

Université de Montréal

Localisation des pools de motoneurones innervant les muscles  
fléchisseurs et extenseurs des membres antérieurs et postérieurs  
chez l'opossum *Monodelphis domestica*.

par

Amélie Petrou

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences biologiques

Décembre 2005

© Amélie Petrou, 2005



Q#.

302

054

2006

V. 001

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Localisation des pools de motoneurones innervant les muscles  
fléchisseurs et extenseurs des membres antérieurs et postérieurs  
chez l'opossum *Monodelphis domestica*.

présenté par :

Amélie Petrou

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mme Annie Angers

Présidente-rapporteure

Mme Thérèse Cabana

Directrice de recherche

M. Guy Doucet

Membre du jury

## Résumé français

Nous avons étudié la localisation des pools de motoneurones innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs des membres chez l'opossum *Monodelphis domestica*, un marsupial, par traçage neuroanatomique utilisant le WGA-HRP et le PRV-152, une souche recombinée du virus de la pseudorange. Suite à des injections de traceurs dans les différents compartiments musculaires des membres, les motoneurones ont été mis en évidence par immunohistochimie en microscopie photonique. Les colonnes motrices innervant les membres antérieurs (MA) s'étendent des segments C4 à C8, alors que celles innervant les membres postérieurs (MP) occupent les segments L3 et L4. Les pools de motoneurones des muscles proximaux (bras, cuisse) sont situés plus rostralement dans les deux renflements et en position plus médiane dans la lamina IX de la corne ventrale que les pools innervant les muscles distaux (avant-bras, jambe), plus caudaux et latéraux. Les motoneurones innervant les muscles fléchisseurs occupent une position plus dorsale que ceux innervant les extenseurs. Le diamètre des motoneurones marqués indique deux populations distinctes : les motoneurones alpha et gamma. Les résultats obtenus se comparent à ceux d'autres mammifères étudiés quant à la topographie générale, mais l'étendue rostrocaudale des colonnes motrices des deux renflements est plus réduite chez l'opossum et suggère une situation plus primitive. Les résultats de cette étude serviront de base à l'interprétation d'une étude ontogénique chez cette espèce, l'opossum étant choisi comme modèle du développement moteur à cause de sa très grande immaturité à la naissance comparativement aux mammifères euthériens.

**Mot-clés :** développement, locomotion, motoneurones, traçage axonal  
neuroanatomique

## Abstract

We have investigated the location of the motoneuronal pools innervating the limb flexor and extensor muscles of opossums *Monodelphis domestica*, by using two retrograde tracers: WGA-HRP and a recombinant pseudorabies virus, PRV-152. Following injections in the different muscular compartments of the limbs, motoneurons were evidenced by immunohistochemistry in light microscopy. Motor columns innervating the forelimbs extend from segments C4 to C8, and those innervating the hindlimbs over segments L3 and L4. The motoneuron pools of proximal muscles (arm, thigh) appear more rostrally in the two enlargements and occupy a more medial portion of Rexed's lamina IX of the ventral horn than those innervating distal muscles (forearm, leg), which are more caudal and lateral. Motoneurons innervating the limb flexors tend to occupy a more dorsal position in comparison with those innervating extensor muscles. The diameter of labeled motoneurons shows two distinct populations, alpha and gamma motoneurons. These findings in opossums compare with the published data for other mammals, except that the rostrocaudal extent of the motoneuronal pools in both enlargements is more limited in the opossum, suggesting a more primitive state. The results of this study will serve as a basis for the interpretation of ontogenetic studies in this species, the opossum being chosen as a model of motor development because of its immaturity at birth compared to eutherians.

**Key words :** development, locomotion, motoneurons, neuroanatomical axon tracing

## Table des matières

Résumé français.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Listes des abréviations.....	x
Liste des annexes.....	xi
Remerciements.....	xii

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Développement moteur et modèle expérimental.....	1
1.2 Développement de l'opossum <i>Monodelphis domestica</i> .....	4
1.2.1 Développement somatique.....	5
1.2.2 Développement des comportements moteurs: locomotion spontanée et réflexes sensorimoteurs simples.....	6
1.2.3 Développement des centres nerveux moteurs.....	9
1.2.3.1 Moelle épinière.....	10
1.2.3.2 Innervation des membres.....	11
1.2.3.3 Voies propriospinales longues .....	12
1.2.3.4 Voies descendantes (encéphalospinales) et ascendantes (spinoencéphaliques).....	13
1.2.3.5 Système vestibulaire.....	15
1.2.3.6 Synaptogenèse et différenciation chimique (neurotransmetteurs).....	16
1.2.3.7 Myélogénèse.....	17
1.3 Localisation des groupes de motoneurones.....	18
1.3.1 Système musculosquelettique des mammifères quadrupèdes.....	19
1.3.1.1 Membre antérieur (MA).....	21
1.3.1.2 Membre postérieur (MP).....	21



1.3.2	Organisation anatomique de l'innervation motrice.....	23
1.3.2.1	Moelle épinière.....	23
1.3.2.2	Nerfs périphériques.....	24
1.3.2.3	Motoneurones.....	25
1.4	Techniques de marquage.....	27
1.5	Problématique.....	29
1.6	Méthodologie.....	29
1.6.1	Animaux et préparation des spécimens.....	29
1.6.2	Analyse des résultats.....	31
2.	ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL	
	Petrou A. et Cabana T. The location of the motoneurons innervating the limb flexors and extensors in the opossum, <i>Monodelphis domestica</i> . (en préparation) sera soumis à Acta Anatomica.....	55
3.	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	90
3.1	Aspect techniques.....	91
3.2	Plans d'organisations.....	92
3.3	Convergences et divergences évolutives.....	94
3.4	Perspectives.....	97
4.	BIBLIOGRAPHIE .....	99
	Annexe 1 : .....	xiii
	Annexe 2 : .....	xiv

**Liste des figures**

- Figure 1** : Photographie d'un opossum adulte.....35
- Figure 2** : Photographie d'un opossum nouveau-né.....37
- Figure 3** : Photographies d'opossums au début de chacune des quatre périodes du développement locomoteur.....39
- Figure 4** : Résumé du développement de quelques réflexes sensorimoteurs chez *M. domestica*.....41
- Figure 5** : Représentation du névraxe et de coupes transversales du BR et LS de l'opossum à P1.....43
- Figure 6** : Patron d'expression de la ChAT dans les renflements de la moelle épinière de l'opossum postnatal.....45
- Figure 7** : Représentation schématique des gradients généraux de la synaptogenèse et de la myélogénèse de l'opossum.....47
- Figure 8** : Schéma de l'ossature complète de l'opossum.....49
- Figure 9** : Schéma de l'ossature complète de l'opossum et de la musculature des MA et MP.....51
- Figure 10** : Représentation topographique des motoneurones de la corne ventrale dans la moelle épinière chez les mammifères.....53

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Résumé de l'apparition des voies motrices chez l'opossum <i>Monodelphis domestica</i> .....	33
<b>Tableau 2</b> : Résumé de l'innervation de la musculature des membres antérieurs et postérieurs de l'opossum <i>Monodelphis domestica</i> .....	34

## Liste des abréviations

ACh : acétylcholine

BR : renflement brachial

CPG : central pattern generator (générateur de motifs centraux)

FL : forelimb (membre antérieur)

HL: hindlimb (membre postérieur)

LDPP : longues voies propriospinales

LS : renflement lombosacré

MA : membres antérieurs

MP : membres postérieurs

P : jour postnatal

PB : tampon phosphate

PRV : pseudorabies virus (virus de la pseudo-rage)

VAcHT : vesicular acethylcholine transporter (transporteur vésiculaire de l'ACh)

WGA-HRP : wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase (Agglutinine du germe de blé conjugué à la peroxidase du raifort)

**Liste des annexes**

Annexe 1 : Protocole immunohistochimique anti-WGA-HRP.....	xiii
Annexe 2 : Protocole immunohistochimique anti-PRV-152.....	xiv

## Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de maîtrise, Mme Thérèse Cabana, de m'avoir si bien guidée tout au long de ce parcours. Ses précieux conseils ainsi que sa grande expérience dans le domaine de la science ont su m'éclairer à plusieurs reprises lors de l'élaboration du protocole de mon projet de recherche ainsi que dans la rédaction de mon mémoire. Elle est pour moi un modèle féminin que j'admire et respecte.

Je remercie Jean-François Pflieger, Louise Pelletier, Jean-Luc Verville, Stéphanie Lamoureux et Fabian Soza pour leurs nombreux conseils techniques et pratiques sans lesquels la réalisation de mon projet aurait été plus ardue. Je remercie Catherine Babin, Annie Lavallée, Jérôme Guay et Dominique Leboeuf, qui ont collaboré à mon projet, que ce soit dans le cadre d'un cours d'initiation à la recherche ou d'un stage d'été.

Enfin, je désire remercier tout particulièrement mon copain Narcis ainsi que ma famille pour leur appui moral et affectif tout au long de ces études. Merci pour ce soutien.

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 Développement moteur et modèle expérimental

Le système locomoteur des vertébrés a connu une évolution assez spectaculaire et a fait l'objet de nombreuses études, en particulier chez les mammifères. Chez les non-tétrapodes, la locomotion est assurée par des mouvements ondulatoires du corps. Chez les tétrapodes, l'apparition des membres a permis la sortie de l'eau et la conquête d'un nouvel environnement (Campbell et Mathieu, 1993). Le système locomoteur atteint son apogée en terme de complexité chez les mammifères, et en particulier chez l'humain, par l'apparition de la bipédie complète et la libération des membres antérieurs pour des actions complexes. On constate une évolution et une complexification en parallèle de l'appareil locomoteur et de son contrôle nerveux. C'est au système locomoteur des mammifères, plus spécifiquement son développement, à l'emplacement des circuits neuronaux impliqués et à la comparaison phylogénique entre différentes espèces animales que s'intéresse ce laboratoire.

La grande majorité des études sur les systèmes moteurs des mammifères ont été réalisées chez quelques espèces euthériennes, notamment le rat et le chat. Or, chez ces animaux, le développement des régions nerveuses motrices se produit grandement *in utero*. Cela est même vrai des espèces dites non précoces (ex; rat, voir Lakke, 1997), par comparaison aux mammifères précoces (ex : les ongulés) qui peuvent

supporter leur poids et marcher dès la naissance (Fox, 1964). L'étude exhaustive du développement du système locomoteur s'avère donc une tâche délicate et laborieuse, car il faut l'aborder *in utero* chez ces espèces animales. De plus, il n'est pas aussi facile d'étudier *in utero* le développement des comportements moteurs, d'autant plus que l'utérus impose lui-même une contrainte à l'expression de ces comportements. Pour remédier aux problèmes d'accessibilité aux stades précoces du développement moteur, nous utilisons dans le laboratoire une espèce marsupiale comme modèle expérimental, l'opossum brésilien *Monodelphis domestica* (Didelphidae). Les marsupiaux (métathériens), étant beaucoup plus immatures à la naissance que n'importe quelle espèce eutherienne, même non précoce, permettent d'étudier postatalement des stades précoces du développement du système nerveux et des comportements. Parmi les marsupiaux, certaines espèces sont encore plus immatures que d'autres à la naissance et ne présentent pas de spécialisation motrice, ce qui en fait des modèles idéaux pour l'étude de l'ontogenèse motrice. L'opossum *Monodelphis domestica* est l'une d'elles (Fadem et al., 1982; Kraus et Fadem, 1987).

L'opossum brésilien *Monodelphis domestica* adulte (Figure 1) est un petit animal recouvert d'un pelage très doux de couleur gris pâle ou foncé qui possède une queue écailleuse de longueur quelque peu inférieure au reste du corps. La femelle mesure entre 10 et 12 cm (excluant la queue) et peut peser de 60 à 120g, alors que le mâle mesure entre 10 et 15 cm et peut peser jusqu'à 150 g. L'opossum possède des yeux noirs et proéminents, presque exorbités, de grandes oreilles droites et un museau allongé garni de vibrisses. Ses dents sont nombreuses et tranchantes. Les pattes sont



munies de petites griffes leur permettant de bien grimper, même s'ils ne sont pas véritablement arboricoles, et la queue est préhensile. L'opossum est un animal nocturne ou crépusculaire, solitaire et omnivore. La longévité de l'opossum est estimée à environ 2 ans ou plus en captivité. La femelle devient sexuellement mature à 5 ou 6 mois. La période de gestation varie entre 14 et 15 jours (Mate et al., 1994) et la portée peut compter jusqu'à 10 petits ou plus. Une femelle peut produire 2 ou 3 portées par an. Contrairement aux autres espèces marsupiales, la femelle *Monodelphis domestica* ne possède pas de poche ventrale, ou marsupium, ce dernier n'étant en réalité qu'un repli cutané (recouvrant les tétines) sur le ventre de la femelle.

C'est par l'exploitation de la grande immaturité à la naissance de cette espèce marsupiale que ce laboratoire ainsi que quelques autres ont réussi à investiguer plusieurs aspects du développement somatique, comportemental et nerveux, résumés dans les sections suivantes. Nos études sur le système nerveux ont focalisé principalement sur la moelle épinière, source de l'innervation des membres, et les structures qui y sont reliées comme les voies périphériques et les voies centrales propriospinales, spinoencéphaliques et encéphalospinales. Ces études ont porté sur l'axogénèse, la synaptogénèse, la myélogénèse et, plus récemment, l'expression chimique (neurotransmetteurs). L'interprétation des résultats de ces différentes études aurait généralement gagné d'une meilleure connaissance de l'organisation des motoneurones innervant les différents muscles des membres chez cette espèce modèle. En effet, les voies centrales agissent directement ou indirectement (via les

interneurones) sur les motoneurones, qui eux-mêmes projettent leurs axones aux muscles. Ces connexions sont à la base de tout mouvement, qu'il soit volontaire ou non. Les motoneurones sont la voie finale commune de toutes les interactions des différentes afférences qu'ils reçoivent (centrales ou périphériques) (Vinay et al., 2000). C'est ainsi que, dans le cadre de l'étude ontogénique des systèmes moteurs, mon projet de maîtrise porte sur la localisation des pools de motoneurones innervant les groupes musculaires extenseurs et fléchisseurs des membres antérieurs et postérieurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Vu l'ampleur du travail exigé, mon projet a dû se limiter à l'animal adulte, l'ontogenèse devant être réservée pour une étude ultérieure.

## 1.2 Développement de l'opossum *Monodelphis domestica*

Bien que, tel que dit, je me suis consacrée à l'étude de l'opossum adulte, il est indispensable pour situer mon projet de revoir la littérature sur les systèmes moteurs adultes autant que développementaux puisque mes résultats serviront, par la suite, pour l'interprétation d'études ontogéniques. Dans cette section, le développement somatique, comportemental puis nerveux de l'opossum *Monodelphis domestica* sera décrit avant d'aborder, dans la section suivante, l'organisation du système musculosquelettique des mammifères et les motoneurones qui y sont reliés.

### 1.2.1 Développement somatique

Les observations résumées ici ont été d'abord rapportées par Cassidy et al. (1994) et corroborées lors des études subséquentes. Au jour de la naissance, jour postnatal 1 (P1), l'opossum mesure environ 10 mm de longueur, du bout du museau jusqu'à la base de la queue, et pèse environ 100 mg; il conserve une position foetale recourbée. La peau est rosée, presque entièrement transparente et glabre (Figure 2). La tête constitue quasiment le tiers de l'animal entier, avec un museau relativement gros mais sans vibrisses. La langue, bien formée à P1, permet les mouvements de succion nécessaires à la survie; aucune dent n'est visible dans la mâchoire. Les orifices des yeux et les méats auditifs ne sont pas encore ouverts; il est même impossible de discerner la délimitation des paupières et des oreilles externes. La queue est assez courte et sans écailles. Dans les deux semaines suivantes, les vibrisses commencent à croître, les pavillons des oreilles se dessinent puis se détachent du reste de la peau et la fente des paupières apparaît vers la fin de la 2<sup>e</sup> semaine. L'opossum acquiert sa coloration et son pelage définitif vers la 5<sup>e</sup> semaine, alors que s'ouvrent les yeux et les canaux de l'oreille externe. Pendant ce développement, le jeune opossum est attaché à une tétine de sa mère, dont il commence à se détacher à trois semaines et s'en sépare complètement lorsqu'il sera sevré, vers la 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> semaine de vie.

Les membres antérieurs (MA) du nouveau-né ne montrent pas extérieurement de flexures à l'épaule, au coude ou au poignet. Sur coupes histologiques, les os ne

sont que des modèles cartilagineux, le tissu musculaire forme des muscles immatures, surtout distalement, mais néanmoins d'apparence striée en microscopie photonique, et le tissu conjonctif est mésenchymateux (Barthélemy et Cabana, 2005; Martin et Mackey, 2003). Les doigts sont individualisés et se terminent par de petites griffes. Les membres postérieurs (MP) ont l'aspect de bourgeons embryonnaires dépourvus d'articulations visibles, mais l'ébauche des orteils (sans griffes) est visible. Histologiquement, ils paraissent encore plus immatures que les MA, le tissu musculaire étant lâche dans la cuisse et la jambe et absent dans les pieds, et aucune fibre musculaire n'est striée (Barthélemy et Cabana, 2005; Martin et Mackey, 2003). L'articulation de la hanche devient visible à P2-P3, celle du genou à P4-P5 et celle de la cheville vers P9, pour terminer par la séparation complète des orteils vers P14.

