-tests). However, part of this decrease may be attributed to the effect of the long term stimulation documented above, but which occurred in only half of the specimens. YM298198 bath application also significantly increased the response latency of the triceps from 124.5 ± 15.5 ms to 216.3 ± 14.0 ms, an effect which is also reversible 194.2 ± 15.0 ms for washout ($P < 0.0001$; Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA with Dunn's post-tests).

Moreover, AM1-43 having been an adequate marker of MC in the first set of the experiments reported here, the P2 receptors antagonist PPADS, which blocks AM1-43 entry into MC (see Crumling et al., 2009) was applied to the bath as an indirect evidence of MC functionality. Bath application of PPADS ($200 \mu\text{M}$) significantly decreased the triceps EMG response intensity, as shown in Figure 8A for one specimen, and does so in a reversible manner. For the 6 specimens tested, the responses averaged $37.5 \pm 2.0\%$ before PPADS application, $9.1 \pm 0.7\%$ during application and $33.6 \pm 2.8\%$ after washout ($n = 169$ stimulations in each condition) (Figure 8B). The 26% decrease is statistically highly significant ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA with Dunn's post-tests) and indicates a disruption of MC P2 receptors. The application of PPADS to the bath also significantly and irreversibly increased the latency of the triceps responses, from 100.1 ± 11.0 ms to 247.7 ± 19.4 ms to 345.4 ± 22.2 ms.

Discussion

The present study aimed at determining if facial mechanoreception conveyed by the trigeminal system could influence motor activity of the forelimbs (FL) in newborn opossums and contribute to their guidance or attachment to the mother's nipples. Mechanical stimulations on one side of the snout skin induced readily contractions of the triceps, a FL extensor muscle in *in vitro* preparations of the neuraxis with the limbs attached to the carcass. The triceps EMG responses of the two FL were not alternate, as in normal locomotion, but rather synchronous, and were not rhythmical. The response amplitude varied from one stimulation to another but tended to be correlated to the force applied on the facial skin. Response amplitude also tended to decrease over time which could be interpreted as a sign of muscle fatigue more than an adaptation to stimulation. The removal of the snout skin nearly abolished the EMG responses following mechanical stimulation, indicating that the triceps responses were the result of sensory innervation of the skin. Bath application of an antagonist of metabotropic glutamate receptors 1 (YM298198) halved the response intensity, suggesting that Merkel cell (MC) are the mechanoreceptors at least partly involved in the responses (Meissner and Vater-Pacini receptors being absent in the facial skin of the newborn - see Introduction). This is also supported by the 70% decreased response following bath application of an antagonist of P2 (PPADS) and the labeling of epidermal cells by AM1-43, especially around the snout, in newborn opossums.

The FL motors responses being correlated to the pressure intensity exerted on the snout skin, this suggests that more mechanoreceptors are recruited as stimulus strength increased. This may also indicate an increase in their average firing rate. It cannot be excluded that other sensory

modalities, such as nociceptors, were also recruited. Nonetheless, whatever the strength of the pressure exerted on the face, no locomotor rhythm was induced, except in one of 37 specimens, and this episode could possibly have been spontaneously generated. In their recording of motoneurons and lumbar roots following electrical stimulation of the trigeminal nerve in *in vitro* preparations of postnatal rats, Vinay et al. (1995) were unsuccessful at inducing locomotor rhythm. However mechanical stimuli applied in the peripheral territory of trigeminal nerve innervation can induce locomotion in adult decerebrate cats following prior injection of the GABAergic antagonist picrotoxin in the pontomedullary locomotor region, which is contiguous to the ventral portion of the spinal trigeminal nucleus (Aoki & Mori, 1981; Noga et al., 1988, 1991). Even if trigeminal stimulation does not induce locomotion, it is capable of inducing FL movement.

If trigeminal facial mechanoreception were used as a guide for the newborn opossum to reach the mother's teat, we would expect a unilateral (ipsi- or contralateral) FL response to a unilateral facial stimulation or at least a stronger response of one triceps, but not the bilateral responses obtained here which were, on average, of equivalent intensity and latency in both FL. This is not entirely surprising in view of our previous study showing that the same threshold intensity of trigeminal ganglion stimulation elicited comparable FL movement on both sides in *in vitro* preparations of newborn opossums (Adadja et al., 2013) or of Vinay et al. (1995) who reported that electrical stimulation of one trigeminal nerve generated comparable postsynaptic potentials in motor neurons and bursts of action potentials in the ventral roots in both sides of the lumbar spinal cord of neonatal rats. In the newborn opossum, repetitive mechanical stimulation of the face under the threshold needed to induce limb movements may exert a tonic

action on the spinal cord, via brainstem or spinal relays, which could sustain the locomotor activity rather than serve as a guidance cue to the nipple. By contrast, suprathreshold stimulation may stop the locomotor activity of the animal by provoking extension of the two FL. Such a stimulation may occur when the animal has reached a nipple. Mechanosensation may also trigger the attachment behavior to the nipple (Gemmell et al., 1988) in conjunction with other senses, such as thermal or chemical, associated with the trigeminal system. It is interesting to note that the MC are also thought to have chemosensory properties (Lucarz & Brand, 2007). The thin and non-keratinized epidermis of the newborn offers little barrier to the diffusion of volatile substances which could come from the mother's nipple. Even breathing can take place through the skin at birth (Frappell & MacFarlane, 2006).

Our experiments using the AM1-43 as a marker of MC in the facial epidermis of newborn opossums show that these cells are particularly numerous on the snout. As already mentioned AM1-43 is not specific to MC, but stains various sensory cells. However, the absence of other mechanoreceptors in the facial skin of the newborn opossum, the general morphology of the cells labeled in our experiments and their location at the base of the epidermis argue for their identity as MC, which our physiopharmacological experiments substantiate. YM298198, an antagonist of metabotropic glutamate receptor 1 (mGlu1) necessary for signal transmission between the MC and the SA I fibers that innervate them (Cahusac & Mavulati, 2009), reduced by half the muscle response and PPADS, a blocker of P2 receptors involved in the labeling of the sensory cells by AM1-43 (Crumling et al., 2009) decreased the motor response even more.

The nervous system of the newborn opossum is about comparable to that of an E13 rat embryo (see Lavallée & Pflieger, 2009), but the bones and muscles of the head and neck are relatively more developed, presumably to accommodate for the motor needs of a precocious birth (see Smith, 2001, 2006; Vaglia & Smith, 2003). The present study documents the presence of numerous MC in the facial epidermis of newborn opossums and Adadja et al. (2013) reported an abundant growth of trigeminal fibers in the skin. The precocious development (relative to the duration of gestation) of the trigeminal pathway has also been noted in the wallaby, another marsupial (Waite et al., 1994; Adadja et al., 2013).

In summary, the results obtained in this study support the hypothesis that mechanosensory inputs mediated by the trigeminal system, likely via Merkel cells, have an influence on motor behaviors of the newborn opossum. Such action on the forelimbs is tonic and unlikely to serve as a guide, but rather as a reinforcement for the animal to crawl on the mother's belly until it reaches a teat and to help its attachment to it.

References

- Adadja T, Cabana T, & Pflieger J-F. (2013) Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Neuroscience* 228:259–70.
- Aoki M & Mori S. (1981) Locomotion elicited by pinna stimulation in the acute precollicular-post-mammillary decerebrate cat. *Brain Res* 214:424–428.
- Betz WJ, Mao F, & Smith CB. (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365–371.
- Boulais N & Misery L. (2007) Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 57:147–65.
- Boulais N & Misery L. (2008) The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatology* 18:119–27.
- Burnstock G. (2013) Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci* 7:227.
- Cahusac PMB & Mavulati SC. (2009) Non-competitive metabotropic glutamate 1 receptor antagonists block activity of slowly adapting type I mechanoreceptor units in the rat sinus hair follicle. *Neuroscience* 163:933–941.
- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger J-F, & Cabana T. (1994) The Development of Sensorimotor Reflexes in the Brazilian Opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 43:244–253.
- Crumling MA, Tong M, Aschenbach KL, Liu LQ, et al. (2009) P2X antagonists inhibit styryl dye entry into hair cells. *Neuroscience* 161:1144–53.
- Desmarais M-J, Cabana T, & Pflieger J-F. (2013) Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Program 610.07. In: 2013 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Desmarais M-J, Cabana T, & Pflieger J-F. (2014) Snout mechanosensory influence on arm extensor response in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Poster No. 1-D-117. In: 2014 CAN-ACN Abstract Booklet. Montréal, QC: Canadian Association for Neuroscience.
- Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, VandeBerg JL, et al. (1982) Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 32:405–9.
- Frappell PB & MacFarlane PM. (2006) Development of the respiratory system in marsupials. *Respir Physiol Neurobiol* 154:252–67.
- Harder JD, Stonerook MJ, & Pandy J. (1993) Gestation and Placentation in Two New World Opossums : *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *J Exp Zool* 479:463–479.