### 1.2.2 Développement des comportements moteurs : locomotion spontanée et réflexes sensorimoteurs simples

Pflieger et al. (1996) ont décrit le développement de la locomotion spontanée de l'opossum *Monodelphis domestica* en quatre périodes d'environ 10 jours chacune (Figure 3). Le nouveau-né exécute des mouvements rythmiques et alternés des MA de faible amplitude qui, avec un balancement latéral du tronc et des flexions des doigts, lui permettent de grimper sur le ventre de la mère, les griffes s'agrippant à la fourrure, du cloaque à une tétine, où il s'attache. Les MP et la queue, immobiles, ne participent pas à la montée contre la gravité, la mère étant effectivement assise sur l'arrière-train à la parturition. Ces mouvements rythmiques du tronc, des MA et des doigts se

poursuivent durant la première période du développement locomoteur (P1 à P10, Figure 3A), alors que l'opossum est attaché à la tétine (il y a même fusion épithéliale entre la bouche et la tétine), lui permettant de rester à proximité physique de la mère. Les MP se développent, mais restent immobiles. Si le petit est détaché de la mère durant cette période, il est incapable de supporter son propre poids et tombe sur le côté. La deuxième période du développement locomoteur (P11 à P20, Figure 3B) se caractérise par l'avènement de légers mouvements de flexions/extensions des MP, le petit toujours attaché à la mère. Les MA exécutent les mêmes mouvements qu'avant, mais avec une plus grande amplitude. Si l'opossum est détaché et placé sur une surface plane, il peut supporter son poids avec les MA mais pas avec les MP, ce qui fait qu'il pivote sur son arrière-train, mais il retombe rapidement sur le côté. Le cou de l'animal est incapable de soutenir la tête, qui tend à tomber vers l'avant. À la troisième période (P21 à P30, Figure 3C), l'opossum commence à se détacher naturellement de la mère et à se tenir debout sur les quatre pattes, indiquant un meilleur support du poids, toutefois imparfait, les MP étant placés très latéralement. Le support de la tête est meilleur, mais elle tend encore à pencher vers l'avant. Il s'ensuit une locomotion quadrupède linéaire lente et de courte durée, l'animal retombant vite sur le flanc, la coordination entre les quatre membres n'étant pas encore bien établie. Le cycle locomoteur long est dû à la durée relativement plus longue de la phase d'appui, comparée à la phase de balancement. Dans la quatrième période du développement locomoteur (P31 à P40, Figure 3D), l'opossum supporte son poids, la tête est redressée et il montre une bonne coordination entre les ceintures pectorale et pelvienne. La locomotion devient donc plus rapide, suivant un

raccourcissement de la phase d'appui, et s'observe pendant de plus longues périodes. L'ouverture des yeux se produit dans cette période, donnant ainsi à l'animal des indices visuels sur son environnement qui l'aident dans ses mouvements et facilitent la maturation des comportements locomoteurs, qui se poursuit pendant encore quelques semaines. Vers P50, l'opossum marche même très rapidement, au point que son cycle locomoteur est temporairement plus court que celui de l'adulte.

Les mouvements complexes de la locomotion peuvent être décomposés en mouvements plus simples consistant en réflexes sensorimoteurs dont l'expression au cours du développement peut être corrélée avec le développement et la maturation des centres nerveux qui les contrôlent (Fox, 1964). Un réflexe sensorimoteur est caractérisé par une réponse motrice stéréotypée spontanée et involontaire à la suite d'une stimulation sensorielle spécifique. Un réflexe impliquant un membre peut être simple (de l'ordre d'une ou de quelques synapses seulement), strictement sous contrôle spinal, ou complexe (plusieurs synapses), nécessitant même un contrôle de l'encéphale. L'étude ontogénique des réflexes sensorimoteurs chez *Monodelphis domestica* a dévoilé que leur apparition et leur maturation sont séquentielles, en fonction de leur complexité et peuvent être mises en corrélation avec les quatre périodes du développement locomoteur (Cassidy et al., 1994, Pflieger et al., 1996). La Figure 4 résume ces résultats. L'empoignement, un mouvement purement spinal utilisé par le nouveau-né pour grimper sur le ventre maternel, n'est pas considéré comme un réflexe sensorimoteur durant la 1<sup>ère</sup> période du développement locomoteur puisqu'il ne résulte pas d'une stimulation sensorielle provoquée. L'empoignement

réflexe n'apparaît qu'au début de la 2<sup>e</sup> période du développement locomoteur. Le réflexe de retrait simple, aussi purement spinal, et celui de redressement sur une surface plane, nécessitant le système vestibulaire et peut-être le cervelet, apparaissent dans les MA au moment où ceux-ci commencent à supporter le poids du corps vers la fin de la deuxième période du développement locomoteur. Le réflexe de sautillerment survient dans la 3<sup>e</sup> période. Ce n'est qu'à la 4<sup>e</sup> période du développement qu'apparaît le réflexe du placement visuel lorsque s'ouvrent les yeux, puis le redressement dans l'air, pour lequel le cervelet est indispensable. Ces réflexes sont mis au point une fois la locomotion quadrupède linéaire bien établie.

### 1.2.3 Développement des centres nerveux moteurs

Dans sa forme la plus simple, la locomotion est un mécanisme intraspinal induit par des générateurs de motifs centraux (central pattern generators - CPG) (Grillner, 1975). Ils consistent en des groupes de neurones situés rostralement dans les deux renflements de la moelle épinière qui produisent leur propre motif rythmique locomoteur (mouvements rythmiques alternés) de façon endogène, sans l'aide d'entrées périphériques ou encéphaliques, mais modulés par ceux-ci pour que la locomotion soit adaptée à l'environnement (surface lisse ou rugueuse, plane ou en pente, etc.) et à l'état de l'animal (étirement musculaire, état physiologique général, etc.). Le développement de plusieurs centres nerveux impliqués dans le contrôle moteur des mammifères a pu être étudié chez *Monodelphis domestica* par des observations histologiques et des expériences de traçage axonal et

d'immunohistochimie. Nous décrivons ces études en commençant par une brève description de la moelle épinière et de son innervation des membres, puis de la formation des longues voies propriospinales et des voies descendantes et ascendantes reliant la moelle épinière et l'encéphale, la synaptogenèse et l'apparition des neurotransmetteurs dans les renflements de la moelle et, enfin, la myélogénèse périphérique et spinale.

### 1.2.3.1 Moelle épinière

La moelle épinière du nouveau-né est très immature (Figure 5A). Retirée de la colonne vertébrale, elle mesure environ 0.85 cm de long (~9 cm chez l'adulte) et son diamètre fait 0.65 mm au niveau brachial (3.3 mm chez l'adulte) et 0.50 mm au niveau lombosacré (3.2 mm chez l'adulte). Sur coupes transversales colorées au crésyl violet, elle est caractérisée par un grand canal épendymaire allongé dorsoventralement et bordé par une épaisse zone ventriculaire comprenant des figures mitotiques (davantage visibles en microscopie électronique; Gingras et Cabana, 1999), plus particulièrement au niveau lombosacré, elle-même entourée d'une zone intermédiaire (matière grise présumptive) puis d'une mince zone marginale (matière blanche présumptive) (Figure 5B et C). La forme ovoïde et fusiforme de nombreuses cellules des zones ventriculaire et intermédiaire suggère qu'elles sont en activité de migration vers leur position définitive. Les autres cellules de la zone intermédiaire sont sphériques et petites (4-5  $\mu\text{m}$  de diamètre), non différenciées. Les motoneurons présumptifs se reconnaissent néanmoins par leur position dans la corne ventrale, leur



diamètre légèrement plus gros et leur contenu en acétylcholine, leur neurotransmetteur, lorsque mis en évidence par immunohistochimie (ChAT : choline acétyltransférase, enzyme de synthèse de l'acétylcholine; Barthélemy et Cabana, 2005 – Figure 6). Dans les semaines suivantes, le canal central rapetisse et devient circulaire, la zone ventriculaire s'amincit alors que les zones intermédiaire et marginale s'épaississent (Gingras et Cabana, 1999). C'est vers P20 que la zone ventriculaire est réduite à une seule assise cellulaire nommée épithélium épendymaire. L'absence d'acétylcholine dans la zone ventriculaire et l'augmentation postnatale du nombre de neurones cholinergiques suggèrent que les motoneurons n'acquièrent leur phénotype cholinergique qu'une fois la migration terminée (Figure 6).

#### 1.2.3.2 Innervation des membres

En considérant l'immaturation de la moelle épinière et des membres, surtout le renflement lombosacré et les MP, chez l'opossum naissant, l'on pourrait poser comme hypothèse que certaines fibres motrices et sensorielles ne croissent dans les membres que postnatalement. En dévoilant la protéine de transport de l'acétylcholine nouvellement synthétisée, le transporteur vésiculaire ACh (VAcChT), par immunohistochimie en microscopie photonique, Barthélemy et Cabana (2001, 2005) ont démontré que, effectivement, l'innervation motrice des membres, même des MA, se produit en grande partie postnatalement. Suivant le peu de marquage VAcChT-positif observé dans les muscles des membres à la naissance et peu après, celui-ci

augmente considérablement entre la 2<sup>e</sup> et la 4<sup>e</sup> semaine. Comme on peut s'y attendre, le développement de ce marquage suit de près le développement histologique des muscles, soit les gradients antéro-postérieur (MA avant MP) et, dans chaque membre, proximodistal, sans différence temporelle apparente entre les muscles fléchisseurs et extenseurs d'un même segment. De plus, il a été possible d'établir une corrélation entre le développement de l'innervation motrice des membres et l'apparition du marquage ChAT dans les motoneurones, la grosseur de ces derniers, leur nombre et l'intensité de leur marquage augmentant en parallèle avec l'augmentation du marquage VACHT dans les membres. Pour l'innervation sensorielle, seule la croissance des afférences primaires dans la moelle thoracique et lombaire a été étudiée, par Knott et al. (1999), mais pas celle des muscles des membres. Ainsi, les racines dorsales commencent à pénétrer dans la moelle au stade prénatal, mais le gros de l'innervation de la matière grise spinale se déroule postnatalement et sur une longue période. En gros, ces résultats sur l'innervation motrice et sensorielle concordent avec le déroulement des réflexes et de la locomotion.

### 1.2.3.3 Voies propriospinales longues

Chez les mammifères, il existe de longues voies propriospinales descendantes (LDPP) reliant les segments cervicaux aux segments lombosacrés, créant un lien entre les renflements de même qu'entre les segments cervicaux supérieurs et les deux renflements. Elles coordonnent les mouvements de la tête, du tronc et des membres antérieurs et postérieurs durant la locomotion (Grillner, 1975; Miller, 1970). Leur

développement postnatal chez l'opossum a été étudié par traçage axonal par Cassidy et Cabana (1993). Il n'a pas été surprenant, ici encore, de constater la formation majoritairement postnatale des LDPP (Tableau 1). Les premiers axones cervicaux présents dans le LS (P1) proviennent de neurones des laminae présomptives VII et VIII du renflement brachial, principale source des LDPP chez l'animal adulte. Dans les deux semaines suivantes, ces projections augmentent, auxquelles s'ajoutent celles provenant des laminae IV-IV et IX-X du renflement puis, un peu plus tardivement, les projections des segments cervicaux plus rostraux. Le patron général adulte des LDPP est atteint vers P17, âge où apparaissent les réflexes médiés par elles, comme le retrait croisé long.

#### 1.2.3.4 Voies descendantes (encéphalospinales) et ascendantes (spinoencéphaliques)

Le gros de l'encéphale se développe plus tardivement que la moelle épinière. Il est donc logique de penser que les voies qui les relient, tant descendantes qu'ascendantes, se forment grandement postnatalement, après le LDPP et sur une période plus longue. Les résultats des diverses investigations utilisant le traçage axonal sont résumés au Tableau 1. Brièvement, les projections du raphé et de la formation réticulée médiane médullaire sont présentes dans la moelle cervicale à P1 et, de façon beaucoup plus modeste, dans la moelle lombosacrée (Desrosiers, 1995; Pflieger et Cabana, 1996), mais les voies encéphalospinales se développent principalement dans les trois premières semaines et selon un gradient général proximodistal (voies d'origine médullaire, puis pontique et mésencéphalique)

(Desrosiers, 1995; Wang et al., 1992). Chez l'opossum *Monodelphis domestica*, les neurones corticaux ne projettent pas d'axones à moelle épinière (Nudo et Masterton, 1990). Ceux-ci s'arrêtent tous à C1 sans pénétrer dans la matière grise (Cabana et al., 1992). Le cortex n'exerce donc pas de contrôle direct sur la moelle, mais module la locomotion de façon indirecte, via ses connexions avec les structures céphaliques sous corticales qui projettent leurs axones à la moelle épinière. Ces voies corticobulbaires s'établissent après la naissance (Cabana et al., 1992), le cortex cérébral connaissant le développement le plus tardif du névraxe (Balslev et al., 1992).

Afin de moduler adéquatement les centres locomoteurs spinaux chez les mammifères, l'encéphale doit recevoir des données le renseignant sur l'activité de la moelle et sur l'environnement. Les informations sensorielles sont apportées par les afférences primaires qui innervent la moelle et qui montent à l'encéphale via le système des cordons dorsaux (funicules gracilis et cunéatus) ou, indirectement, via le funicule latéral comprenant les voies spino-olivaires, spinoréticulaires, spinothalamiques et spinocérébelleuses (Kandel et al., 2000). Les projections du niveau lombosacré atteignent l'encéphale postnatalement chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Tableau 1), à partir de P3, et selon un gradient caudo-rostral (de la formation réticulée médullaire au thalamus) (Desrosiers, 1995; Qin et al., 1993). Les projections spinothalamiques directes sont très peu abondantes, en lien avec l'absence de connexions corticospinales directes. Desrosiers (1995) a rapporté un décalage de quelques jours dans la formation du fasciculus gracilis sur celle du fasciculus cunéatus.

### 1.2.3.5 Système vestibulaire

Le système vestibulaire, comprenant le labyrinthe vestibulaire de l'oreille interne, les noyaux du complexe vestibulaire du tronc cérébral et, de façon plus large, des centres de niveaux supérieurs dans le thalamus, le cervelet et le cortex, exerce une grande influence sur la posture et l'équilibre, tant au repos qu'en mouvement (Wilson et Melvill-Jones, 1979). À la naissance, les mouvements du cou, du tronc et des MA de l'opossum, exercés contre la gravité pour atteindre une tétine, sont vraisemblablement guidés par des indices sensoriels provenant du système vestibulaire. Le labyrinthe vestibulaire est composé de l'utricule et du saccule, tous deux percevant l'accélération linéaire, et des canaux semi-circulaires, qui perçoivent l'accélération angulaire. Les afférences primaires du labyrinthe vestibulaire composent la portion vestibulaire du nerf VIII. Des quatre noyaux principaux du complexe vestibulaire : supérieur, médian, latéral et inférieur, le noyau latéral ne reçoit pas d'afférences vestibulaires primaires. Les noyaux médian, latéral et inférieur sont reliés à la moelle, où leurs influences sont rapides et directes. Pflieger et Cabana (1996) ont démontré que l'utricule, qui perçoit l'accélération linéaire, est la seule composante du labyrinthe possédant une macule à la naissance, le saccule (accélération linéaire) et les canaux semi-circulaires (accélération angulaire) en étant dépourvus et présentant même des figures mitotiques. Par traçage axonal, il a été possible d'identifier à la naissance les branches ascendante et descendante du nerf vestibulaire (nerf VIII) se distribuant aux quatre noyaux du complexe vestibulaire. Cependant, seul le noyau vestibulaire latéral est facilement identifiable sur coupes

histologiques, et rappelons qu'il est le premier à projeter ses axones à la moelle. Vu la grande immaturité du labyrinthe, il se peut que seul l'utricule soit fonctionnellement connecté aux noyaux vestibulaires et exerce un contrôle spinal, via le noyau vestibulaire latéral, permettant au nouveau-né de s'orienter contre la gravité à la parturition.

#### 1.2.3.6 Synaptogenèse et différenciation chimique (neurotransmetteurs)

Malgré la corrélation entre la formation des voies nerveuses et l'avènement des réflexes et comportements locomoteurs que les études ci-dessus ont rapportée, il existe indéniablement un certain décalage entre le développement comportemental et le développement nerveux. La croissance axonale ne suffit pas à établir totalement les systèmes de contrôle moteur : les centres moteurs doivent être fonctionnellement connectés entre eux par la synaptogenèse. Celle-ci a été étudiée chez l'opossum en mettant en évidence par immunohistochimie la synaptophysine, une protéine de la membrane des vésicules synaptiques, ainsi que la synaptotagmine et la SNAP-25, deux protéines de la membrane pré-synaptique. Gingras et Cabana (1999) ont démontré que la synaptogenèse se produit en très grande partie postnatalement dans les deux renflements spinaux; la période la plus intense se déroulant entre la 3<sup>e</sup> et la 5<sup>e</sup> semaine. Outre le gradient rostrocaudal évident, la synaptogenèse dans la moelle obéit à des gradients généraux ventrodorsal et latéromédian (Figure 7), correspondant, avec un léger décalage, à la croissance dans la moelle des principales voies motrices étudiées précédemment (Tableau 1).

Encore faut-il que les synapses soient fonctionnelles et que les principaux neurotransmetteurs connus pour être impliqués dans le contrôle moteur spinal chez les mammifères y soient présents. Par immunohistochimie, Soza et al. (2002, 2003) ont démontré que le glutamate (GLU), un acide aminé excitateur ayant un rôle dans la locomotion, de même que le GABA et la glycine, des acides aminés reconnus comme inhibiteurs réciproques des motoneurones prévenant la co-contraction de muscles antagonistes (Cowley et Schmidt, 1995), sont présents dans la moelle dès P1. Ce marquage serait présent dans les fibres propriospinales et vestibulospinales avant même qu'elles aient établi des contacts synaptiques dans la moelle. Les trois acides aminés sont exprimés dans la matière grise selon des gradients généraux rostrocaudal, ventrodorsal et proximodistal et augmentent jusque vers la 2<sup>e</sup> semaine, avant de diminuer graduellement pour atteindre le patron adulte vers P42.

#### 1.2.3.7 Myélogénèse

La synaptogenèse suivant l'axogenèse, elle est mieux corrélée avec l'apparition des réflexes et le début de la locomotion, mais tout de même imparfaitement. En effet, le raffinement de la vitesse et de la précision des mouvements locomoteurs dépend d'un événement encore plus tardif dans la formation du système nerveux : la myélogénèse. La myélogénèse a été étudiée dans les renflements spinaux de l'opossum par la mise en évidence immunohistochimique des protéines de la myéline centrale, la protéine basique de la myéline (myelin basic protein - MBP) et la protéine protéolipidique (PLP) (Lamoureux et al., 2005), et dans

les racines ventrales et dorsales correspondantes par des préparations à l'osmium observées en microscopie photonique (Leblond et Cabana, 1997). La myélinisation, tant centrale que périphérique, ne commence qu'à la fin de la 2<sup>e</sup> semaine et s'étend sur plusieurs semaines, obéissant à trois gradients généraux; rostrocaudal, ventrodorsal et, pour la moelle, latéromédian (Figure 7). La myélinisation périphérique présente un léger retard sur la centrale. On note un plus grand nombre de fibres myélinisées dans les racines lombosacrées que cervicales, cette observation pouvant être expliquée par le plus grand nombre de fibres nécessaires pour innerver la masse musculaire plus imposante des MP et, chez l'adulte, un nombre de fibres myélinisées plus important chez le mâle que chez la femelle, en lien avec la plus grande taille du mâle (Leblond et Cabana, 1996).