- Jones TE & Munger BL. (1985) Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosens Res* 3:169–84.
- Kiehn O. (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279–306.
- Kraus DB & Fadem BH. (1987) Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 37:478–482.
- Lavallée A & Pflieger J-F. (2009) Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: an anatomical study. *Brain Res* 1282:1–9.
- Lucarz A & Brand G. (2007) Current considerations about Merkel cells. *Eur J Cell Biol* 86:243–51.
- Marasco PD, Tsuruda PR, Bautista DM, Julius D, et al. (2006) Neuroanatomical evidence for segregation of nerve fibers conveying light touch and pain sensation in Eimer's organ of the mole. *PNAS* 103:9339–9344.
- McCrea DA & Rybak IA. (2008) Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57:134–46.
- Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, et al. (2003) Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J Neurosci* 23:4054–65.
- Nicholls JG, Stewart RR, Erulkar SD, & Saunders NR. (1990) Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained in vitro. *J Exp Biol* 152:1–15.
- Noga BR, Kettler J, & Jordan LM. (1988) Locomotion Produced in Mesencephalic Cats by Injections of Putative Transmitter Substances and Antagonists into the Medial Reticular Formation and the Pontomedullary Locomotor Strip. *J Neurosci* 8:2074–2086.
- Noga BR, Kriellaars DJ, & Jordan LM. (1991) The Effect of Selective Brainstem or Spinal Cord Lesions on Treadmill Locomotion Evoked by Stimulation of the Mesencephalic or Pontomedullary Locomotor Regions. *J Neur* 11:1691–1700.
- Pflieger J-F, Cassidy G, & Cabana T. (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behav Brain Res* 80:137–43.
- Polakovicova S, Seidenberg H, Mikusova R, Polak S, et al. (2011) Merkel cells-review on developmental, functional and clinical aspects. *Bratisl Lek List* 112:80–87.

- Smith KK. (2001) Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. *J Anat* 199:121–131.
- Stewart RR, Zou DJ, Treherne JM, Møllgård K, et al. (1991) The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity. *J Exp Biol* 161:25–41.
- Tachibana T & Nawa T. (2002) Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int* 77:26–33.
- Vaglia JL & Smith KK. (2003) Early differentiation and migration of cranial neural crest in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Evol Dev* 5:121–135.
- Vandeberg JL & Williams-Blangero S. (2010) The laboratory opossum. In: *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals: Eighth Edition*. . p 246–261.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Ray D Le, & Robitaille R. (2000) A Cellular Mechanism for the Transformation of a Sensory Input into a Motor Command. *J Neurosci* 20:8169–8176.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, & Dubuc R. (1997) Role of Sensory-Evoked NMDA Plateau Potentials in the Initiation of Locomotion. *Science* (80-) 278:1122–1125.
- Vinay L, Cazalets JR, & Clarac F. (1995) Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 7:143–51.
- Waite PM, Marotte LR, & Leamey C a. (1994) Timecourse of development of the wallaby trigeminal pathway. I. Periphery to brainstem. *J Comp Neurol* 350:75–95.

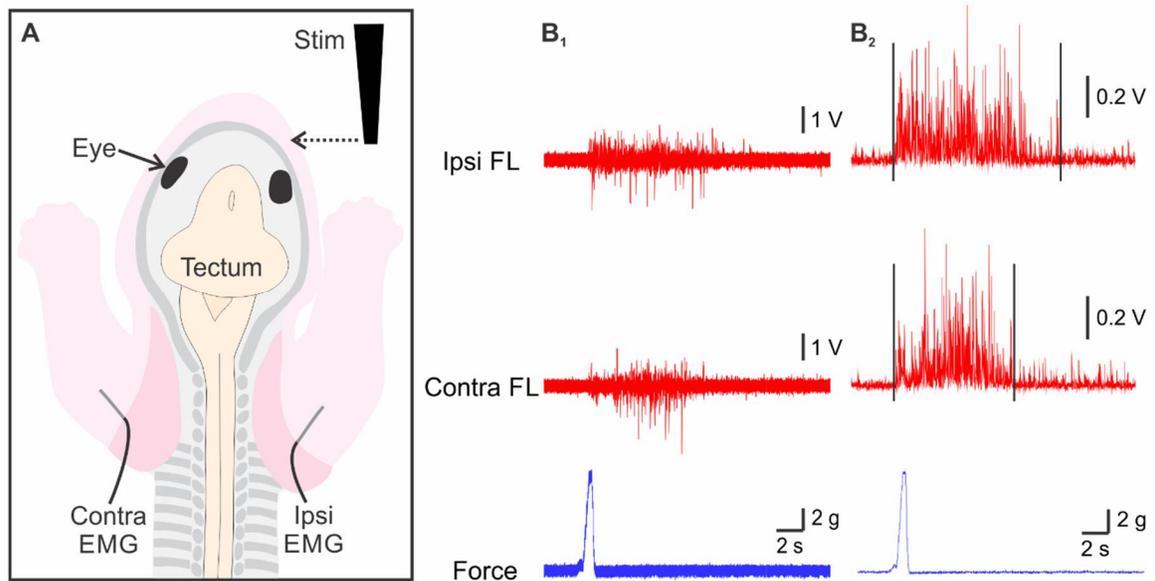


Figure 1. (A) Schematic representation of an *in vitro* preparation of a newborn opossum. Forelimb responses induced by snout skin stimulation (Stim) were recorded by electromyography (EMG) of the triceps muscle from each forelimb (FL). (B₁) Raw EMG of the ipsilateral (Ipsi) FL (*top*), the contralateral (Contra) FL (*middle*) and raw force trace (*bottom*). (B₂) EMG rectified and with a reduced sampling rate of the Ipsi FL (*top*), the Contra FL (*middle*) and the rectified and reduced force (*bottom*).

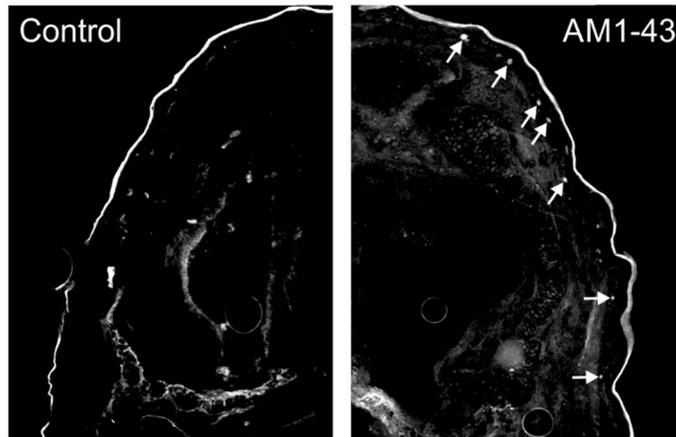


Figure 2. Transverse section of newborn's head. The right half shows AM1-43 labeling and the left half shows a control. The arrows point to AM1-43 labeled cells.