### 1.3 Localisation des groupes de motoneurones

Les sections précédentes ont montré un gradient général de développement rostrocaudal, tant pour les membres que pour la moelle épinière, superposé à des séquences généralement ventrodorsale et latéromédiale pour la moelle épinière, quoique le terme «outside-in» (de la périphérie vers le centre) décrit mieux la réalité de plusieurs des événements étudiés. On a vu que, du moins temporellement, les divers aspects du développement neural peuvent être corrélés à des événements comportementaux. Les interprétations des diverses études rapportées demeurent limitées par le fait que l'on ne connaît pas, chez l'opossum adulte comme nouveau-né, l'emplacement spécifique des différents groupements ou «pools» des



motoneurones innervant les différents groupes musculaires des membres, comme c'est le cas des espèces euthériennes couramment utilisées pour l'investigation motrice (ex, rat : Nicolopoulos-Stournaras, 1983, chat : Romanes, 1951, 1964). Ainsi, la détermination de la localisation des pools de motoneurones s'impose chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Pour bien situer ce travail, nous allons dans cette section traiter d'abord du système musculoquelettique des membres des mammifères et, ensuite, de l'organisation anatomique centrale et périphérique de l'innervation motrice des motoneurones chez les mammifères déjà étudiés. Nous terminerons avec les techniques de marquage utilisées dans ce travail pour repérer les pools de motoneurones chez *Monodelphis domestica*.

### 1.3.1 Système musculosquelettique des mammifères quadrupèdes

Les membres sont dotés d'articulations qui fonctionnent à la façon de charnières. Les muscles striés squelettiques s'attachent aux os à leurs deux extrémités par des tendons de tissu conjonctif riches en collagène. Le point d'attache proximal du muscle, par rapport au tronc, est appelé l'origine et le distal, l'insertion. Les muscles doivent prendre attache sur deux os différents et ainsi recouvrir une articulation pour faire bouger les différents segments du squelette (Figures 8 et 9).

Un muscle peut être défini de façon morphologique (embryologique), fonctionnelle ou anatomique. Un muscle est soit un fléchisseur morphologique soit un extenseur morphologique selon qu'il se trouve sur la face ventrale ou dorsale du

membre chez l'embryon. Cependant, les positions relatives ventrale et dorsale peuvent devenir significativement modifiées au cours du développement si bien que les fléchisseurs peuvent être médians et les extenseurs latéraux chez l'adulte. Du point de vue fonctionnel durant la locomotion, un muscle est soit fléchisseur soit extenseur selon qu'il se contracte (activation) pendant les différentes phases de flexion ou d'extension des membres (initialement décrit par Sherrington, 1910). Pour cette étude, la définition anatomique sera celle décrite par Crouch et Lackey (1969) chez le chat, et par Greene (1974) et Hebel et Stromberg (1986) chez le rat. Les fléchisseurs sont les muscles responsables de la fermeture d'une articulation alors que les extenseurs sont responsables de son ouverture (Figure 8B et C). Il existe aussi d'autres types de muscles : adducteurs servant à rapprocher les membres vers le corps, abducteurs servant à les éloigner, rotateurs internes ou externes permettant la rotation des membres sur leur axe longitudinal. Les muscles sont recouverts et liés entre eux par des feuillettes de tissu conjonctif appelés fascia.

La très grande immaturité des membres des jeunes opossums rendant impossible l'identification des muscles individuels (voir Barthélemy et Cabana, 2005 et Martin et Mackey, 2003), on pense qu'il sera possible de les injecter tôt dans la vie postnatale, surtout pour les MP. Ainsi, dans la présente étude chez l'adulte, comme il sera fait chez les animaux en développement, les groupes fonctionnels par fléchisseurs ou extenseurs des principaux segments des MA et MP seront étudiés. Les os et les muscles des membres sont représentés aux Figures 8 et 9 pour l'opossum

*Didelphis virginiana* (Ellsworth, 1976), dont on peut présumer que l'anatomie se compare à celle de *Monodelphis*.

#### 1.3.1.1 Membre antérieur (MA)

Dans le MA (Figure 8B) les os humérus (bras), radius et ulna (avant-bras), carpes (poignet), métacarpes (5, main) et phalanges (14, doigts) se comparent à ceux des autres mammifères quadrupèdes. La musculature du bras (Figure 9A), qui assure la flexion du coude, comprend la longue et la courte portion du *biceps brachii* et celle qui en assure l'extension est formée de la longue et de la courte portion du *triceps brachii*. Dans l'avant-bras, les muscles assurant la flexion du poignet et des doigts sont les *flexor carpi ulnaris* et *flexor digitorum profundus* tandis que les extenseurs du poignet sont les *brachioradialis*, *extensor carpi ulnaris* et *extensor digitorum communis*. Les muscles interosseux de la main, situés entre les métacarpes, permettent l'abduction et l'adduction des doigts ainsi que l'élaboration de mouvements fins et précis.

#### 1.3.1.2. Membre postérieur (MP)

Les os constituant le membre postérieur (Figure 8C) sont le fémur (cuisse), le tibia, la fibula ou le péroné (jambe) et les os du tarse (cheville), 5 métatarses (pied) ainsi que des 14 phalanges (orteils). Les groupes musculaires de la cuisse (Figure 9B) qui entraînent une flexion du genou sont les *semitendinosus*, *semimembranosus* et

*biceps femoris*, le muscle de l'ischiojambier et ceux entraînant son extension sont les *quadratus femoris*, comprenant le *rectus femoris*, *vastus lateralis* et *vastus medialis*. Les mouvements de l'articulation de la cheville, se faisant par l'intermédiaire de la musculature de la jambe, peuvent subir des flexions par les muscles *tibialis anterior* et *tibialis posterior* et des extensions par les muscles *gastrocnemius lateralis* et *medialis*, *soleus* et *plantaris*, tous des muscles du triceps sural. Il existe aussi des muscles intrinsèques du pied, permettant l'extension, et des muscles interosseux de part et d'autres des métatarses pour la motilité des orteils.

Les groupes musculaires mentionnés permettent les comportements locomoteurs, avec ses phases d'appui et de balancement, et toutes les variations imposées par le milieu (substrat en pente, obstacles, etc.). Les MP sont beaucoup plus importants que les MA pour la locomotion chez la grande majorité des mammifères quadrupèdes, incluant l'opossum *Monodelphis domestica*, à cause de leur force nécessaire pour propulser le corps. Ils sont d'ailleurs plus gros, avec une masse musculaire plus importante et une plus grande quantité de fibres nerveuses les innervent. Par conséquent, la quantité de neurones moteurs les innervant pourrait être plus importante que celle innervant les MA.

## 1.3.2 Organisation anatomique de l'innervation motrice

### 1.3.2.1 Moelle épinière

La moelle épinière des mammifères est subdivisée en six régions axiales, comprenant chacune plusieurs segments : cervicale supérieure (C1 à C4), renflement brachial (BR : C5 à T1), thoracique et lombaire supérieure (T1 à T12; L1 et L2), renflement lombosacré (LS : L3 à S2), sacrée (S3 à S5) et coccygienne (Co1 à Co5). On verra toutefois que cette subdivision vaut davantage chez les mammifères supérieurs et qu'il y a des différences interspécifiques dans l'importance des deux renflements. Les corps cellulaires des motoneurones sont localisés dans la lamina IX de la corne ventrale. Plus spécifiquement, les motoneurones innervant les membres, chez les mammifères étudiés (rat: Goering, 1928; Browne 1950; Nicolopoulos-Stourmaras and Iles, 1983; Swett et al., 1986; McKenna et al., 2000, lapin: de Neef, 1900; Romanes, 1941; Portal et al., 1991, chien: de Neff, 1900, chat: Kiesel, 1938; Romanes, 1951, 1964; Swett et al., 1970, macaque: Reed, 1940, et humain : Bear et al., 1996; Elliot, 1944), sont regroupés en « pools » ou noyaux moteurs formant des colonnes longitudinales plus ou moins longues dans les deux renflements. Il existe cependant une certaine variabilité dans l'emplacement des colonnes motrices dans la corne ventrale chez les différents mammifères. Les rongeurs possèdent une organisation topographique des noyaux moteurs sans toutefois être aussi marquée que celle des carnivores (chats, chiens) ou des primates (macaques), qui possèdent un patron d'organisation complexe qui peut s'homologuer à celui de l'homme. Les

colonnes motrices innervant la musculature fine des mains et des pieds sont mieux organisées chez les espèces qui nécessitent et requièrent des mouvements plus complexes. Les motoneurones innervant les muscles proximaux (épaule et bras, hanche et cuisse) des membres sont, de manière générale, situés plus rostralement dans les renflements que ceux innervant les muscles plus distaux (avant-bras et main, jambe et pied). L'organisation spatiale des motoneurones suit aussi un motif médiolatéral, en ce que les neurones innervant la musculature proximale se retrouvent plus médialement dans la corne ventrale que ceux qui innervent la musculature distale, localisés plus latéralement. Les motoneurones innervant les fléchisseurs morphologiques, muscles dérivés de la masse musculaire ventrale de l'embryon, occupent une position plus médiane, alors que les extenseurs morphologiques, dérivant de la masse musculaire dorsale de l'embryon, sont surtout observés plus latéralement. Cette organisation somatotopique des motoneurones spinaux est représentée à la Figure 10.

### 1.3.2.2 Nerfs périphériques

L'innervation périphérique des membres décrite ici et résumée au Tableau 2 est celle, complexe, chez l'humain (Bear et al., 1996; Nguyen, 1994). Les nerfs innervant le MA, provenant des segments C4 à T1, forment à la sortie de la moelle épinière le plexus brachial, duquel émergent les nerfs se dirigeant aux différents muscles ou groupes de muscles. Les muscles fléchisseurs du coude et/ou de l'épaule (ex : *biceps brachii*) sont principalement desservis par le nerf musculocutané C5-C7,

les muscles extenseurs du bras (ex : *triceps brachii*) par le nerf radial (C6-T1) et les muscles les plus distaux, plusieurs muscles fléchisseurs du poignet et des doigts (ex : *flexor digitorum profundus*) en plus des muscles intrinsèques de la main, par le nerf médian (C7-T1).

Les nerfs innervant les MP, provenant des segments L3 à S2, forment le plexus lombosacré, duquel se forment cinq principaux nerfs. Le nerf fémoral (L2-L4) innerve surtout les muscles fléchisseurs de la hanche et extenseurs du genou (ex : *rectus femoris*), le nerf obturateur (L2-L4) innerve plutôt les muscles adducteurs de la hanche, le sciatique (L4-L6) innerve les muscles pelviens profonds et se divise en deux branches majeures environ au tiers inférieur de la cuisse pour donner le nerf péronier commun qui innerve les muscles abducteurs du pied, fléchisseurs du pied (ex : *tibialis anterior*) et extenseurs des orteils (ex : *extensor digitorum longus*) et le nerf tibial est responsable de l'innervation des muscles de l'ischio-jambier, sauf pour la portion antérieure du *biceps femoris*, rôle joué par le péronier commun. Le tibial innerve aussi les extenseurs de la cheville (ex : *gastrocnemius*) et quelques muscles intrinsèques du pied.

### 1.3.2.3 Motoneurones

Le motoneurone est une cellule nerveuse typique possédant un gros corps cellulaire multipolaire (étoilé), un noyau pâle distinctif par un ou deux nucléoles ronds et foncés et un axone myélinisé. À son extrémité, l'axone moteur perd sa gaine

de myéline et forme une arborisation terminale dont chaque branche finit en un aplatissement qui contacte une fibre musculaire pour former la jonction neuromusculaire. Deux types de neurones moteurs sont décrits: les motoneurones alpha ( $\alpha$ ), grosses cellules ayant, chez l'humain, un diamètre de 30 à 70  $\mu\text{m}$ , et les motoneurones gamma ( $\gamma$ ), cellules plus petites ayant un diamètre de 15-30  $\mu\text{m}$  (Bear et al., 1996). La taille des motoneurones est moindre chez l'opossum (Barthélemy et Cabana, 2005), et l'on sait que les motoneurones  $\alpha$  possèdent des axones myélinisés de diamètre allant de 9 à 20  $\mu\text{m}$  tandis que le diamètre des axones myélinisés des motoneurones  $\gamma$  va de 3 à 8  $\mu\text{m}$  (Leblond et Cabana, 1996). Les motoneurones  $\alpha$  se subdivisent eux-mêmes en motoneurones phasiques innervant les fibres musculaires à contraction rapide et en motoneurones toniques innervant les fibres musculaires à contraction lente. Ils contrôlent donc le mouvement et le tonus musculaire (Meyer, 1983). Les terminaisons axonales des motoneurones  $\gamma$  n'innervent que les fibres intrafusales des récepteurs sensitifs du muscle (comme pour le fuseau neuromusculaire). En somme, les motoneurones  $\alpha$  sont impliqués dans la commande motrice alors que les motoneurones  $\gamma$  régulent la tension du muscle (Guénard, 1996). L'ensemble d'un motoneurone  $\alpha$ , de son axone et des fibres musculaires qu'il innerve porte le nom d'unité motrice (Sherrington, 1910). C'est l'unité de base de l'organisation du contrôle moteur et la contraction musculaire résulte de l'action des unités motrices. Tel que déjà mentionné, l'ensemble des neurones moteurs innervant un muscle ou un groupe de muscles forme une population ou un « pool ».



Les neurones moteurs les plus volumineux ont plusieurs embranchements dendritiques (de 1 à 2 mm de longueur) principalement orientés dans l'axe rostrocaudal de la moelle épinière. Les dendrites reçoivent les afférences de plusieurs autres cellules, comme les afférences primaires, les cellules de Renshaw (interneurones dans la corne ventrale), les neurones propriospinaux courts et longs et les neurones des centres supraspinaux (Kandel et al., 2000).

#### 1.4 Techniques de marquage

Bien que des marqueurs moléculaires spécifiques aux principales colonnes motrices ont été développés récemment chez la souris (Dasen et al., 2005), le traçage neuroanatomique rétrograde, qui fait appel à une propriété intrinsèque de la cellule nerveuse, le transport axonal, est le plus indiqué pour localiser les motoneurones des différents groupes musculaires des membres chez une espèce comme l'opossum dont on ne connaît encore rien de l'organisation des motoneurones. Le traçage axonal consiste à injecter un traceur dans le compartiment musculaire étudié, traceur qui sera capté par les terminaisons des axones présents dans le muscle et qui sera transporté de façon rétrograde jusqu'aux corps cellulaires dans la moelle épinière. Le traceur sera rendu visible sur des coupes de moelle en microscopie photonique grâce à des réactions histochimiques ou par immunohistochimie. Les traceurs transportés de façon rétrograde, via les molécules de transport de l'axone (dynéines), peuvent être des lectines (germe de blé), des toxines (tétanos) et aussi certains virus (type herpes, pseudo-rage).

Nous avons utilisé une lectine, l'agglutinine du germe de blé - WGA, conjuguée à une enzyme, la peroxydase du raifort - HRP, qui se prête au traçage autant dans le système nerveux central périphérique (LaVail et LaVail, 1974). La vitesse de transport du WGA-HRP se situe entre 100 et 200 mm/jours. On estime donc le temps de survie nécessaire entre l'injection et le sacrifice chez l'opossum adulte à 2 à 3 jours, ce qui est assez court pour empêcher la dégradation du produit lorsque acheminé au corps cellulaire et stocké dans les lysosomes.

Nous avons aussi utilisé une souche recombinante du virus de la pseudo-rage (PRV-152) qui se prête particulièrement bien aux injections intramusculaires (ce qui n'est pas le cas pour tous les traceurs neuroanatomiques employés dans le système nerveux central). Le temps d'incubation du virus est de 24 à 48 heures, un temps de survie post-opératoire raisonnable. Ce traceur s'observe en fluorescence et ses fluorochromes sont beaucoup moins sensibles à l'altération par la lumière que ne le sont des traceurs fluorescents comme le Fluororuby, le True Blue, le Fast Blue et le Fluorogold, couramment employés par certains chercheurs, et ils permettent un temps d'analyse plus long (Wiley and Sons, 1982). Toutefois, contrairement au WGA-HRP, le PRV-152 peut se répliquer dans les neurones et traverser les synapses (Card et Enquist, 1995). Il faut donc garder le temps minimal de survie pour éviter un marquage transynaptique qui embrouillerait l'interprétation des résultats. Les deux traceurs peuvent être utilisés dans un même animal pour marquer plus d'un groupe musculaire, diminuant ainsi le nombre d'animaux nécessaires aux expériences.

## 1.5 Problématique

Comme il a été dit plus tôt, ce projet porte sur la localisation des pools de motoneurones innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs des membres chez l'opossum *Monodelphis domestica*, notre modèle expérimental. Les motoneurones, responsables d'acheminer les commandes motrices sont la voie commune finale de toutes interactions des différentes convergences sur eux. La connaissance de leur localisation dans la moelle épinière mènera à une interprétation plus fine des études déjà acquises au laboratoire sur la synaptogenèse, l'innervation des membres et l'apparition des neurotransmetteurs, de même que des études à venir. Elle permettra une meilleure corrélation entre les groupes de motoneurones innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs et l'apparition des premiers comportements locomoteurs de l'opossum, incluant les réflexes sensorimoteurs. De plus, la description de l'emplacement des colonnes motrices chez une espèce marsupiale constituera une première et amènera une nouvelle perspective évolutive.

## 1.6 Méthodologie

### 1.6.1 Animaux et préparation des spécimens

Au total, 24 opossums adultes femelles et 3 mâles ont été utilisés. Les opossums ont d'abord été anesthésiés profondément par inhalation d'isoflurane (3%) et d'oxygène (100%) à un débit de 0.8 l/min. Une dose maximale de buprénorphine

(0.01 mg/kg) à une concentration de 0.3mg/ml et de carbocaïne (2mg/kg à 2%) a été administrée pour contrer la douleur. Une fois l'animal endormi, la peau et le fascia recouvrant le groupe musculaire visé ont été incisés pour exposer le muscle et des injections intramusculaires de traceur ont été faites à l'aide de seringues Hamilton de 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l et 25 $\mu$ l (seringues ayant une aiguille de diamètre de taille 26, à extrémité plate et munies d'une pipette de verre, sauf celle de 25 $\mu$ l dont l'aiguille est en forme de biseau). Des injections multiples (8 à 17, selon la taille du compartiment musculaire injecté) de 0.1 à 0.2 $\mu$ l de l'un ou l'autre traceur ont été effectuées dans le groupe musculaire, principalement dans le ventre du muscle. Le fascia et la peau ont ensuite été refermés par des points de suture. Les injections de PRV-152 ont été réalisées sous une hotte biologique de confinement 2 et les animaux injectés ont été maintenus dans une cage à bonnet filtre sous la hotte jusqu'au sacrifice.