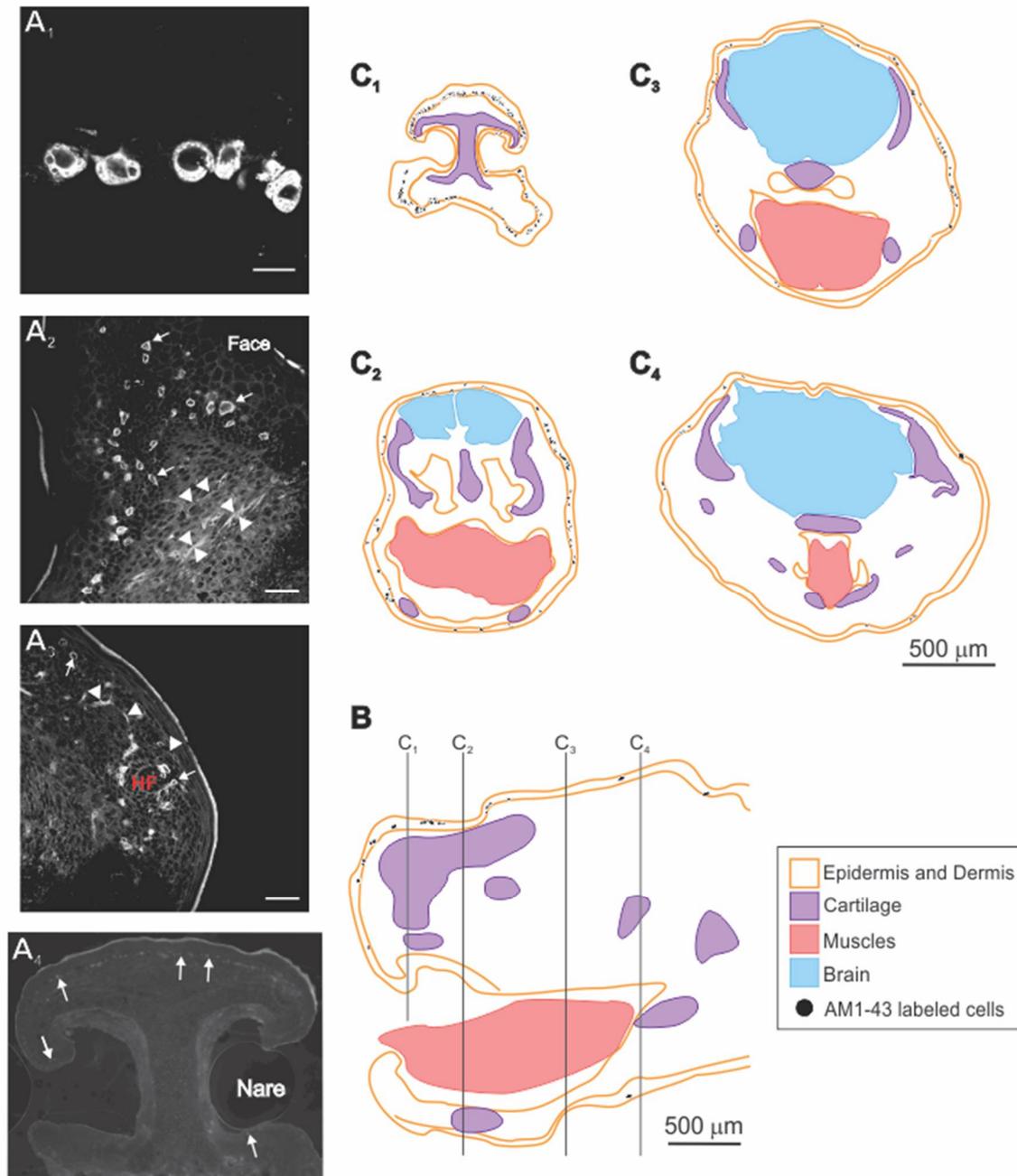


Figure 3. (A) Microphotographs of head sections showing AM1-43 labeled cells (arrows) and neurites (arrowheads) (A₁ - A₄). Labeled cells were most numerous in the hair follicles (HF). (B) Schematic drawing of a sagittal sections of the head of a newborn opossum indicating the levels at which the drawings illustrated in C are taken. (C) Cross sections from the head of another newborn opossum at the rostrocaudal levels indicated in B, illustrating the position of AM1-43 labeled cells.

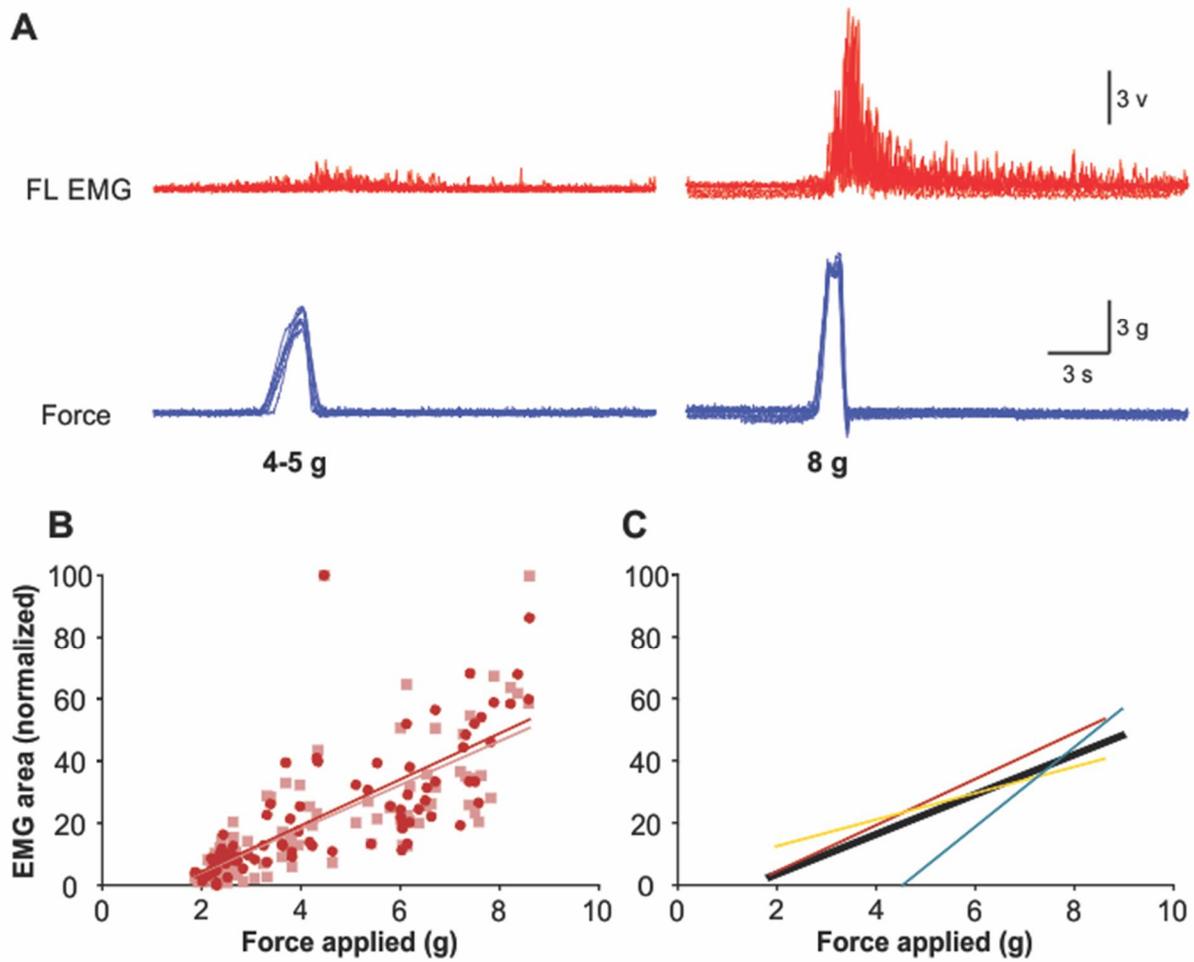


Figure 4. Arm extensor response in relation to force stimulation. (A) EMG responses of the triceps (red) to pressures of 4-5 g or 8 g (blue) applied on the snout. Seven EMG and force traces were superimposed. (B) Responses (% EMG area, normalized) according to the strength of the force (g) applied to the snout of one specimen. (C) Correlation analysis for the 6 specimens tested. Each color represents the regression line of a given specimen and the black line represents the average.

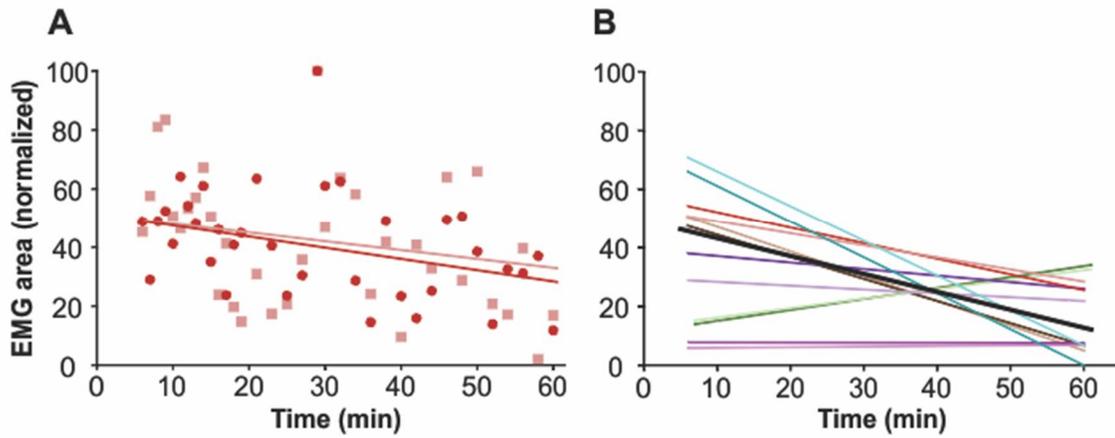


Figure 5. Triceps response evoked by mechanical stimulation of the facial skin over time. (A) Responses (% EMG area, normalized) during 60 minutes of constant stimulation in one specimen. (B) Correlation analysis for the 6 specimens tested. Each pair of colors, dark and light, represents the regression lines of the ipsi- and contralateral triceps of a given specimen and the black line is the average.

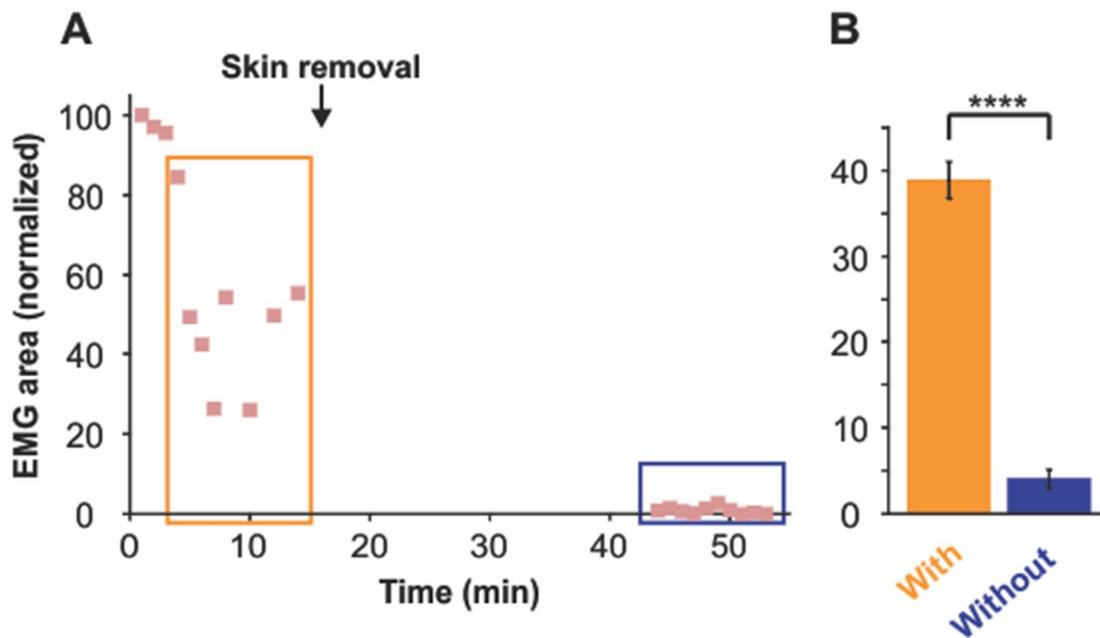


Figure 6. Triceps responses evoked by mechanical stimulation of the face with and without the skin. (A) Responses (% EMG area, normalized) in one specimen during a 10 min interval before the skin was removed and during another 10 min interval one half hour after skin removal, showing that the responses are nearly abolished. The orange and blue color boxes indicate the data from this specimen used in the histograms in B. **(B)** Histograms showing the average responses (% EMG area, normalized) \pm SEM of the 5 preparations tested ($n = 5$).

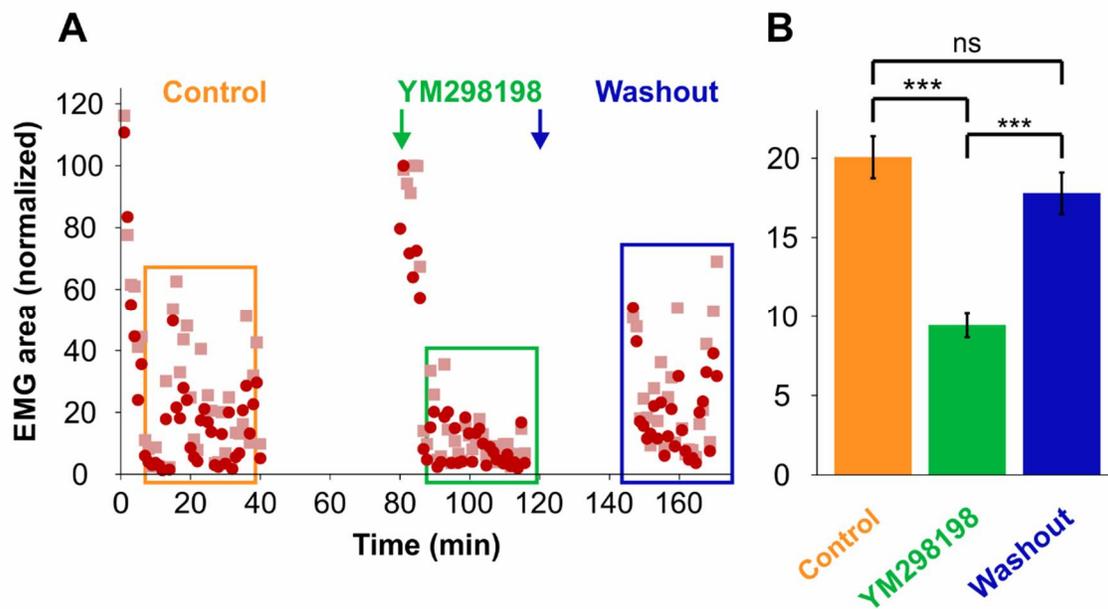


Figure 7. Effect of YM298198 bath application on triceps responses following mechanical pressure applied to the snout skin. (A) Responses (% EMG area, normalized) in one specimen before (orange box) and during (green box) application, showing a decrease in the responses, and a reversal after washout (blue box). **(B)** Histograms of average responses (% EMG area, normalized) \pm SEM for the 7 specimens tested.

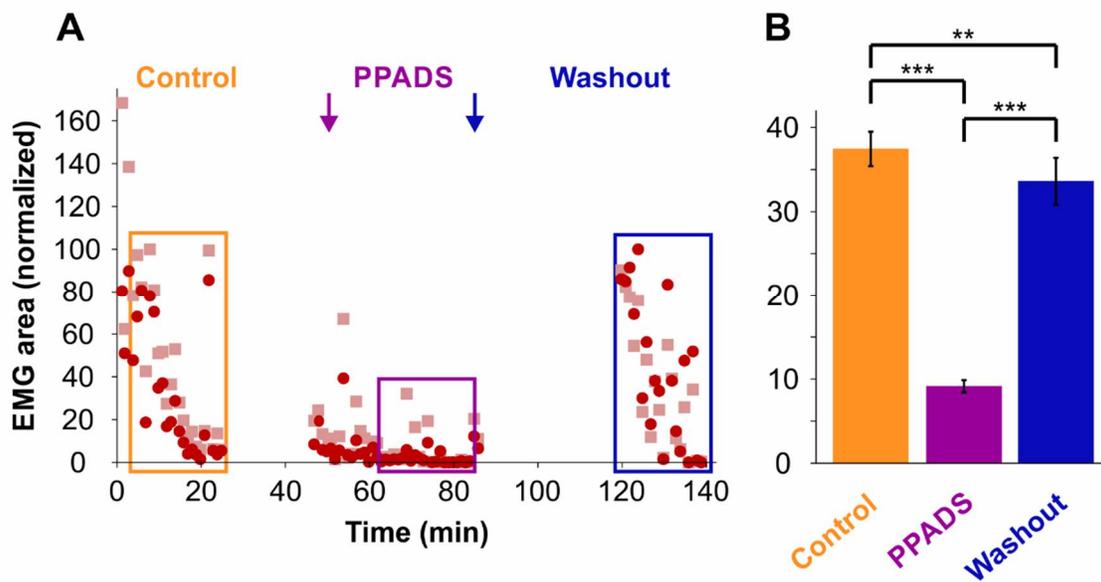


Figure 8. Effect of P2X antagonist, PPADS, on triceps response evoked by pressure applied on the snout skin. (A) Response (% EMG area, normalized) in one specimen before (orange box) and during (purple box) application, showing a decrease in the responses, and a reversal after washout (blue box). **(B)** Histograms of average responses for the 6 specimens tested.