Les opossums ont été euthanasiés par injection intrapéritonéale d'une surdose de pentobarbital de sodium et perfusés par voie intracardiaque avec une solution de saline 0.9% suivie d'une solution de fixateur constituée de 4% paraformaldéhyde dans un tampon phosphate (phosphate buffer), pour les animaux ayant reçu le WGA-HRP et de 4% paraformaldéhyde, 1.4% l-lysine, 0.2% sodium m-périodate/PB 0.1M pour ceux injectés au PRV. Le PB consiste en un mélange de phosphate de potassium monobasique [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] et de sodium phosphate dibasique anhydreux [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>], à 0.1M (pH 7.35). Une laminectomie a ensuite été effectuée sous le microscope à dissection et la moelle a été prélevée puis tranchée en segments comprenant les renflements, qui ont été baignés dans leur fixateur respectif pendant 2 à 24 heures à

4°C. Les morceaux de tissu ont ensuite été transférés dans une solution cryoprotectrice de 30% sucrose/PB 0.1M, pH 7.35 à 4°C de 24 à 48 heures. Les morceaux ont ensuite été enrobés dans le composé d'O.C.T. (tissue Tek) puis congelés par immersion dans le 2-méthylbutane pour ensuite être conservés à -80°C jusqu'à la cryosection. Les blocs ont été sectionnés transversalement (25µm) à l'aide d'un cryostat. Les muscles injectés ont aussi été prélevés et préparés pour obtenir des coupes transversales de 25µm au cryostat afin de déterminer l'étendue de la diffusion des traceurs aux sites d'injections. Les coupes de moelle ou de muscle ont été montées sur des lames de verre de type Superfrost pour les expériences utilisant le WGA-HRP et sur des lames de verre gélatinées pour les expériences avec le PRV-152. Elles ont été entreposées au congélateur pendant une nuit avant la révélation immunohistochimique du WGA-HRP (Gong et LeDoux, 2003) ou du PRV-152 (Billig et al., 2000; 2001). Les protocoles immunohistochimiques pour les deux traceurs sont fournis en Annexes 1 et 2.

### 1.6.2 Analyse des résultats

Les coupes traitées en immunohistochimie pour révéler le WGA-HRP ont été observées à l'aide d'un microscope photonique Leitz Diaplan pour détecter la réaction de la peroxidase (oxidée par le chromogène diaminobenzidine ou DAB rajouté à l'enzyme qui se manifeste par la présence de granules brunâtres dans les corps cellulaires des motoneurones. Les coupes traitées pour dévoiler le PRV-152 ont été examinées en fluorescence avec le même microscope muni d'un filtre de 450-490

nm pour visualiser la fluorescence jaune du marquage. Les motoneurones marqués ont ainsi pu être comptés et leur diamètre mesuré à l'aide d'un oculaire gradué et d'une lame millimétrique. Les coupes de moelle épinière ont été dessinées à l'aide d'une caméra lucida pour y enregistrer la position des motoneurones marqués et des photomicrographies ont été prises à l'aide d'une caméra numérique Canon-Rebel digital EOS ou d'une caméra Wild Leitz 35mm incorporée au microscope photonique.

**Tableau 1 : APPARITION DES VOIES MOTRICES CHEZ L'OPOSSUM  
MONODELPHIS DOMESTICA**

Voies		Age (jour postnatal)
Origine	Terminaison	
Longues voies propriospinales <sup>1</sup>		
Segments cervicaux	Renflement brachial	17
supérieurs et renflements	Renflement lombosacré	35
Voies encéphalospinales <sup>2</sup>		
Noyau vestibulaire latéral	Renflement brachial	prénatal
	Renflement lombosacré	prénatal
Formation réticulaire médullaire	Renflement brachial	prénatal
	Renflement lombosacré	prénatal
Noyau vestibulaire médian-inférieur	Renflement brachial	prénatal
	Renflement lombosacré	2-3
Formation réticulaire ponto-mésencéphalique	Renflement brachial	1-3
	Renflement lombosacré	1-3
Noyau rouge	Renflement brachial	3-5
	Renflement lombosacré	5-7
Voies spinoencéphaliques <sup>3</sup>		
Renflement lombosacré	Jonction spino-médullaire	1-2
	Formation réticulaire médullaire	3-4
	Noyau gracilis	3-4
	Noyau réticulaire latéral	3-4
	Noyau vestibulaire latéral	3-4
	Formation réticulaire ponto-mésencéphalique	4-5
	Olive inférieure	4-5
	Tectum ventrocaudal	11-12
	Complexe ventrobasal du thalamus	11-12

<sup>1</sup> Cassidy et Cabana (1992)

<sup>2</sup> Desrosiers (1995), Pflieger et Cabana (1996), Wang et al. (1992)

<sup>3</sup> Desrosiers (1995), Qin et al. (1993)

**Tableau 2 : INNERVATION DE LA MUSCULATURE DES MEMBRES ANTERIEURS ET POSTERIEURS CHEZ L'HUMAIN<sup>1</sup>**

<b>Membres antérieurs</b>		
Segments	Nerfs	Muscles
C5-C7	musculocutané	<i>Biceps brachii</i> (Fléchisseurs du coude/épaule)
C6-T1	radial	<i>Triceps brachii</i> (Extenseurs du bras)
C7-T1	médian	<i>Flexor digitorum profundus</i> et muscles intrinsèques de la main (Fléchisseurs du poignet et doigts)
<b>Membres postérieurs</b>		
L2-L4	fémoral	<i>Rectus femoris</i> (Fléchisseurs de la hanche, extenseurs du genou)
L2-L4	obturateur	Adducteurs de la hanche
L4-L6	sciatique	Pelviens profonds
L4-L6	péronier commun (branche du sciatique)	<i>Tibialis anterior</i> (Fléchisseur du pied) <i>Extensor digitorum longus</i> (Extenseur des orteils) Abducteurs du pied
L4-L6	tibial (branche du sciatique)	Ischio-jambiers <i>Gastrocnemius</i> (Extenseurs de la cheville) Muscles intrinsèques de la cheville

<sup>1</sup> Nguyen (1994)



**Figure 1**

Opossum *Monodelphis domestica* adulte.



**Figure 2**

Opossum *Monodelphis domestica* nouveau-né.

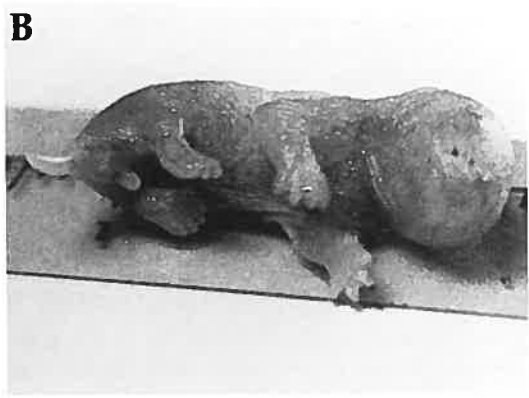
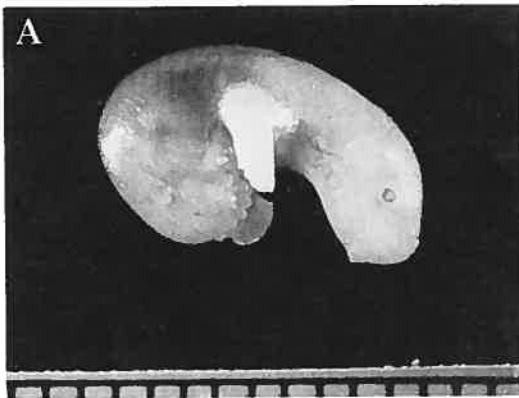


**Figure 3**

Photographies d'opossums au début des quatre périodes du développement

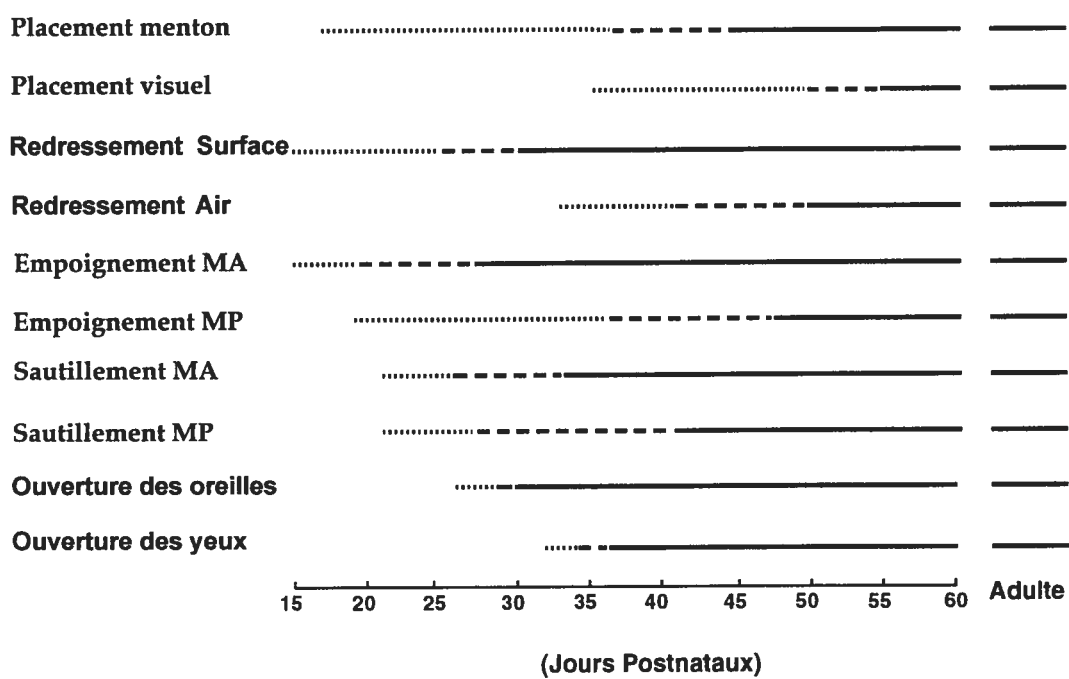
locomoteur : P1 (A), P13 (B), P21 (C) et P32 (D).

(tiré de Pflieger et al., 1996).



**Figure 4**

Chronologie de l'apparition de certains réflexes sensorimoteurs chez l'opossum et de l'ouverture des yeux et des oreilles.  
(tiré et modifié de Cassidy et al., 1994)



... réflexe exprimé moins de 80 % des essais  
 - - réflexe exprimé entre 80 % et 99 % des essais  
 — réflexe exprimé 100 % des essais

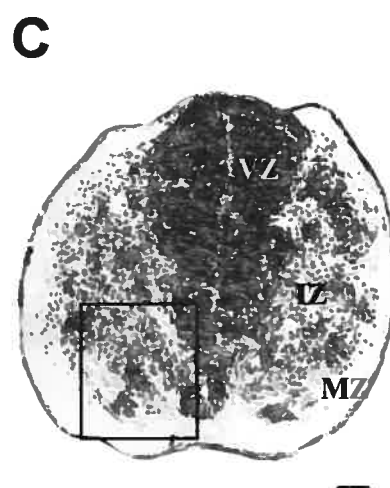
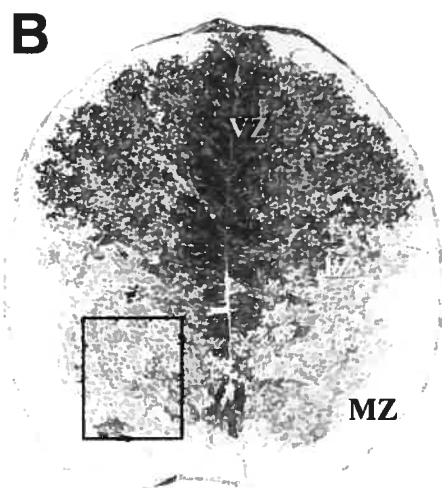
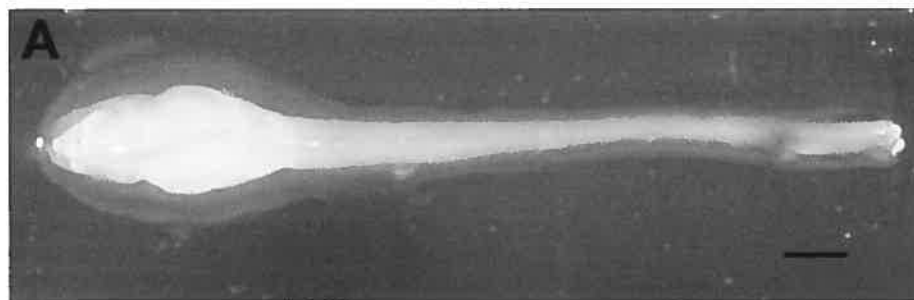


**Figure 5**

Photographie du névraxe chez l'opossum nouveau-né (A).

Coupes transversales colorées au crésyl violet des renflements brachial (B) et lombaire (C) d'un opossum à P1, montrant les zones ventriculaire (VZ), intermédiaire (IZ) et marginale (MZ). Les encadrés en B et C représentent la région qui contient les neurones moteurs. L'échelle en A égale 1mm et celle en C 50µm, valide aussi pour B.

(tiré et modifié de Lamoureux et al., 2005)



**Figure 6**

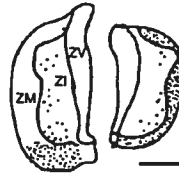
Motif d'expression de la ChAT dans les renflements de la moelle épinière au cours du développement postnatal de l'opossum.

Coupes transversales dessinées à la caméra lucida dans le renflement brachial (BR, moitié de gauche) et lombaire (LS, moitié de droite) à différents âges postnatals (P) et adulte (Ad). Les points représentent les corps cellulaires contenant de la ChAT dans la zone intermédiaire (ZI) et, au début du développement, les plus petits points montrent du marquage dans la zone marginale (ZM). ZV: zone ventriculaire, CE : canal épendymaire.

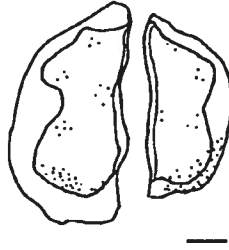
Échelles égales à 200 $\mu$ m.

(tiré et modifié de Barthélemy et Cabana, 2005)

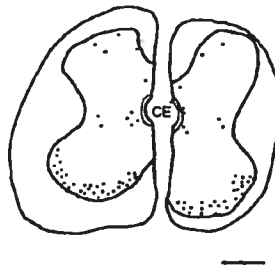
P1



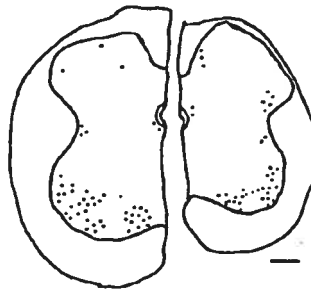
P5



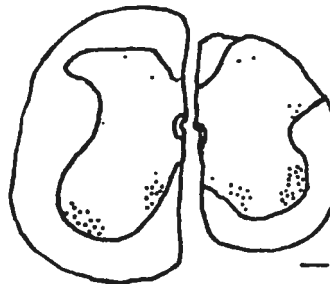
P12



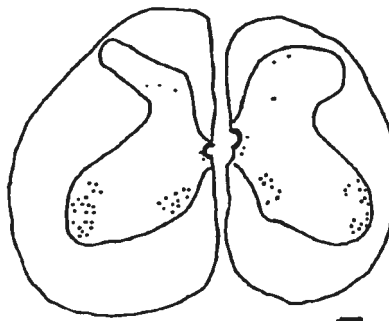
P21



P35



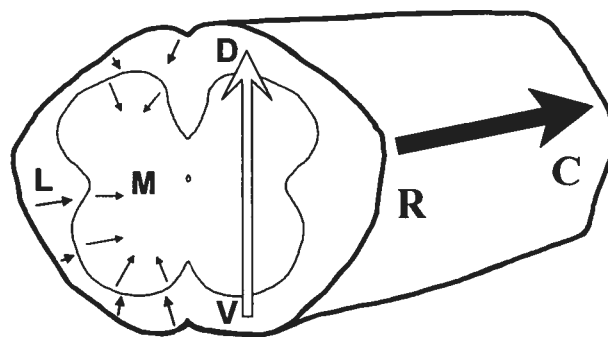
Ad



**Figure 7**

Représentation schématique des gradients généraux rostrocaudal (R-C), ventrodorsal (V-D) et latéromédian (L-M) de la synaptogenèse et de la myélogénèse dans la moelle épinière de l'opossum.

(tiré et modifié de Lamoureux et al., 2005)



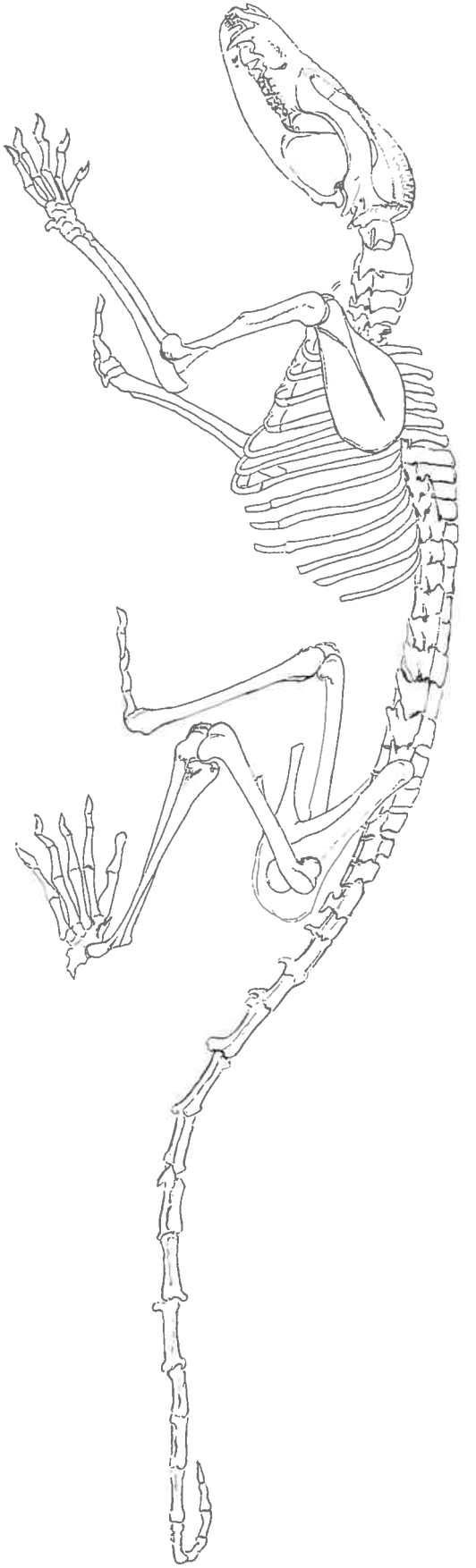
**Figure 8**

Squelette de l'opossum *Didelphis virginiana*.

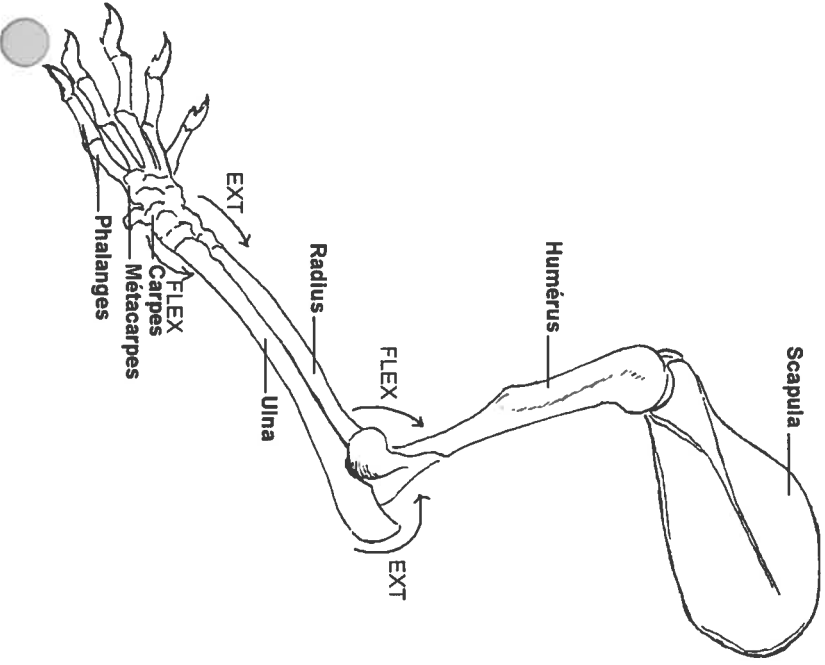
A) Ossature complète de l'opossum *Didelphis*, une espèce d'opossum semblable à *Monodelphis domestica*, mais plus grosse. B) Membre antérieur désarticulé du tronc à l'omoplate (scapula) et grossi. Bras : humérus, radius; Avant-bras : ulna (cubitus), carpes, métacarpes, et phalanges. C) Membre postérieur désarticulé du tronc à la hanche. Cuisse : ileum, fémur; Jambe : tibia, fibula (péroné), tarses, métatarse et phalanges. Les flèches identifiées EXT et FLEX donnent le sens du mouvement d'extension ou de flexion d'une articulation

(tiré et modifié de Ellsworth, 1976)

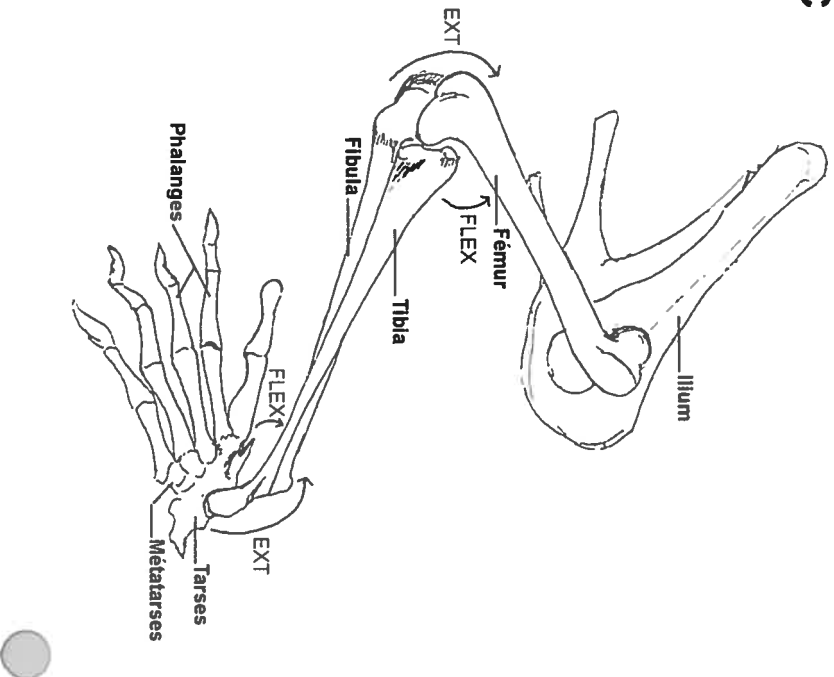
A



B



C





**Figure 9**

Musculature des membres de l'opossum *Monodelphis domestica*.

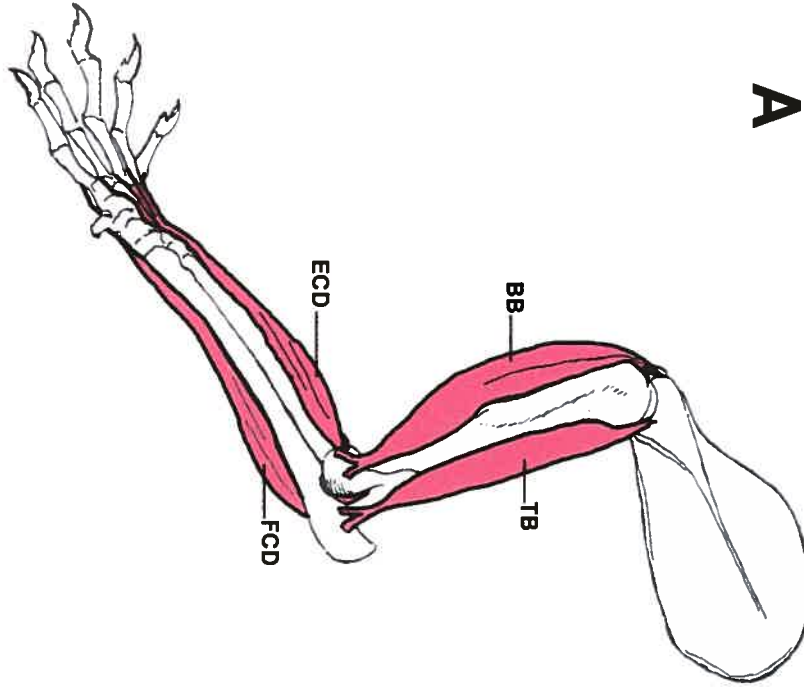
Membre antérieur désarticulé du tronc à l'omoplate (scapula) (A) et membre postérieur désarticulé du tronc à la hanche (B) présentant les groupes musculaires fléchisseurs et extenseurs. Bras : BB : Biceps brachii, TB : triceps brachii. Avant-bras : ECD : extenseurs digitorum communs, FCD : fléchisseurs digitorum communs

Cuisse : QF : quadratus femoris, BF : biceps femoris. Jambe : SM : semimembranosus, ST : semitendinosus, TA : tibialis anterior, TP : tibialis posterior,

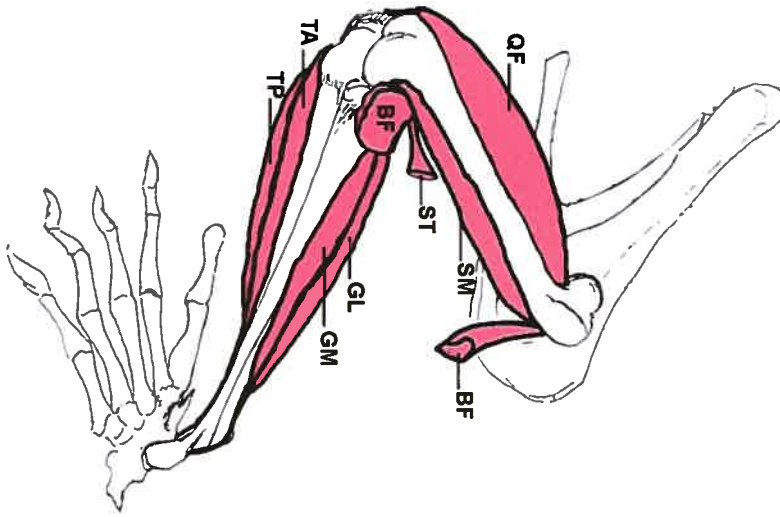
GL : gastrocnemius lateralis, GM : gastrocnemius medialis.

(le squelette est tiré et modifié de Ellsworth, 1976)

**A**



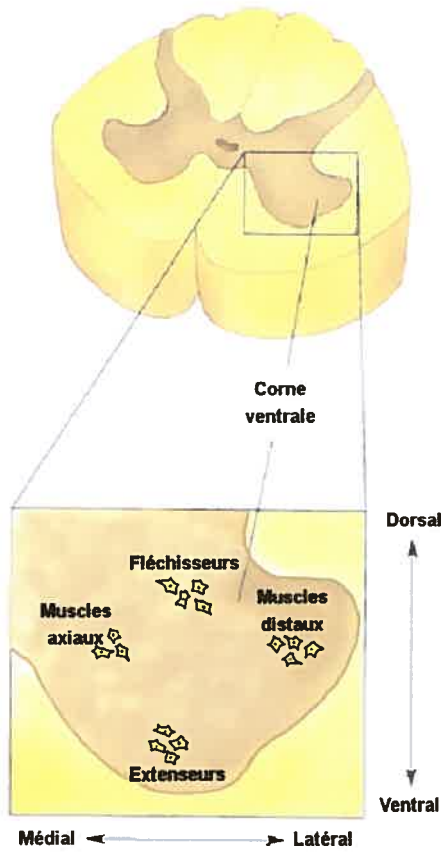
**B**



**Figure 10**

Représentation topographique des motoneurones dans la corne ventrale de la moelle  
épinière chez l'humain.

(tiré et modifié de Bear et al., 1996)



2. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL

Amélie Petrou and Thérèse Cabana. The location of the motoneurons innervating the limb flexors and extensors in the opossum, *Monodelphis domestica*.

Article en préparation, à soumettre à Acta Anatomica.

**The location of the motoneurons innervating the limb flexors and extensors  
in opossums, *Monodelphis domestica***

Amélie Petrou and Thérèse Cabana\*

Département de sciences biologiques, Université de Montréal,  
C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

27 pages, 1 table, 7 figures

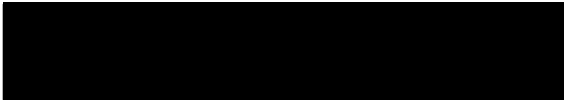
Running headline : Location of motoneurons in spinal cord enlargements of the  
opossum

Indexing terms: Development; marsupials; motor system; muscles; retrograde  
labeling;

\*Correspondence: address as above

Tel: (514) 343-7564

Fax: (514) 343-2293



Grant sponsor: NSERC of Canada 3595-02.

**ABSTRACT**

We have investigated the location of the motoneurons innervating the groups of flexor and extensor muscles of the limbs in opossums *Monodelphis domestica* by using two retrograde tracers: horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin (WGA-HRP) and a recombinant pseudorabies virus (PRV-152). Following tracer injections in the flexor compartment of the arm, lamina IX motoneurons were labeled in cervical (C) segments 4-7 and injections in the arm extensor muscles labeled neurons in C5-7, with respective peaks in C5 and C6. Motoneurons innervating the forearm flexors as well as the forearm extensors were labeled in C5-8, with peaks in C7 for both groups. For both flexor and extensor compartments, the motoneurons innervating the arm tended to be more medial and ventral than those innervating the forearm, with substantial overlap. Lamina IX motoneurons were labeled in lumbar (L) segments 3-4 whether tracers were injected in the thigh flexor or extensor compartment as well as in the leg flexor or extensor compartments. However, the thigh flexor motoneurons were slightly more caudal (peak in L4) and medial than the extensor ones, and the leg flexor motoneurons slightly more dorsal and lateral than the extensor ones, the latter group being shorter rostrocaudally. These findings in opossums generally compare with those reported for the rat and other mammals, except that the rostrocaudal extent of the different motoneuronal pools is less in the opossum. The results will serve as a contribution to the comparative anatomy of the spinal cord in mammals in terms of evolution and is part of an ongoing effort to extensively describe of motoneuronal pools in this species which is being used increasingly as a model for investigations of motor system development.

## INTRODUCTION

The marsupial species *Monodelphis domestica*, the small Brazilian opossum, is increasingly utilized by neurobiologists for ontogenetic studies. A number of laboratories have investigated the ontogenesis of the motor system in this species because it is born very immature and the great majority of its motor development, neural and behavioural, occurs postnatally (see Cabana, 2000 for a review). Even the spinal cord, which forms early in comparison to many brain regions, is very immature in newborn opossums. For example, the central canal is elongated dorsoventrally and surrounded by a thick ventricular zone comprising mitotic figures, an intermediate zone (presumptive gray matter) composed of small and undifferentiated cells, and a thin marginal zone (presumptive white matter) (Cassidy and Cabana, 1993; Gingras and Cabana, 1999; Nicholls et al., 1990). Spinal motoneurons can be recognized by their position in the ventral horn, their slightly larger size and their cholinergic expression, but they form one unsegregated mass (Barthélemy and Cabana, 2005). Even if primary afferents (Knott et al., 1999), propriospinal (Cassidy and Cabana, 1993) and encephalic (Wang et al., 1992) projections are present in the spinal enlargements at birth, synaptogenesis therein unfolds largely postnatally (Gingras and Cabana, 1999). It would thus be possible to determine when these different systems impinge on the motoneuronal pools that innervate specific limb muscles or groups of muscles in this species, but the precise locations of these motoneuronal pools is not known in opossums. This would be particularly relevant in the light that motor innervation of the limbs, especially the hindlimbs that are immobile until the second postnatal week, develops largely postnatally (Barthélemy and Cabana, 2001, 2005;



Martin and Mackay, 2003). As a first step to achieve this aim, we report here on the localization of the motoneuronal pools that innervate the flexor and extensor compartments of the forelimbs and hindlimbs in the adult animal, which will serve as the end point of a similar developmental investigation.

In the mammals studied so far at the adult stage, all of them eutherian species, it has been shown that motoneurons form longitudinal columns of various lengths topographically organized within the spinal cord enlargement according to the limb muscles they supply (rat: Browne 1950; Goering, 1928; Nicolopoulos-Stournaras and Iles, 1983; Swett et al., 1986; McKenna et al., 2000, guinea pig: Kiesel, 1938, rabbit: de Neef, 1900; Romanes, 1941; Portal et al., 1991, dog: de Neff, 1900, cat: Kiesel, 1938; Romanes, 1951, 1964; Swett et al., 1970 and macaque: Reed, 1940). This work on a marsupial will provide additional data for a phylogenetic comparison.

We have revealed motoneuronal cell bodies in the spinal enlargements of opossums by retrogradely tracing wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase and a pseudorabies virus after their injections in the limb compartments. The limbs of newborn and young postnatal opossums, notably the hindlimbs, are not only small and devoided of apparent articulations, but their muscles consist of little undifferentiated mesenchymal masses around cartilaginous bones models and they are not even yet formed in the foot of the newborn (Barthélemy and Cabana, 2005; Martin and Mackey, 2003). This considerable immaturity of limb muscles in early postnatal life will make it impossible to distinguish and inject individual muscles

within each limb segment. For this reason, we are tracing in adult opossums, the motoneurons of the principal limb segments that can be followed throughout development, from newborn to adults, thus the flexor and extensor compartments in the forearm, arm, thigh and leg.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal and tissue preparation

This research was performed under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care ([www.ccac.ca](http://www.ccac.ca)) using protocols approved by the Ethics Committee of Université de Montréal and by the Canadian Food Inspection Agency. A total of 24 female and 3 male adult opossums *Monodelphis domestica*, obtained from a colony maintained at the university vivarium according to Fadem et al. (1982) and Kraus and Fadem (1987), were used. Two tracers were injected into limb muscles to label spinal motoneurons: wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase (WGA-HRP; Vector, Burlingame, CA) and the pseudorabies virus strain 152 (PRV-152; a recombinant of the Bartha strain expressing EGFP, graciously provided by Dr. Lynn Enquist, Princeton University) (Billig et al., 1999, 2001). This PRV strain was grown in pig kidney cells (PK-15) to a final titer of  $3 \times 10^8$  pfu/ $\mu$ l, aliquoted at 50  $\mu$ l per tube, and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The WGA-HRP injections were performed in the laboratory surgery room and the animals were returned to the vivarium after recovering from anesthesia, while the PRV-152 injections were performed under biosafety level II conditions and the opossums were kept in a bonnet cage filter under

the hood. Individual virus aliquots of PRV-152 were thawed immediately prior to the injections and the excess virus was inactivated with Virkon and discarded.

Animals were anesthetized with 3% isoflurane vaporized in 100% O<sub>2</sub> at a rate of 0.8l/min. Buprenorphine (0.01mg/kg) and carbocaine (2mg/kg) were injected subcutaneously at the site of the limb compartment investigated for pain control. The overlying skin was incised and the fascia was punctured with a syringe in numerous sites through which a Hamilton syringe with a 26-gauge needle was inserted to inject either WGA-HRP or PRV-152. The entire length and thickness of a given muscle compartment were included in the injections, and total volume of tracer depended on the size of the muscle compartment (Table 1). The skin was then sutured and the animals were monitored while recovering from anesthesia. The survival postoperative period, 48 h for the animals injected with PRV-152 and 3 days for those injected with WGA-HRP, allowed maximal pick-up of the respective tracer and its transport to the cell bodies, but also minimized the transneuronal transport that could occur within the cord, especially with PRV-152 that can replicate in the neurons.