4. DISCUSSION & CONCLUSION

La présente étude avait pour but de déterminer si les récepteurs mécanosensoriels faciaux peuvent affecter l'activité motrice des membres antérieurs (MA) de l'opossum nouveau-né *Monodelphis domestica*, notamment en contribuant à le guider de l'orifice urogénital vers une tétine ou à favoriser son attachement à celle-ci. Ces récepteurs appartiennent au système du nerf du trijumeau, responsable de l'innervation sensorielle et motrice de la face. Dans un premier temps, des injections intrapéritonéales d'un marqueur de cellules sensorielles périphériques, l'AM1-43, dans des opossums nouveau-nés a dévoilé la présence de cellules marquées dans la peau de la tête, particulièrement abondantes dans la peau du museau. Étant donné l'absence de corpuscules de Vater-Pacini ou de Meissner dans la peau de l'opossum nouveau-né et vu la localisation des cellules marquées à la base de l'épiderme, il y a tout lieu de croire qu'il s'agit de cellules de Merkel, un des mécanorécepteurs cutanés, dont la présence avait déjà été documentée en microscopie électronique chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Jones & Munger, 1985). La présence des cellules de Merkel a aussi été observée chez plusieurs autres espèces de marsupiaux à la naissance; le chat marsupial du nord, le phalanger-renard, le bandicoot brun du nord (Gemmell et al., 1988); le potoro à long nez et le bettongie de Tasmanie (Gemmell & Rose, 1989). En utilisant des préparations *in vitro* d'axe neural avec les MA attachés à la carcasse d'opossums nouveau-nés, des expériences électrophysiologiques et pharmacologiques ont servi à tester si ces mécanorécepteurs étaient fonctionnels. Nous avons démontré qu'il est possible d'induire des réponses électromyographiques d'un muscle extenseur des MA, le triceps, suite à l'application de stimulations mécaniques de la peau d'un côté du museau. Ces réponses sont observées de manière presque synchrone dans les triceps des deux MA. Elles varient en

intensité pour des stimulations de même force, mais augmenter avec la force exercée sur la peau faciale. Des réponses peuvent être obtenues pendant plus d'une heure de stimulation, mais la tendance indique une diminution de l'intensité et une augmentation de la latence de réponse avec le temps qui peut être interprété comme un signe de fatigue musculaire. Le retrait de la peau du visage abolit les réponses musculaires des triceps, ce qui démontre que les afférences sensorielles de la peau faciale sont nécessaires à leur expression. L'application de YM298198, un antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate, le neurotransmetteur véhiculant le message des mécanorécepteurs aux afférences primaires, réduit de moitié l'amplitude des réponses du triceps, et l'application d'un antagoniste de récepteurs purinergiques (PPADS), potentiellement impliqués dans le marquage à l'AM1-43 (Crumling et al., 2009) employé ici pour identifier les cellules de Merkel, diminue encore plus l'amplitude des réponses motrices engendrées par des pressions faciales. L'ensemble de ces résultats montre que les mécanorécepteurs les cellules de Merkel innervées par les afférences primaires trigéminales sont fonctionnelles chez l'opossum nouveau-né et peuvent influencer la motricité des MA. Il est important de noter, tel que discuter précédemment, qu'il existe plusieurs mode de parturition chez les marsupiaux et que l'importance de chaque sens diffère entre les espèces.

La stimulation mécanique de la peau du museau provoque des réponses motrices dont l'intensité augmente en fonction de la force de la pression. C'est peut-être dû au fait que, lorsque la pression sur la peau est plus forte, plus de mécanorécepteurs sont activés. Ceci peut aussi indiquer que leur taux de décharge moyen augmente. Il est possible que des récepteurs d'autres modalités, les nocicepteurs entre autres soient activés. Toutefois, dans nos expériences, même des pressions très fortes n'ont pas permis d'induire un rythme locomoteur, sauf dans un seul

cas, sur un total de 37 préparations. De plus, il demeure possible que cet épisode ait été généré spontanément. Vinay et al. (1995) ont enregistré l'activité de motoneurones et de racines lombaires suite à des stimulations électriques du nerf trijumeau sur des préparations *in vitro* de rats postnataux (P0 à P4). Ils rapportent que ces stimulations ne leur ont pas permis de générer de rythme locomoteur. Le rôle du système du trijumeau dans l'induction de la locomotion a peu été étudié chez les mammifères adultes, mais chez le chat décérébré, des stimulations mécaniques appliquées dans le territoire périphérique d'innervation du nerf trijumeau peuvent induire la locomotion (Aoki & Mori, 1981; Noga et al., 1988, 1991). Cette action nécessitait l'injection préalable d'un antagoniste GABAergique (Picrotoxine) dans une « région locomotrice pontomédullaire » qui se trouverait accolée à la portion ventrale du noyau spinal du trijumeau (Noga et al., 1988, 1991). Dans l'ensemble, nos résultats rejoignent ces observations suggérant que le système mécanorécepteur de la face ne joue qu'un rôle mineur dans l'induction de la locomotion. Il est toutefois possible que, même s'ils ne génèrent pas la locomotion facilement, les inputs mécaniques puissent favoriser un rythme locomoteur préexistant au travers d'une action tonique sur les neurones spinaux.

Lorsque le nouveau-né d'opossum rampe en direction des tétines, sa tête est régulièrement en contact avec le ventre de la mère et ce contact pourrait servir à orienter l'animal dans une direction privilégiée en fonction de la configuration des obstacles qu'il rencontre, la voie vers les tétines étant la plus dégagée. Toutefois, si le système du trijumeau jouait un tel rôle directeur, nous aurions obtenu des réponses plus fortes d'un côté que de l'autre et non des réponses bilatérales des membres qui sont, en moyenne, équivalentes en intensité et en latence. L'intensité seuil de déclenchement de mouvements des membres antérieurs suite à la stimulation

du ganglion du trijumeau est aussi similaire des deux côtés (Adadja et al., 2013). Il est donc peu probable que des pressions au niveau du visage puissent générer une réponse spécifique au niveau des membres, en favorisant un côté plus que l'autre afin de, par exemple, permettre à l'animal de contourner un obstacle. L'étude sur le rat nouveau-né de Vinay et al. (1995) montre que des stimulations électriques d'un des deux nerfs du trijumeau génèrent des potentiels postsynaptiques, majoritairement excitateurs, dans les motoneurones et des bouffées de potentiels d'action dans les racines, avec des latences comparables de part et d'autre de la moelle lombaire.

Un rôle potentiellement plus important de la portion mécanoréceptrice du système trigéminospinal pourrait être de stopper l'activité locomotrice de l'opossum lorsqu'il atteint la tétine et de permettre l'attachement à une tétine (Gemmell et al., 1988). En effet, une pression forte sur le museau de l'animal stimulerait fortement les mécanorécepteurs, dont les MC putatives qui s'y trouvent en grande densité, ce qui entrainerait une extension plus ou moins prononcée des deux membres ayant pour effet de briser le rythme locomoteur et de déclencher le comportement d'accrochage à la tétine. Comme la mécanoréception ne permet sans doute pas de différencier entre différents obstacles, d'autres sens associés au système du trijumeau sont peut-être activés en parallèle de manière à provoquer ce comportement. Un sens chimique stimulé par des composantes excrétées au niveau de la tétine serait un candidat idéal. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les MC pourraient avoir des propriétés chimiosensibles, en particulier une capacité à détecter certaines substances irritantes (Lucarz & Brand, 2007). La faible épaisseur de l'épiderme et l'absence de couche cornée chez les marsupiaux nouveau-nés n'en font pas une barrière à la diffusion des composantes volatiles. Une partie de la respiration

s'effectue d'ailleurs par la peau à la naissance dans un grand nombre d'espèces (Frappell & MacFarlane, 2006).

La présence de MC au niveau du museau de l'opossum nouveau-né était connue grâce à l'étude en microscopie électronique de Jones & Munger, (1985), mais ces auteurs ne discutent pas de leur distribution. Les expériences employant l'AM1-43 dans la présente étude suggèrent que ces cellules sont très nombreuses, particulièrement au niveau de la truffe. Afin de bien vérifier qu'il s'agit de MC, nous avons essayé du contre-marquage immunohistochimique employant des anticorps dirigés contre la cytokératine-8 (CK8), la cytokératine-20 (CK20) et des transporteurs vésiculaires du glutamate 2 (Vglut2), des protéines qui, lorsqu'elles sont exprimées au niveau de l'épiderme, sont spécifiquement associées à ces cellules (Hitchcock et al., 2004). Nos différents essais n'ont pas permis de mettre le moindre immunomarquage en évidence (résultats non publiés), soit parce que les anticorps commerciaux disponibles n'étaient pas assez spécifiques pour l'opossum soit parce que les protéines ciblées ne sont pas suffisamment exprimées aux âges étudiés pour permettre un marquage notable. Faute d'une telle contre-vérification, nous ne pouvons assurer que les cellules marquées à l'AM1-43 sont bien des MC. Toutefois, la morphologie générale des cellules marquées dans nos expériences, leur localisation à la base de l'épiderme, et leur gradient de distribution montrant une densité plus importante au niveau des extrémités (truffes, mains) et très faible au niveau du tronc plaident en faveur d'un marquage spécifique des MC comme ce qui a été montré chez d'autres espèces en utilisant cette technique (Fukuda et al., 2003; Meyers et al., 2003).

Pour montrer la possible implication des MC dans la réponse motrice des MA induite par les pressions sur la peau, nous avons appliqué dans le bain un antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate de type 1 (YM298198), car il a été démontré que ces récepteurs sont nécessaires pour la transmission du signal entre les MC et les fibres qui les innervent (fibres SA I; Cahusac & Mavulati, 2009). L'application d'YM298198 entraîne une réduction de près de 55 % de la réponse ce qui suggère bien que ces cellules sont fonctionnelles et participent à la réponse sensorimotrice à cet âge. Il est toutefois difficile d'estimer à quel degré elles sont impliquées. En effet, comme l'application de l'antagoniste se fait dans le bain, il nous est impossible de savoir à quel ou quels niveaux du réseau sensorimoteur le produit agit. Il pourrait affecter tout autant la transmission synaptique entre les MC et les fibres sensorielles qui les innervent, que la transmission du signal au niveau du système nerveux central. À notre connaissance, il n'existe pas d'étude sur la distribution de ces récepteurs dans la tête ni dans le système nerveux central de l'opossum. Il serait intéressant d'en entreprendre pour mieux comprendre le rôle de ces récepteurs dans les fonctions sensorimotrices de l'opossum nouveau-né.

Dans le but de démontrer la fonctionnalité des MC chez l'opossum nouveau-né, nous avons aussi employé un bloqueur à large spectre des récepteurs P2 (PPADS). Il s'agit d'une approche très indirecte, car elle découle de la démonstration que ces récepteurs sont fortement impliqués dans le marquage des cellules sensorielles par l'AM1-43 (Crumling et al., 2009). Nous cherchions à perturber l'activité des MC putatives en bloquant les récepteurs P2. La diminution de près de 75 % de la réponse motrice suite à de telles applications supporte l'idée que ces récepteurs jouent un rôle dans les réponses sensorimotrices induites par des pressions

sur la peau. Toutefois, il est très improbable que cette diminution de la réponse repose uniquement sur un blocage de l'activité des MC. Comme dans le cas de l'YM298198, il est impossible de savoir à quel ou quels niveaux du réseau sensorimoteur le PPADS a agi, mais on peut supposer que d'autres structures nerveuses expriment des récepteurs P2 et ont vues leur activité affectée par l'application de PPADS. C'est le cas de fibres sensorielles à terminaisons nues comme celles qui ont été marquées dans nos expériences. Ce bloqueur a aussi pu agir au niveau central. D'autres séries d'expériences, anatomiques (i.e., immunohistochimie, hybridation *in situ*) et physiologiques (i.e., pharmacologiques), sont nécessaires pour mieux caractériser quels sous-types de récepteurs P2 sont impliqués ainsi que leur localisation. Il serait aussi intéressant de voir si les récepteurs piezo-2 sont présents et fonctionnels. En effet, il a récemment été démontré chez la souris que ces canaux sensibles aux déformations mécaniques sont essentiels pour qu'il y ait mécanotransduction par les MC (Woo et al., 2014).

L'opossum naît après 14 à 15 jours de gestation, mais son système nerveux suit un patron temporel de développement relativement lent qui fait en sorte qu'à la naissance, il est en général comparable à celui d'un rat au 13^e jour embryonnaire (E13, sur 22 jours de gestation en moyenne) (Lavallée & Pflieger, 2009). Par contraste, le système squeletto-musculaire des régions du cou et de la tête se développe plus rapidement, en relation avec les besoins moteurs imposés par la naissance précoce (voir Smith, 2001, 2006; Vaglia & Smith, 2003). Ce développement expliquerait sans doute la forte innervation périphérique peaucière observée au niveau de la tête autant chez l'opossum que chez d'autres marsupiaux (Waite et al., 1994; Adadja et al., 2013). Chez le rat, les fibres issues du ganglion du trijumeau pénètrent le tronc cérébral vers le 12^e jour embryonnaire (E12) et croissent, selon un gradient rostrocaudal, jusqu'à

E15 pour former le faisceau du trijumeau spinal qui s'étend entre le pont et les premiers segments cervicaux de la moelle (Erzurumlu & Jhaveri, 1992; Waite et al., 2000). À partir de E15, les afférences trigéminales étendent des collatérales dans les noyaux sensoriels (noyau principal et noyau spinal) du trijumeau. Waite et al. (2000) ont étudié le développement fonctionnel du trijumeau en utilisant une préparation *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés à laquelle le ganglion du trijumeau était rattaché. En stimulant électriquement le ganglion et enregistrant le signal induit au niveau des noyaux centraux à l'aide d'électrodes à succion, ils montrent que les afférences primaires trigéminales deviennent fonctionnelles vers E14, mais que la transmission synaptique aux neurones secondaires se fait qu'environ un jour plus tard (E15). Même si aucune donnée n'existe sur le développement prénatal du trijumeau chez l'opossum, ces données suggèrent que le développement fonctionnel de ce système est légèrement plus avancé chez l'opossum nouveau-né que chez un rat d'âge comparable.

Le système du trijumeau est relativement bien développé à la naissance chez les marsupiaux. Par exemple, de nombreuses fibres nerveuses issues du ganglion du trijumeau sont présentes au niveau du derme et de la base de l'épiderme chez le nouveau-né de wallaby (Waite et al., 1994) ou d'opossum (Adadja et al., 2013). Les branches du nerf du trijumeau sont relativement volumineuses, principalement la branche mandibulaire et la branche maxillaire. Par comparaison, chez le rat, des injections de neurobiotines dans le ganglion du trijumeau montrent que les premiers afférences trigéminales atteignent le tronc cérébral au jour embryonnaire (E)13 (Waite et al., 2000).

Dans le but d'identifier les voies trigémino-spinales impliquées dans la réponse motrice engendrée par la stimulation du museau du nouveau-né, il serait intéressant d'effectuer des expériences immunohistochimiques utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine c-Fos. Cette protéine est un facteur de transcription codé par un gène précoce exprimé dans les noyaux de cellules en réponse à différents types de stimulations. Ainsi, c-Fos est souvent utilisé comme un marqueur de l'activité neuronale suivant des stimulations sensorielles (Hunt et al., 1987; Holstein et al., 2012). Des stimulations mécaniques de la peau du museau de nouveau-nés intacts ou de préparations *in vitro* devraient induire l'expression de c-Fos dans les neurones activés par ces stimulations, c'est-à-dire ceux impliqués dans la perception du signal et ceux impliqués dans le traitement du signal au niveau central. La comparaison entre des animaux ou des préparations non-stimulés permettra d'isoler les neurones spécifiquement concernés par le traitement du signal mécanique, dont ceux faisant partie des voies trigémino-spinales.

En résumé, les résultats obtenus lors de cette étude électrophysiologique chez l'opossum *Monodelphis domestica*, supportent l'hypothèse que le système du trijumeau a une influence sur les comportements moteurs du nouveau-né. En effet, le retrait de la peau facial abolit presque les réponses induites par des pressions mécaniques appliquées sur la peau du museau. Parmi les récepteurs sensoriels de la peau liée au système du trijumeau, les MC sont probablement impliquées puisque la peau du nouveau-né est dépourvue de récepteurs sensoriels encapsulés tels que les corpuscules de Vater-Pacini et de Meissner. Chez plusieurs espèces de marsupiaux, la présence de MC a été observée dès la naissance. De plus, la densité de ces cellules au niveau du museau a été mise en évidence par l'AM1-43 chez l'opossum nouveau-né. Les effets

d'antagonistes de récepteurs métabotropiques et de récepteurs purinergiques (P2) sur les réponses motrices supporte davantage l'implication des MC. Par contre, tel que dit précédemment, il ne peut être exclu que ces composés ai affecté d'autres régions du système nerveux ou que des fibres relayant d'autres modalités sensorielles, comme les fibres nociceptives ou thermoceptives, puissent aussi répondre à des stimulations mécaniques et sont aussi affectées par les antagonistes. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les voies relayant les inputs mécaniques vers la moelle épinière ainsi que les récepteurs moléculaires spécifiquement impliqués dans la réponse sensorimotrice induite par des pressions appliquées sur le visage de l'opossum nouveau-né.