WGA-HRP or PRV-152 was injected into the flexor or extensor muscle compartment of one segment of the forelimb or the hindlimb (Figure 1). After preliminary experiments to test for volume of tracers, survival period and spill were conducted, more than one muscle compartment in more than one limb was injected in each opossum so as to minimize the use of animals. For example, in a given animal, WGA-HRP could be injected in the left forearm flexor compartment, the right

forearm extensor compartment, the left thigh flexor compartment and the right thigh extensor compartment. The lesser quantity of PRV-152 available did not allow us to perform the same number of experiments as with WGA-HRP. Table 1 details the muscle compartments injected as well as the tracer used, the number of injection sites and the total volume of tracer.

The animals were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital (intraperitoneal) and perfused through the left ventricle with 0.9% saline followed by the fixative: 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1M, pH 7.35 for the WGA-HRP experiments; 4% paraformaldehyde, 1.4% l-lysine, 0.2% sodium meta-periodate in phosphate buffer 0.1M, pH 7.35 for the PRV-152 experiments. The spinal cord was removed from the vertebral column and dura mater and the spinal segments were identified by counting the dorsal and ventral roots according to their serial number from the occiput. We have counted 8 cervical, 12 thoracic and 5 lumbar segments. The enlargements were bathed in the respective fixative during 24 h at 4°C and transferred to 30% sucrose in phosphate buffer at 4°C during 48 h for cryoprotection. Each enlargement was then placed in a plastic mold filled with O.C.T. Compound (Tissue-Tek), frozen using 2-methyl butane cooled with dry ice and stored at -80°C until sectioning. The blocks of tissue were cut into 25 µm thick transverse sections on a cryostat. The sections were mounted onto either Superfrost® Plus glass slides (WGA-HRP) or gelatin-coated slides (PRV-152) and stored at 4°C until processing for immunohistochemistry. The muscle compartments were dissected out and treated in the same manner, to verify the extent of the tracer injections.

### **Immunohistochemistry**

The protocol of Gong and LeDoux (2003) for the rat served to reveal the presence of WGA-HRP in the sections. The slides were rinsed twice in phosphate buffered saline (PBS), 30 min each rinse. The endogenous peroxidase activity was quenched by a 5 min bath of 10% methanol and 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS and the tissues were rinsed in PBS three times, 20 min each. The slides were immersed in a solution of 2% nonfat dry milk and 0.3% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 1 h and rinsed in PBS three times 20 min before being incubated overnight at 4°C in the dark with the primary antibody. The latter consisted of biotinylated goat anti-WGA (Vector) 1:250, 3% normal horse serum (NHS) and 0.1% Triton X-100 in PBS. The slides were then rinsed in PBS during 20 min and incubated for 3 h at room temperature with the secondary antibody: biotinylated anti-goat (Vector) 1:500, 2% NHS and 0.1% Triton X-100 in PBS. The slides were rinsed three times in PBS, 7 min each rinse, incubated with the ABC kit (Vector) for 1 h, and rinsed three times 20 min in PBS. The DAB peroxidase substrate kit with nickel intensification (Vector) was used to develop the slides, which were rinsed in PBS twice, 10 min each rinse, before being air dried overnight. The slides were finally dehydrated, cleared and coverslipped with Eukitt (Fluka).

PRV-152 was revealed according to the protocol of Billig et al. (2000, 2001) for the ferret. The slides were rinsed twice in PBS, 30 min each rinse. The slides were then incubated overnight at 4°C in the dark with the primary antibody consisting of anti-GFP (Molecular Probes) 1:250, 1% NHS and 0.3% Triton X-100 in PBS, before

being rinsed three times in PBS for 7 min each. A 2 h incubation with the secondary antibody followed, consisting of anti-rabbit ALEXA Fluor 488 (Molecular Probes) 1:200, 1% NHS and 0.3% Triton X-100 in PBS, at room temperature in the dark. The slides were then rinsed three times in PBS, 7 min each rinse, dehydrated, cleared and mounted with Cytoseal 60 (VWR International).

### **Data analysis**

The sections were observed with a Leitz Diaplan microscope to detect the brownish-black DAB reaction product indicating the presence of WGA-HRP loaded motoneurons or using a 520-nm filter to detect the greenish-yellow fluorescence of ALEXA Fluor 488. The labeled neurons were plotted on drawings of spinal sections made with a Zeiss camera lucida and photomicrographs were obtained with a Canon-Rebel EOS digital camera. A three dimensional representation of motoneuronal pools in the spinal cord enlargements was obtained by superimposing sections drawn by the camera lucida. All neurons labeled with WGA-HRP were counted and their diameter measured by using the largest circle that can be circumscribed in the cell body in which the nucleus and nucleolus was visible.

## **RESULTS**

Since more animals were injected with WGA-HRP than with PRV-152 and the former material served to count and measure neurons, the results obtained with WGA-HRP will be described and illustrated more abundantly.

Figure 2 presents the plots of motoneurons labeled in the spinal cord enlargements following injection of WGA-HRP in the forelimb and hindlimb. The labeling resulting from injection in the arm and thigh segments are represented on the left side of the sections of the respective enlargement, the flexor motoneurons in red and the extensor motoneurons in blue, whereas the labeling from injections in the forearm and leg are on the right side, with the flexor and extensor motoneurons in orange and green, respectively.

The plots of Figure 2 show that motoneurons innervating the limbs form longitudinal columns in the ventral horn of the spinal enlargements and that the columns innervating the proximal segments (arm, thigh) begin more rostrally than those related to the distal segments (forearm, leg). The arm flexor motoneurons span from cervical (C) segments 4 to 7 and the arm extensor motoneurons from C5 to C7; the forearm flexor and extensor motor columns both span from C5 to C8, the flexor motoneurons extending slightly more caudally in C8. The motoneurons innervating the thigh flexors extend from mid lumbar (L) 3 to caudal L4, whereas those innervating the thigh extensors occur in all L3 and rostral L4. The leg flexor and extensor motoneuronal pools both occupy caudal half of segment L3 and L4, the extensor motoneurons forming a slightly shorter column within the two segments than does the flexor motoneurons.

Motoneurons innervating the more distal forearm and leg segments tend to occupy a slightly more lateral and dorsal location in the brachial and lumbosacral

enlargements, respectively, than those innervating the more proximal arm and thigh segments, with considerable overlap along both axes, especially at lumbar levels. Furthermore, the flexor motoneurons of the forearm and thigh segments tend to reside in a slightly more medial and ventral position than their extensor counterpart, but the opposite tendency is observed for the arm and foreleg segments (eg., flexor motoneurons lateral and dorsal to the extensor ones), given considerable overlaps.

Comparable results on the location of the motoneurons innervating the flexor and extensor compartments of the forelimb and hindlimb segments were observed in opossums injected with PRV-152.

The number of motoneurons labeled with WGA-HRP in spinal segments C4 to C8 and L3-L4 in relation to the different limb compartments injected is represented graphically in Figure 5. These graphs reveal more clearly than the plots of Figure 2 that the distribution of labeled motoneurons is not homogenous along their respective column. For example, 58% of the arm flexor motoneurons, whose column extends from C4 to C7, reside in C5, and 57% of the arm extensor motoneurons, whose column extending from C5 to C7, occur in C6. The peaks of motoneurons related to the forearm flexor and extensor compartments, whose two columns extend from C5 to C8, both occur in C7 (59% and 48%, respectively). For the hindlimbs, whose all four motor columns are comprised in L3-L4, 65% of thigh flexor motoneurons reside in L4 and 82% of thigh extensor motoneurons in L3, but leg flexor (51% in L3 and



49% in L4) and extensor (43% in L3 and 57% in L4) motoneurons occur almost equally in the two segments.

The motoneurons labeled with WGA-HRP appeared similar in all eight pools, as can be seen on the photomicrographs of Figure 3. Their mean diameter ranged from 15,5  $\mu\text{m}$  to 48,7  $\mu\text{m}$  and their shape was ovoid or circular (particularly the smaller motoneurons) to stellate (especially the larger motoneurons). Each section photographed in Figure 3 was taken from the spinal segment containing the highest number of labeled motoneurons and include 3-4 cells per spinal sections, as also observed by Barthélemy and Cabana (2005) in adult opossums prepared to reveal acetylcholine. Examples of large neurons labeled with WGA-HRP and PRV-152 are shown at higher magnification in Figure 4. The diameter of WGA-HRP-labeled neurons in each of the eight pools was measured, and no difference was noted between pools. The frequency distribution of motoneuron diameters combined for the four pools of the cervical enlargement and the four pools of the lumbar cord is presented in Figure 5. Instead of the clear bimodal distribution that was expected based in a previous study on the ventral root fiber diameters in the same species (Leblond and Cabana, 1996), the distribution of motoneuron diameters was not obviously bimodal in the cord, especially in the cervical cord.

## DISCUSSION

Both techniques used here to trace motoneurons that innervate the different limb compartments provide evidence for their organization in longitudinal columns and for a topography along the rostrocaudal, the ventrodorsal and mediolateral axes within the spinal cord enlargements of opossums, *Monodelphis domestica*. This organization is schematized in Figure 7.

The organization of limb motoneuronal pools in opossums compares in many respects with that reported in other (eutherian) mammals, but differs in some other respects. Thus, the total motoneuronal pools innervating the four muscle compartments of the forelimb and hindlimb studied here extend over a lesser number of spinal segments in opossums than in other quadrupedal mammals: from C4 to C8 in opossums versus C5 to T2 in rabbits (Romanes, 1941), C4 to T1 in rats (Goerin, 1928; McKenna et al., 2000) cats (Kiesel, 1938; Romanes, 1964), dogs (de Neef, 1900) and macaques (Reed, 1940), and lower cord L3-L4 in opossums versus L3-L4-L6-S1 in rats (Nicolopoulos-Stournaras and Iles, 1983; Swett et al., 1986), L6-L7-S1-S2 in the rabbits (de Neef, 1900; Portal, et al., 1991) and L4-L5-L6-L7-S1 in cats (Romanes, 1951, 1964; Swett et al, 1970). The phylogenetic trend towards an increase in length of the spinal motor columns that can be gathered from the results reported on different eutherian mammals, is now made clearer with the finding of even shorter columns in the more primitive *Monodelphis domestica*. Our results

establish that it is no longer appropriate to use the term “lumbosacral” to qualify the enlargement of the cord related to the hindlimbs.

At a more detailed level, the rostrocaudal topography the specific columns has been correlated to the position of the muscles relative to the vertebral column, the more proximal a muscle or muscle group, such as arm or thigh muscles versus forearm or leg muscles, the more rostral the motoneurons in the respective spinal enlargements (Romanes, 1951; Cruce, 1974; McKenna et al., 2000), as well as to the position of the muscles along the longitudinal axis of the embryo, the more rostral a muscle or muscle group in the embryo, such as are flexors relative to extensors, the more rostral the motoneurons in the adult cord (Romanes, 1964; Hugues, 1965; Hollyday, 1980). Motor columns in opossums, generally obey these anatomical rules.

Superimposed to the rostrocaudal topography are dorsoventral and mediolateral topographies, such that motoneurons innervating distal muscles tend to be more lateral and dorsal in the spinal enlargements than those innervating more proximal muscles (Romanes, 1951; 1964), as also observed in opossums, albeit an important overlap. The spinal cord topography also reflects the function of the innervated muscles, such that flexor motoneurons that tend to be positioned more dorsally and laterally than extensor motoneurons (Romanes 1951; Sterling and Kuypers, 1967). In opossums this is observed for the forearm and thigh motoneurons column, but not for the arm and leg motoneurons, which show the opposite tendency, but here too overlap exists between all columns of a given enlargement. The overlapping of

motoneuronal pools innervating the same limb segment may indicate a hybrid physiological characteristic of the muscles or a fact that the motoneuronal pool, not only belonging to a single nerve, supply more than one muscle, sharing a common nucleus (Reed, 1940; Sterling and Kuypers, 1967). Therefore, these pools tend to overlap. A given muscle may usually act as a flexor but in some circumstances behave as an extensor, such as the *biceps femoris* who flexes the leg at the knee or extends the thigh at the hip.

The lesser number of spinal segments devoted to limb innervation in opossums, compared to eutherians, and the significant overlap of motor columns could reflect the more primitive state, as are some other features of opossum's nervous system, such as the absence of corticospinal projections (Nudo and Masterton, 1990; Wang et al., 1992) and the rudimentary spino-thalamic projections (Qin et al., 1993).

In rats, which more resemble opossums than do cats or primates Ishihara et al., 1995; Sickles and Oblak, 1984; Swett et al., 1986, have determined that motoneurons equal or larger than 25  $\mu\text{m}$  are alpha motoneurons, and those smaller than 25  $\mu\text{m}$  are gamma motoneurons. If we apply this criterion to our data on the opossums, we thus obtain a proportion of 71%  $\alpha$  and 29%  $\gamma$  in the cervical cord, and 42%  $\alpha$  and 58%  $\gamma$  in the lumbar cord. In their study of myelinated fibers in entire C8 and L4 ventral roots of adult opossums, Leblond and Cabana (1996) reported 70.3%  $\alpha$  and 29.7%  $\gamma$  at C8, which compares very well to the present results, and 57.9%  $\alpha$  and 42.1%  $\gamma$  at L4, which is the opposite ratio as the one we found by measuring motoneuron

diameters. The comparison between the two studies must be made cautiously, however, since the former studied measured and counted all myelinated axons in ventral roots of segments C8 and L4, not just those innervating the limb muscle compartments studied here.

In spite of some changes in the function of homologous muscles during development and evolution (Landmesser, 1978), the structural features of the vertebrate spinal cord are highly conserved (Ryan et al., 1998), suggesting a genetic control by homeobox genes. Recently, Coonan et al. (2003) have shown a role for the molecule EphA4 in the segregation of motoneuronal pools within the cord of the mouse. In knock-out mice deprived of this surface membrane, motoneuron were found to be misplaced within the cord, although they were innervating the correct muscle. Common patterns of neural organization in quadrupeds could be related to the similarities of nervous movements, such as grasp, withdrawal, locomotion, skills displayed by animals, in different phylogenetic orders, according to their respective type of locomotion (McKenna et al., 2000).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by NSERC grant 3595-02 of Canada to T.C. This work was performed by A.P. in partial fulfillment of the requirements for the MSc degree at the Université de Montréal. The authors wish to thank S. Lamoureux and L. Pelletier for technical assistance and Dr. J.F. Pflieger for helpful discussion and personal advice.

**REFERENCES**

- Barthélemy, D., T. Cabana (2001) The development of vesicular acetylcholine transporter immunoreactivity in the hindlimbs of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 128: 191-195.
- Barthélemy, D., T. Cabana (2005) Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Dev Brain Res* 155: 87-98.
- Billig, I., J.M. Foris, J.P. Card, B.J. Yates (1999) Transneuronal tracing of neural pathways controlling an abdominal muscle, rectus abdominis, in the ferret. *Brain Res* 820: 31-44.
- Billig, I., J.M. Foris, L.W. Enquist, J.P. Card, B.J. Yates (2000) Definition of neuronal circuitry controlling the activity of phrenic and abdominal motoneurons in the ferret using recombinant strains of pseudorabies virus. *J Neurosci* 20: 7446-7454.
- Billig, I., K. Hartge, J.P. Card, B.J. Yates (2001) Transneuronal tracing of neural pathways controlling abdominal musculature in the ferret. *Brain Res* 912: 24-32.
- Browne, K.M. (1950) The spatial distribution of segmental nerves to striate musculature of the hindlimb of the rat. *J Comp Neurol* 93: 441-455.
- Cabana, T. (2000) The development of mammalian motor systems: The opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53: 615-626.

- Cassidy, G., T. Cabana (1993) The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. Dev Brain Res 72: 291-299.
- Coonan, J.R., P.F. Bartlett, M.P. Galea (2003) Role of EphA4 in defining the position of a motoneuron pool within the spinal cord. J Comp Neurol 458: 98-111.
- Cruce, W.L. (1974) The anatomical organization of hindlimb motoneurons in the lumbar spinal cord of the frog, *Rana Catesbiana*. J Comp Neurol 153: 59-76.
- de Neef, C. (1900) Les localisations motrices médullaires chez le chien et le lapin. Nevra 2: 71-111.
- Ellsworth, A.H.F. (1976) The North American opossum: an anatomical atlas. Robert E Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 1<sup>st</sup> Edition, 207 pages.
- Fadem, B.H., G.L. Trupin, E. Maliniak, J.L. Van de Berg, V. Hayssen (1982) Care and breeding of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). Lab Anim Sci 32: 405-409.
- Gingras, J., T. Cabana (1999) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. J Comp Neurol 414: 551-560.
- Goering, J.H. (1928) Experimental analysis of motor-cell columns in the cervical enlargement of the spinal cord in the albino rat. J Comp Neurol 46: 125-151.
- Gong, S., M.S. LeDoux (2003) Immunohistochemical detection of wheat germ agglutinin horseradish peroxidase (WGA-HRP). J Neurosci Methods 126: 25-34.



- Hollyday, M. (1980) Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. *J Comp Neurol* 194: 143-170.
- Hugues, A. (1965) A quantitative study of the development of nerves in the hindlimb of *Eleutherodactylus martinicensis*. *J Embryol Exp Morph* 13: 9-34.
- Ishihara, A., R.R. Roy, V.R. Edgerton (1995) Succinate dehydrogenase activity and soma size of motoneurons innervating different portions of the rat tibialis anterior. *Neurosci* 68: 813-822.
- Kiesel, I. (1938) Nerve-cell groups in the anterior column of caudal part of spinal cord and localisation of motor branches of sciatic nerve in cats and guinea-pigs. *Fol Neuropath Eston* 17: 86-101.
- Knott, G.W., P.D. Kitchener, N.R. Saunders (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: 423-436.
- Kraus, D.B., B.H. Fadem (1987) Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Ani Sci* 37: 478-482.
- Landmesser, L. (1978) The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol* 284: 371-389.
- Leblond, H., T. Cabana (1996) Population of myelinated nerve fibers in the C8 and L4 ventral and dorsal roots un the opossum, *Monodelphis domestica*. *Acta Anat* 155: 194-199.
- Martin, K.E., S. Mackay (2003) Postnatal development of the fore- and hindlimbs in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Anat* 202: 143-52.