Bibliographie

- Adadja T, Cabana T, & Pflieger J-F. (2013) Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Neuroscience* 228:259–70.
- Aitkin L, Cochran S, Frost S, Martsi-McClintock A, et al. (1997) Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*: evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus. *Hear Res* 113:69–75.
- Amalric M, Cabana T, & Pflieger J-F. (2012) Electrical stimulation of the MLR and pharmacological manipulation induce locomotion in newborn opossums *Monodelphis domestica*. Program No. 734.22/A43. In: *Neuroscience Meeting Planner*. New Orleans, LA: Society for Neuroscience.
- Aoki M & Mori S. (1981) Locomotion elicited by pinna stimulation in the acute precollicular-post-mammillary decerebrate cat. *Brain Res* 214:424–428.
- Barnes RD & Barthold SW. (1969) Reproduction and breeding behaviour in an experiment colony of *Marmosa mitis* Bangs (Didelphidae). *J Reprod Fertil Suppl* 6:447–482.
- Barthélemy D & Cabana T. (2005) Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Dev Brain Res* 155:87–98.
- Beresovskii VK & Bayev K V. (1991) Locomotor Neural Mechanisms in Arthropods and Vertebrates. In: *Locomotor regions of the brain stem: a new hypothesis of locomotion initiation*. ed. Armstr. Manchester and New York: Manchester University Press. p 260–268.
- Betz WJ, Mao F, & Smith CB. (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365–371.
- Boulais N & Misery L. (2007) Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 57:147–65.
- Boulais N & Misery L. (2008) The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatology* 18:119–27.
- Burnstock G. (2013) Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci* 7:227.
- Cabana T, Desrosiers C, & Nadeau A. (1992) The ontogenesis of corticobulbar projections and the virtual absence of corticospinal connections in the opossum, *Monodelphis domestica*. In: *Society for Neuroscience*.
- Cabana T. (2000) The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53:615–26.

- Cahusac PMB & Mavulati SC. (2009) Non-competitive metabotropic glutamate 1 receptor antagonists block activity of slowly adapting type I mechanoreceptor units in the rat sinus hair follicle. *Neuroscience* 163:933–941.
- Cannon JR, Bakker HR, Bradshaw SD, & McDonald IR. (1976) Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka. *Nature* 259:42.
- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger J-F, & Cabana T. (1994) The Development of Sensorimotor Reflexes in the Brazilian Opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 43:244–253.
- Cassidy G & Cabana T. (1993) The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 72:291–9.
- Crumling MA, Tong M, Aschenbach KL, Liu LQ, et al. (2009) P2X antagonists inhibit styryl dye entry into hair cells. *Neuroscience* 161:1144–53.
- Desmarais M-J, Cabana T, & Pflieger J-F. (2013) Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Program 610.07. In: 2013 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Desmarais M-J, Cabana T, & Pflieger J-F. (2014) Snout mechanosensory influence on arm extensor response in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Poster No. 1-D-117. In: 2014 CAN-ACN Abstract Booklet. Montréal, QC: Canadian Association for Neuroscience.
- Desrosiers C. (1994) Ontogenèse des Voies Spinales Ascendantes Provenant du Renflement Lombosacré Chez L'opossum, *Monodelphis domestica*. M.Sc. Thesis, Departement de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal.
- Diagne M, Valla J, Delfini C, Buisseret-Delmas C, et al. (2006) Trigemino-vestibular and trigeminospinal pathways in rats: retrograde tracing compared with glutamic acid decarboxylase and glutamate immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 496:759–72.
- Edwards MJ & Deakin JE. (2013) The marsupial pouch: implications for reproductive success and mammalian evolution. *Aust J Zool* 61:41.
- Erzurumlu RS & Jhaveri S. (1992) Trigeminal ganglion cell processes are spatially ordered prior to the differentiation of the vibrissa pad. *J Neurosci* 12:3946–3955.
- Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, VandeBerg JL, et al. (1982) Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 32:405–9.
- Fadem BH. (1982) Care and Breeding of the Gray, Short-Tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 32:405–409.

- Frappell PB & MacFarlane PM. (2006) Development of the respiratory system in marsupials. *Respir Physiol Neurobiol* 154:252–67.
- Fukuda J, Ishimine H, & Masaki Y. (2003) Long-term staining of live Merkel cells with FM dyes. *Cell Tissue Res* 311:325–32.
- Gemmell RT. (2002) Induction of birth in the bandicoot (*Isodon macrourus*) with prostaglandin and oxytocin. *Reproduction* 123:291–300.
- Gemmell RT, Peters B, & Nelson J. (1988) Ultrastructural identification of Merkel cells around the mouth of the newborn marsupial. *Anat Embryol (Berl)* 177:403–408.
- Gemmell RT & Rose RW. (1989) The senses involved in movement of some newborn Macropodoidea and other marsupials from cloaca to pouch. (Grigg G, Jarman P, Hume I, editors.). Chipping Norton Nsw: Surrey Beatty & Sons.
- Gemmell RT, Veitch CE, & Nelson JE. (1999) Birth in the northern brown bandicoot, *Isodon macrourus* (Marsupialia:Peramelidae). *Aust J Zool* 47:517.
- Gemmell RT, Veitch CE, & Nelson JE. (2002) Birth in marsupials. *Comp Biochem Physiol* 131:621–30.
- Gingras J & Cabana T. (1999) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:551–60.
- Grillner S. (1975) Central Locomotion Mechanisms in Vertebrates : and Reflex Interaction. *Physiol Rev* 55:247–304.
- Harder JD, Stonerook MJ, & Pandy J. (1993) Gestation and Placentation in Two New World Opossums : *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *J Exp Zool* 479:463–479.
- Hill JP & Hill WCO. (1955) The growth-stages of the pouch-young of the Native Cat (*Dasyurus viverrinus*) together with observations on the anatomy of the new-born young. *J Zool* 1780:349–452.
- Hitchcock IS, Genever PG, & Cahusac PMB. (2004) Essential components for a glutamatergic synapse between Merkel cell and nerve terminal in rats. *Neurosci Lett* 362:196–9.
- Holstein GR, Friedrich VL, Martinelli GP, Ogorodnikov D, et al. (2012) Fos expression in neurons of the rat vestibulo-autonomic pathway activated by sinusoidal galvanic vestibular stimulation. *Front Neurol* 3:1–15.

- Hughes RL, Hall LS, Tyndale-Biscoe CH, & Hinds LA. (1989) Evolutionary implication of macropodid organogenesis. In: Grigg G, Jarman P, Hume ID, editors. Kangaroos, wallabies and rat-kangaroos. Sydney: Surrey Beatty & Sons Pty. Ltd. p 377–405.
- Hughes RL & Hall LS. (1988) Structural adaptations of the newborn marsupial. In: Tyndale-Biscoe C, Janssens P, editors. The Developing Marsupial: Models for Biomedical Research. Berlin: Springer. p 8–27.
- Hunt SP, Pini A, & Evan G. (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328.
- Ishii T, Furuoka H, Kitamura N, Muroi Y, et al. (2006) The mesencephalic trigeminal sensory nucleus is involved in acquisition of active exploratory behavior induced by changing from a diet of exclusively milk formula to food pellets in mice. *Brain Res* 1111:153–161.
- Jones TE & Munger BL. (1985) Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosens Res* 3:169–84.
- Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, et al. (2012) Principles of Neural Science, Fifth Edition. McGraw-Hill Education.
- Kiehn O. (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279–306.
- Knott GW, Kitchener PD, & Saunders NR. (1999) Development of motoneurons and primary sensory afferents in the thoracic and lumbar spinal cord of the South American opossum *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:423–36.
- Kraus DB & Fadem BH. (1987) Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 37:478–482.
- Krause WJ, Cutt JH, & Leeson CR. (1978) Postnatal development of the epidermis in a marsupial, *Didelphis virginiana*. *J Anat* 125:85–99.
- Lamoureux S, Gingras J, & Cabana T. (2005) Myelinogenesis in the Brachial and Lumbosacral Enlargements of the Spinal Cord of the Opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 65:143–156.
- Langlois-Wils I & Lepresle É. (1998) Le corps humain: Étude, structure et fonction Le rôle infirmier dans la pratique clinique. De Boeck U. Bruxelles: Mosby.
- Lanthier F, Cabana T, & Pflieger J-F. (2014) c-Fos immunohistochemical study of vestibular activity in developing opossums, *Monodelphis domestica*. Program No. 780.23/B2. In: Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.

- Lavallée A & Pflieger J-F. (2009) Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: an anatomical study. *Brain Res* 1282:1–9.
- Leblond H & Cabana T. (1997) Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of development in the gray opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 386:203–16.
- Lemieux M, Cabana T, & Pflieger J-F. (2010) Distribution of the neuronal gap junction protein Connexin36 in the spinal cord enlargements of developing and adult opossums, *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 75:23–32.
- Lillegraven JA. (1974) Biological Considerations of the Marsupial-Placental Dichotomy. *Evolution (N Y)* 29:707–722.
- Lucarz A & Brand G. (2007) Current considerations about Merkel cells. *Eur J Cell Biol* 86:243–51.
- Lyne AG, Pilton PE, & Sharman GB. (1959) Œstrous Cycle, Gestation Period and Parturition in the Marsupial *Trichosurus vulpecula*. *Nature* 183:622–623.
- Lyne AG. (1974) Gestation Period and Birth in the Marsupial *Isoodon macrourus*. *Aust J Zool* 22:303–309.
- Macrini TE. (2004) *Monodelphis domestica*. *Mamm Species* 760:1–8.
- Marasco PD, Tsuruda PR, Bautista DM, Julius D, et al. (2006) Neuroanatomical evidence for segregation of nerve fibers conveying light touch and pain sensation in Eimer's organ of the mole. *PNAS* 103:9339–9344.
- McCrary E. (1938) The Embryology of the Opossum, Issue 16. *Am Anat Mem*:233.
- McCrea DA & Rybak IA. (2008) Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57:134–46.
- Merchant JC & Sharman GB. (1966) Observations on the attachment of marsupial pouch young to the teats and on the rearing of pouch young by foster-mothers of the same or different species. *Aust J Zool* 14:593–609.
- Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, et al. (2003) Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J Neurosci* 23:4054–65.
- Nelson JE & Gemmell RT. (2003) Birth in the northern quoll, *Dasyurus hallucatus* (Marsupialia : Dasyuridae). *Aust J Zool* 51:187.

- Nelson JE & Gemmell RT. (2004) Implications of Marsupial Births for an Understanding of Behavioural Development. *Int J Comp Psychol* 17:53–70.
- Nicholls JG, Stewart RR, Erulkar SD, & Saunders NR. (1990) Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained in vitro. *J Exp Biol* 152:1–15.
- Nishikawa S. (2011) Fluorescent AM1-43 and FM1-43 probes for dental sensory nerves and cells: Their labeling mechanisms and applications. *Jpn Dent Sci Rev* 47:150–156.
- Noga BR, Kettler J, & Jordan LM. (1988) Locomotion Produced in Mesencephalic Cats by Injections of Putative Transmitter Substances and Antagonists into the Medial Reticular Formation and the Pontomedullary Locomotor Strip. *J Neurosci* 8:2074–2086.
- Noga BR, Kriellaars DJ, & Jordan LM. (1991) The Effect of Selective Brainstem or Spinal Cord Lesions on Treadmill Locomotion Evoked by Stimulation of the Mesencephalic or Pontomedullary Locomotor Regions. *J Neur* 11:1691–1700.
- Pflieger J-F & Cabana T. (1996) The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat Embryol (Berl)* 194:75–88.
- Pflieger J-F, Cassidy G, & Cabana T. (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behav Brain Res* 80:137–43.
- Polakovicova S, Seidenberg H, Mikusova R, Polak S, et al. (2011) Merkel cells-review on developmental, functional and clinical aspects. *Bratisl Lek List* 112:80–87.
- Poole WE. (1975) Reproduction in the Two Species of Grey Kangaroos, *Macropus giganteus* Shaw and *M. fuliginosus* (Desmarest) II. Gestation, Parturition and Pouch Life. *Aust J Zool* 23:333–354.
- Puzzolo E & Mallamaci A. (2010) Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Dev* 5:8.
- Qin YQ, Wang XM, & Martin GF. (1993) The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 75:75–90.
- Renfree MB, Fletcher TP, Blanden D r, Lewis PR, et al. (1989) Physiological and behavioural events around the time of birth in macropodid marsupials. In: Grigg G, Jarman P, Hume ID, editors. *Kangaroos, wallabies and rat-kangaroos*. Sydney: Surrey Beatty & Sons Pty. Ltd. p 323–337.

- Reynold HC. (1952) Studies on reproduction in the opossum, *Didelphis virginiana virginiana*. Univ Calif Publ Zool 52:223–284.
- Russell EM. (1982)(a) Parental investment and desertion of young in marsupials. Am Nat 119:744–748.
- Russell EM. (1982)(b) Patterns of parental care and parental investment in marsupials. Biol Rev 57:423–486.
- Sánchez-Villagra MR, Gemballa S, Nummela S, Smith KK, et al. (2002) Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in marsupial mammals. J Morphol 251:219–38.
- Saunders NR, Adam E, Reader M, & Møllgård K. (1989) *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. Anat Embryol (Berl) 180:227–236.
- Schneider NY. (2011) The development of the olfactory organs in newly hatched monotremes and neonate marsupials. J Anat 219:229–42.
- Sharman GB & Calaby JH. (1964) Reproductive behaviour in the Red Kangaroo, *Megaleia rufa*, in captivity. CSIRO Wildl Res 9:58–85.
- Sharman GB. (1973) Adaptations of Marsupial Pouch Young for Extra-uterine Existence. In: The mammalian Fetus in vitro. Springer-V. Berlin. p 67–90.
- Smith KK. (2001) Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. J Anat 199:121–131.
- Smith KK. (2006) Craniofacial development in marsupial mammals: developmental origins of evolutionary change. Dev Dyn 235:1181–93.
- Stewart RR, Zou DJ, Treherne JM, Møllgård K, et al. (1991) The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity. J Exp Biol 161:25–41.
- Tachibana T, Fujiwara N, & Nawa T. (2000) Postnatal differentiation of Merkel cells in the rat palatine mucosa, with special reference to the timing of peripheral nerve development and the potency of cell mitosis. Anat Embryol (Berl) 202:359–67.
- Tachibana T & Nawa T. (2002) Recent progress in studies on Merkel cell biology. Anat Sci Int 77:26–33.
- Tanaka T & Narisawa Y. (2000) Three-dimensional comparative study of Merkel cell distribution in various body sites of guinea pigs and rats. Arch Dermatol Res 292:173–9.

- Tarozzo G, Peretto P, Biffo S, Varga Z, et al. (1995) Development and migration of olfactory neurones in the nervous system of the neonatal opossum. *Proc Biol Sci* 262:95–101.
- Taylor JS & Guillery RW. (1994) Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 350:109–21.
- Tsunozaki M & Bautista DM. (2009) Mammalian somatosensory mechanotransduction. *Curr Opin Neurobiol* 19:362–9.
- Tyndale-Biscoe H & Renfree M. (1987) Reproductive physiology of marsupials. Cambridge. New York: Cambridge Cambridgeshire.
- Tyndale-Biscoe H. (2005) Life of Marsupials. Collingwood: CSIRO Publishing.
- Vaglia JL & Smith KK. (2003) Early differentiation and migration of cranial neural crest in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Evol Dev* 5:121–135.
- VandeBerg JL & Robinson ES. (1997) The Laboratory Opossum (*Monodelphis Domestica*) in Laboratory Research. *ILAR J* 38:4–12.
- Veitch CE, Nelson JE, & Gemmell RT. (2000) Birth in the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula* (Marsupialia: Phalangeridae). *Aust J Zool* 48:691–700.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Ray D Le, & Robitaille R. (2000) A Cellular Mechanism for the Transformation of a Sensory Input into a Motor Command. *J Neurosci* 20:8169–8176.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, & Dubuc R. (1997) Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science* 278:1122–1125.
- Vinay L, Cazalets JR, & Clarac F. (1995) Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 7:143–51.
- Waite PME, Ho SM, & Henderson TA. (2000) Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *Eur J Neurosci* 12:2781–2792.
- Waite PME, Marotte LR, & Leamey CA. (1994) Timecourse of development of the wallaby trigeminal pathway. I. Periphery to brainstem. *J Comp Neurol* 350:75–95.
- Wang XM, Xu XM, Qin YQ, & Martin GF. (1992) The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 68:203–16.
- Woo S-H, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, et al. (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* 509:622–626.

Zimmerman A, Bai L, & Ginty DD. (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. Science (80-) 346:950–954.