- McKenna, J.E., G.T. Prusky, I.Q. Whisaw (2000) Cervical motoneuron topography reflects the proximodistal organisation of muscles and movements of the rat forelimb: A retrograde carbocyanine dye analysis. *J Comp Neurol* 419: 286-296.
- Nicholls, J.G., R.R. Stewart, S.D. Erulkar, N.R. Saunders (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.
- Nicolopoulos-Stournaras, S., J.F. Iles (1983) Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75-85.
- Nudo, R.J., R.B. Masterton (1990) Descending pathways to the spinal cord: III. Sites of origin of the corticospinal tract. *J Comp Neurol* 296: 559-583.
- Portal, J.J., M. Corio, D. Viala (1991) Localization of the lumbar pools of motoneurons which provide hindlimb muscles in the rabbit. *Neurosci Lett* 124: 105-107.
- Qin, Y.Q., X.M. Wang, G.F. Martin (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.
- Reed, A.F. (1940) The nuclear masses of the cervical cord of *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol* 72: 187-206.

- Romanes, G.J. (1941) The development and significance of the cell-columns in the ventral horn of the cervical and upper thoracic spinal cord of the rabbit. *J Anat* 76: 112-130.
- Romanes, G.J. (1951). The motor cell columns of the lumbo-sacral spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 94: 313-63.
- Romanes, G.J. (1964) The motor pools of the spinal cord. *Prog Brain Res* 11: 93-119.
- Ryan, J.M., J. Cushman, B. Jordan, A. Samuels, H. Frazer, C. Baier (1998) Topographic position of forelimb motoneuron pools in conserved in vertebrate evolution. *Brain Behav Evol* 51: 90-99.
- Sherrington, C.S. (1892) Notes on the arrangement of some motor fibers in the lumbo-sacral plexus. *J Physiol (London)* 13: 621-772.
- Sickles, D.W., T.G. Oblak (1984) Metabolic variation among  $\alpha$ -motoneurons innervating different muscle fiber types. I. Oxidative enzyme activity. *J Neurophysiol* 51: 529-537.
- Sterling, P., H.G.J.M. Kuypers (1967) Anatomical organization of the brachial spinal cord of the cat. II. The motoneuron plexus. *Brain Res* 4: 16-32.
- Swett, J.E., E. Eldred, J.S. Buchwald (1970) Somatotopic cord-to-muscle relations in efferent innervation of cat gastrocnemius. *Am J Physiol* 219: 762-766.
- Swett, J.E. R.P. Wikholm, R.H. Blanks, A.L. Swett, L.C. Conley (1986) Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 93: 227-252.

Wang, X.M., X.M. Xu, Y.Q. Qin, G.F. Martin (1992) The origin of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. Dev Brain Res 68: 203-206.

**TABLE 1.** Number of opossums used for the injections of WGA-HRP and PRV-152 in the different muscle compartments of the limbs.

	Muscle compartment	Number of opossums per tracer	Number of injections	Total volume ( $\mu$ l)
<b>Forelimb</b>				
Arm	Flexor <i>biceps brachii</i>	7 WGA-HRP	10	20
		2 PRV-152	8	16
	Extensor <i>triceps brachii</i>	5 WGA-HRP	10	20
		2 PRV-152	8	16
Forearm	Flexor <i>common digitorum flexors</i>	6 WGA-HRP	5	5
		3 PRV-152	5	5
	Extensor <i>common digitorum extensors</i>	5 WGA-HRP	5	5
		2 PRV-152	5	5
<b>Hindlimb</b>				
Thigh	Flexor <i>quadratus femoris</i>	5 WGA-HRP	10	20
		3 PRV-152	8	16
	Extensor <i>biceps femoris, semitendinosus and semimembranosus</i>	6 WGA-HRP	15	30
		2 PRV-152	15	15
Leg	Flexor <i>tibialis anterior tibialis posterior</i>	5 WGA-HRP	10	10
		2 PRV-152	6	12
	Extensor <i>gastrocnemius lateralis and gastrocnemius medialis</i>	5 WGA-HRP	10	10
		2 PRV-152	6	12

## Figure legends

### Figure 1

Schematic representations of the left forelimb (A) and hindlimb (B) of opossums *Monodelphis domestica* showing the position of the flexor and extensor compartments of the forelimb (BB = *biceps brachii*, arm flexors; TB = *triceps brachii*, arm extensors; FCD = *flexors commun digitorum*, forearm flexors; ECD = *extensors common digitorum*, forearm extensors) and hindlimb (BF = *biceps femoris*, SM = *semimenbranosus*, ST = *semitendinosus*, thigh flexors; QF = *quadratus femoris*, thigh extensors; TA = *tibialis anterior*, TP = *tibialis posterior*, leg flexors; GL = *gastrocnemius lateralis*, GM = *gastrocnemius medialis*, leg extensors). Adapted from Ellsworth, 1976.

### Figure 2

Drawings of sections of the spinal cord enlargements on which are plotted the motoneurons labeled following WGA-HRP injections in the different muscle compartments of the forelimb and the hindlimb. Each drawing (BR and LS) is the compilation of 40 sections 25  $\mu\text{m}$  thick and represents a summary of all animals injected. Red: arm and thigh flexor motoneurons, Orange: forearm and leg flexor motoneurons. Blue: arm and thigh extensor motoneurons, Green: forearm and leg extensor motoneurons.

**Figure 3**

Photomicrographs of the ventral horn of the cervical (A-D) and lumbar (E-H) cord showing motoneurons labeled following WGA-HRP injections in each of the muscle compartments studied; arm and thigh flexors (A,E) and extensors (B,F); forearm and leg flexors (C,G) and extensors (D,H). The scale bar in H equals 150  $\mu\text{m}$  and is valid for A to G.

**Figure 4**

Photomicrographs at higher magnification of motoneurons labeled with WGA-HRP injected in the leg flexors (A) and with PRV-152 injected in thigh flexors (B). The scale bars equal 30  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5**

Graphs representing the numbers of WGA-HRP labeled motoneurons in the different motor columns of the cervical (A) and lumbar (B) cord. Color code as in Figure 2.

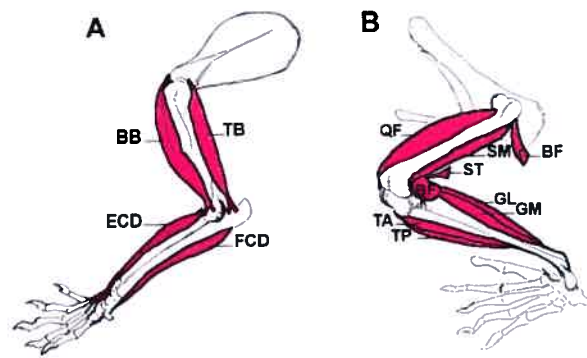
**Figure 6**

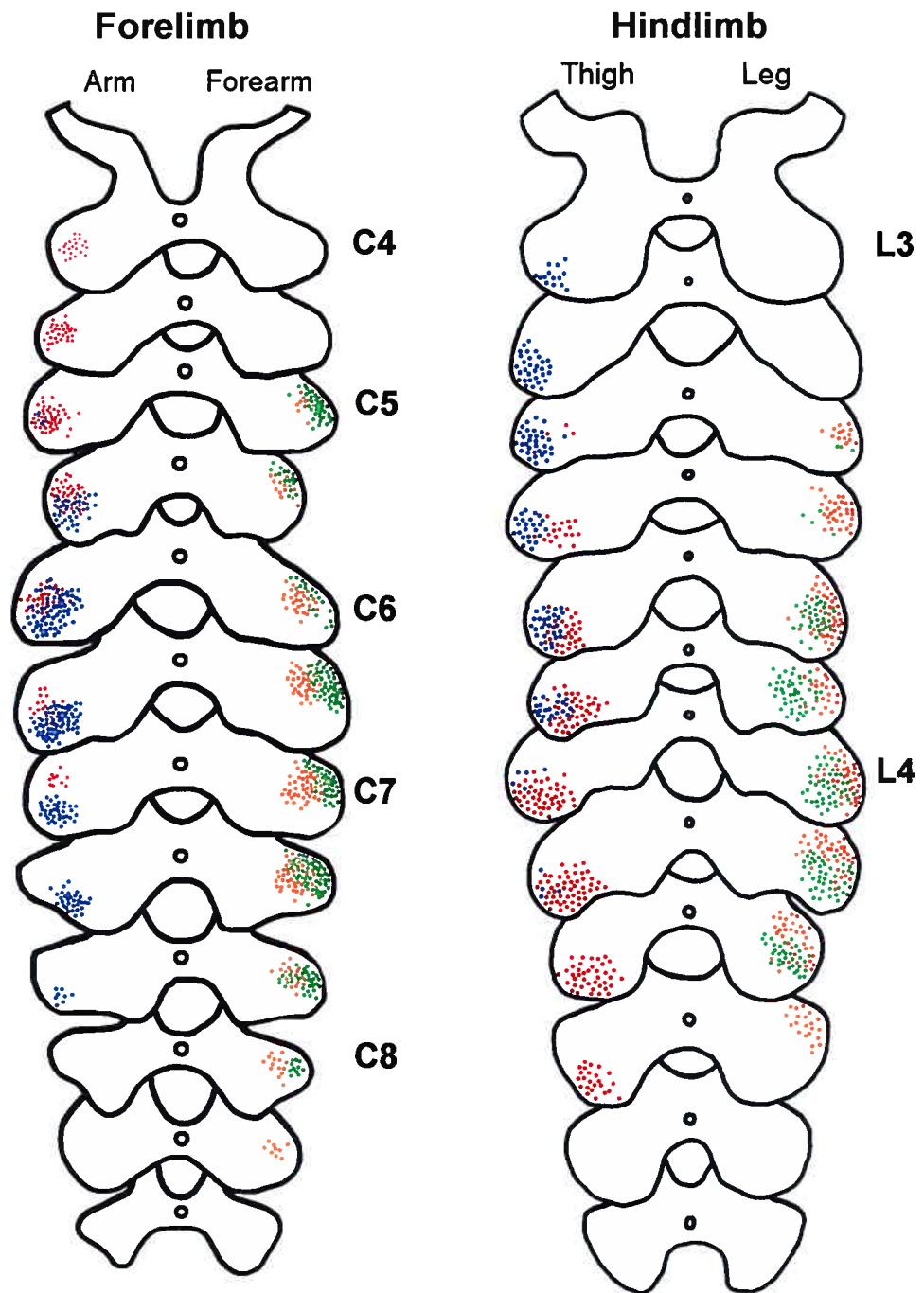
Frequency distribution histograms of motoneuron diameters in the cervical (A) and the lumbar (B) segments containing neurons labelled after WGA-HRP injections in the limb.

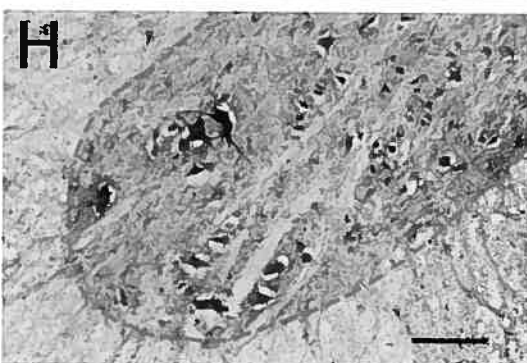
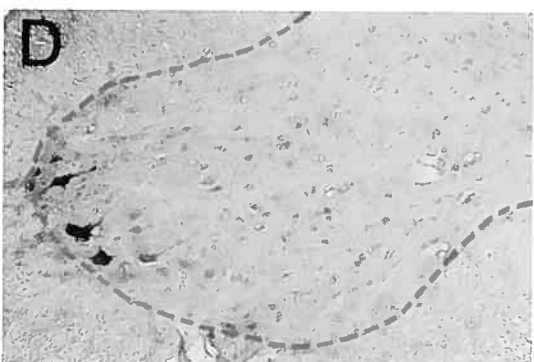
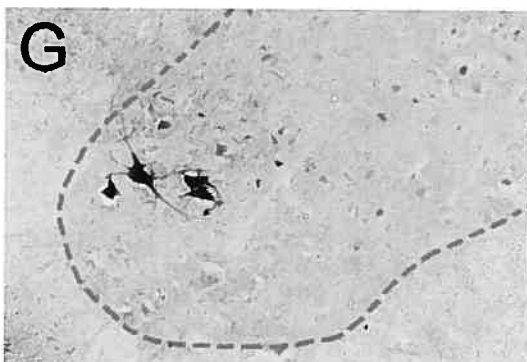
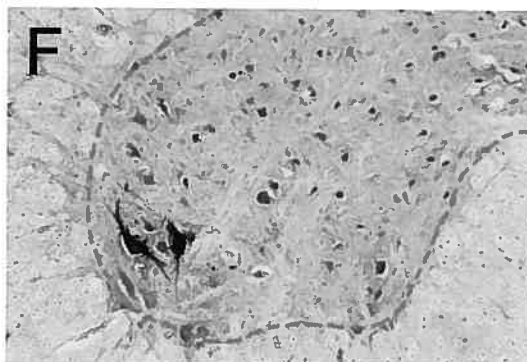
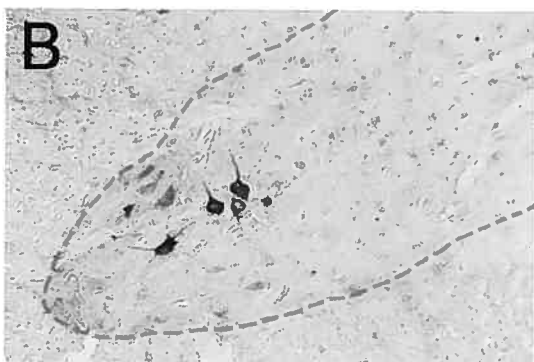
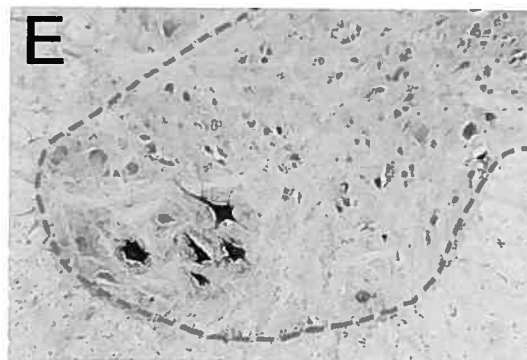
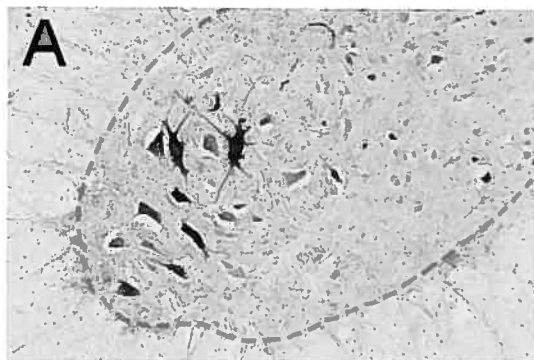
**Figure 7**

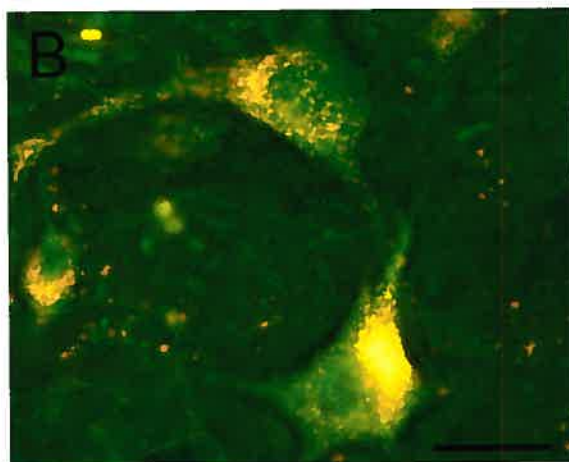
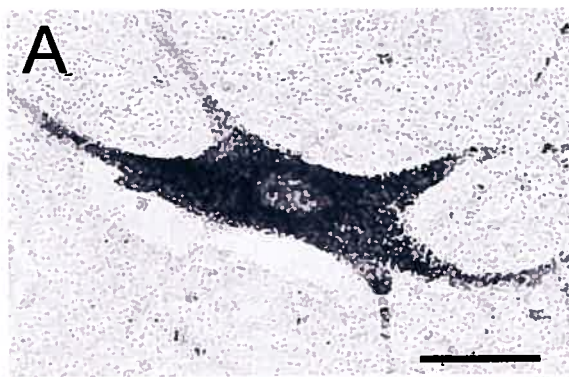
Schematic representation of the motor columns innervating the forelimb and hindlimb muscle compartments. Color code as in Figure 2.



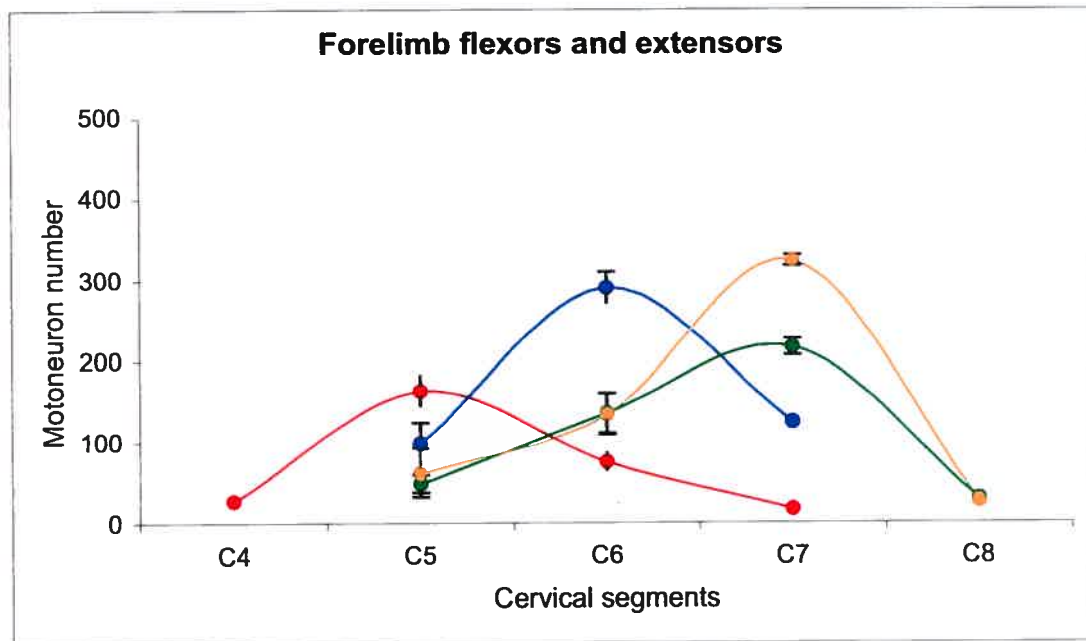




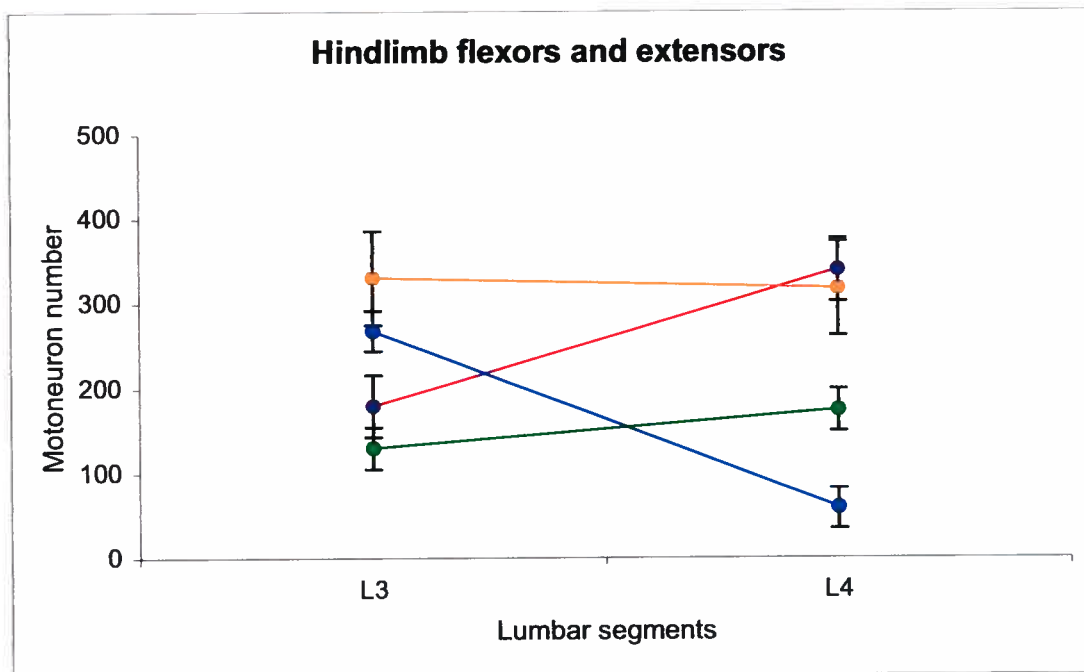




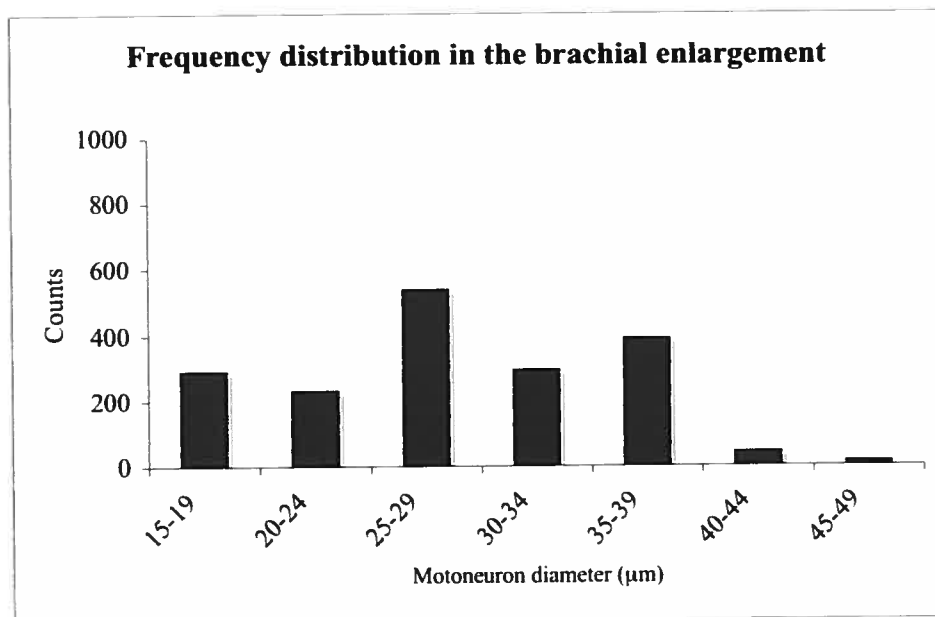
A



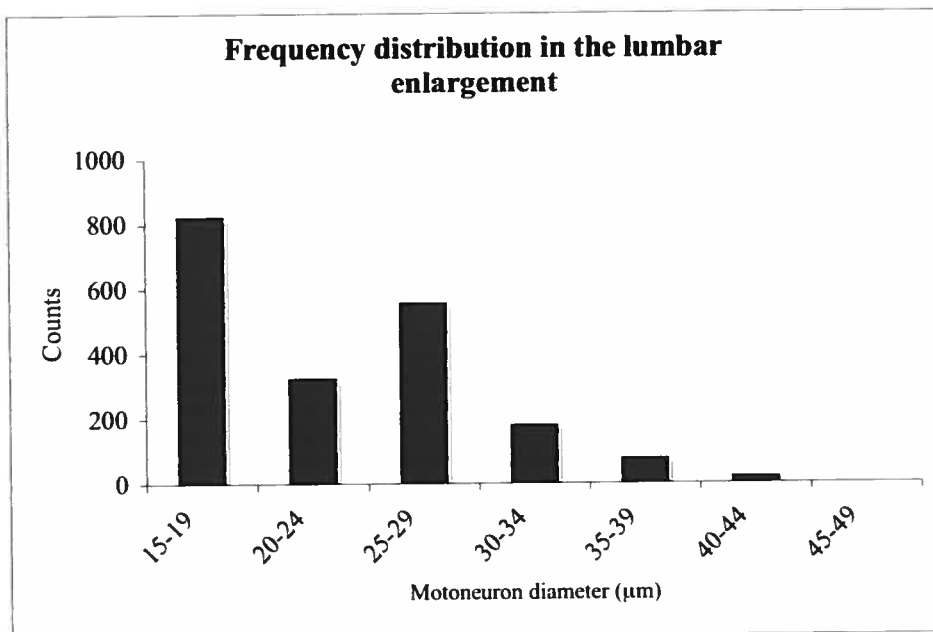
B

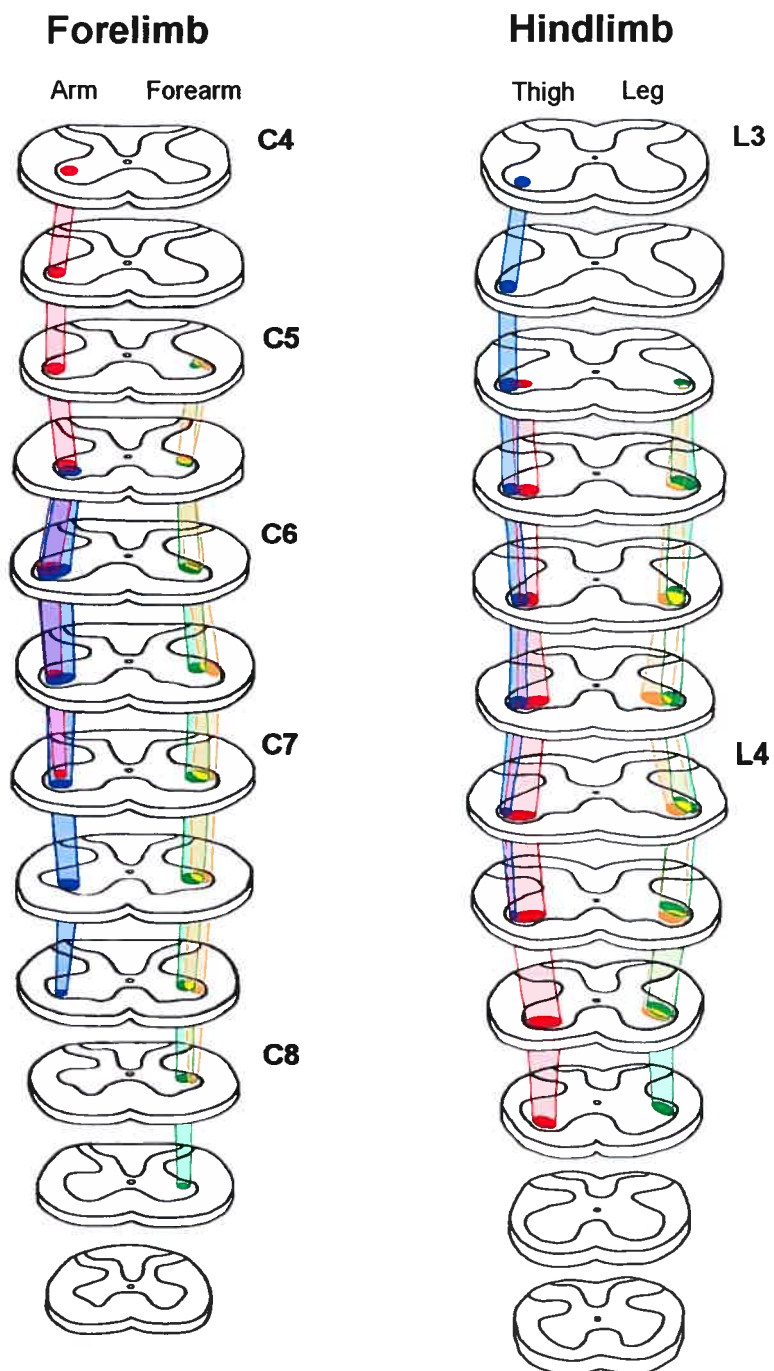


A



B





### 3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Pour mieux interpréter les résultats des études sur l'ontogenèse des systèmes moteurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*, tant les études sur le développement neural que comportemental, il nous faut connaître l'emplacement des pools de motoneurons dans la moelle épinière qui innervent les muscles des membres, en particulier des groupes musculaires fléchisseurs et extenseurs, chez l'opossum adulte. L'ampleur de cette investigation (difficulté des manipulations et nombre d'animaux requis, sans oublier la mise au point du protocole pour l'espèce analysée) exigeait de scinder le projet en deux et de commencer par l'opossum adulte afin d'établir la base d'interprétation de l'étude ontogénique. Pour ce faire, deux techniques de traçage axonal ont été employées, qui diffèrent tant par le type de traceur (une lectine, le WGA-HRP, et un virus, le PRV-152) que par leur détection sur les coupes de moelle (microscopie photonique en champ clair ou foncé et microscopie en fluorescence). La première ayant été éprouvée depuis deux décennies, quoique nous employions une technique de détection récente, et la seconde ne date que de quelques années. Le WGA-HRP est disponible commercialement et, donc, en quantité illimitée tandis que le PRV-152 provient d'un laboratoire de recherche, donc disponible en quantité restreinte, et a été utilisé sur un nombre moindre d'animaux.



### 3.1 Aspects techniques

L'utilisation des deux traceurs a permis le ciblage de différents pools de motoneurones chez un même animal, réduisant par le fait même l'utilisation d'animaux (par exemple, injection de WGA-HRP dans un fléchisseur de la jambe et injection de PRV-152 dans l'extenseur de la jambe dans le membre opposé). Bien qu'il soit souhaitable d'offrir deux démonstrations, plutôt qu'une, d'un problème que l'on souhaite résoudre et bien que les deux traceurs les plus judicieux aient été employés pour le problème particulier de localiser les motoneurones dans la moelle épinière suivant des injections de traceurs dans les muscles, l'expérience que nous venons d'acquérir a montré que le WGA-HRP a fourni des résultats plus faciles à analyser que le PRV-152. La principale raison de la supériorité du WGA-HRP sur le PRV-152 réside en la quasi absence de bruit de fond sur les coupes de moelle, ce qui n'a pas été le cas avec le PRV-152. De plus, les filtres utilisés au laboratoire pour la détection de l'émission d'onde des fluorochromes du PRV-152 n'étaient pas les plus adéquats. De surcroît, le fait que le WGA-HRP ne demande pas de précautions particulières de sécurité par comparaison au PRV-152 (même atténué) n'est pas négligeable, mais s'il s'était avéré un aussi bon ou meilleur que le WGA-HRP, cet inconvénient aurait été jugé acceptable. Il est à prévoir que pour les études ultérieures, l'étude ontogénique, seul le WGA-HRP sera retenu.

### 3.2 Plans d'organisations

Le patron d'immunomarquage des motoneurones signale la présence d'une organisation spécifique des colonnes motrices à l'intérieur même de la lamina IX de la corne ventrale des renflements spinaux de l'opossum, soit une organisation rostrocaudale, dorsoventrale et médiolatérale.

L'organisation rostrocaudale serait principalement expliquée par l'emplacement d'origine de la masse musculaire par rapport à leur proximité d'insertion à la colonne vertébrale (Cruce, 1974; McKenna et al., 2000; Romanes, 1946 et 1951; Vanderhorts et Holstege, 1997). En effet chez l'opossum, les muscles plus proximaux voient leurs motoneurones plus rostralement dans la moelle et les muscles distaux ont leurs motoneurones plus caudalement, tant pour les membres antérieurs que les membres postérieurs. Il s'est également avéré, chez l'opossum, qu'un groupe musculaire proximal au tronc a ses motoneurones plus rostralement dans la moelle qu'un muscle plus distal, tel le *biceps* par rapport aux *flexor* et *extensor common digitorum* dans les MA et le *semimenbranosus*, *semitendinosus* et le *biceps femoris* par rapport aux *gastrocnemius medialis* et *lateralis* pour les MP. La topographie est donc moins marquée chez l'opossum que chez les autres mammifères étudiés.

L'organisation dorsoventrale des motoneurones spinaux dépendrait de l'action que jouent les muscles sur les articulations. Les fléchisseurs, causant la fermeture

d'une articulation, seraient localisés plus dorsalement dans la corne ventrale par rapport aux extenseurs, responsables de l'ouverture des articulations (Romanes, 1951 et 1964). Selon Sterling et Kuypers (1967), cette observation est vraie pour les motoneurones innervant les MA d'animaux quadrupèdes (souris, rat et chat). Chez l'opossum, nous avons aussi constaté une organisation dorsoventrale des motoneurones fléchisseurs et extenseurs similaire pour les deux renflements.

L'organisation médiolatérale des motoneurones spinaux innervant les muscles serait principalement corrélée à la disposition proximodistale de ceux-ci (Romanes, 1951). Chez l'opossum, cette organisation est plus évidente pour les motoneurones innervant la musculature proximale des membres (Figure 7 de l'article). De façon générale, le groupe de motoneurones innervant les fléchisseurs occupe une position plus médiane par rapport à celui des extenseurs. La position latérale dans le renflement lombaire des motoneurones innervant les fléchisseurs distaux des membres postérieurs est similaire à celle du pool innervant les extenseurs de l'avant-bras. La distribution quasi identique de ces deux groupes musculaires aux fonctions différentes pourrait s'expliquer par des caractéristiques physiologiques hybrides présentes dans un même muscle (Sherrington, 1892; Sterling et Kuypers, 1967). Un muscle peut être un extenseur réel et agir, selon différentes circonstances, comme un fléchisseur. Afin d'être le plus exacte possible, la classification et la localisation des groupes de motoneurones doivent considérer et refléter les fonctions hétérogènes des différentes parties d'un muscle en question. Par exemple, une portion du *biceps femoris* et du *triceps brachii* peut subir une excitation lors d'une flexion dans le cycle

locomoteur, alors que d'autres parties de ces mêmes muscles subissent une inhibition, empêchant une co-contraction de muscles antagonistes. Ces propriétés intrinsèques musculaires, d'autant plus complexes, permettent des mouvements plus fluides, améliorant considérablement la locomotion.

L'organisation tridimensionnelle des motoneurones de la moelle épinière innervant les membres chez *Monodelphis domestica* est résumée schématiquement à la Figure 7 de l'article. En somme, leur disposition topographique suit donc les gradients de développement somatique tout en reflétant les fonctions des muscles innervés.

### 3.3 Convergences et divergences évolutives

La ségrégation des groupes de motoneurones serait programmée dès la naissance et suivrait un patron identique d'organisation chez des animaux de taxons différents (Hollyday, 1980; Hugues, 1965). Les mammifères (métathériens et les euthériens) conservent le même type de locomotion (quadrupédie) que les vertébrés sous-mammaliens quadrupèdes et, donc, présentent une similarité dans l'organisation somatotopique des motoneurones innervant la musculature des membres. Il a été démontré chez les vertébrés quadrupèdes que la carte somatotopique de la corne ventrale est conservée durant l'évolution, malgré certains changements de fonctions de muscles homologues, spécialement dans les pools de motoneurones innervant les MA (Landmesser, 1978; Ryan et al., 1998). En ce sens, l'ontogenèse récapitule la

phylogénèse. Ce conservatisme peut être attribué aux similarités observées dans l'exécution des mouvements locomoteurs adoptés par des animaux appartenant à divers ordres phylogénétiques (McKenna et al., 2000). Des mouvements comme l'empoignement et le retrait, par exemple, sont des actions communes requises par les animaux quadrupèdes.

Ce conservatisme évolutif dans la somatotopie des pools de motoneurones spinaux a amené à construire une hypothèse sur l'existence de gènes ou produits de gènes spécifiques qui en seraient responsables. Des études récentes ont confirmé cette hypothèse par la découverte d'une molécule importante à la surface des motoneurones chez la souris: EphA4 (Coonan et al., 2003), un récepteur Eph tyrosine kinase qui coordonne la ségrégation spécifique des colonnes motrices dans la moelle immature du nouveau-né. En effet, les souris « knock-out » montrent sur les coupes de moelle épinière des motoneurones sans aucune ségrégation, même s'ils innervent les différents muscles appropriés. Suivant cette découverte, il serait intéressant de vérifier si cette molécule est également présente chez l'opossum en développement.

Suite aux principes généraux de l'organisation topographique des motoneurones innervant les membres chez les mammifères, principes qui, on l'a dit, s'appliquent à notre espèce expérimentale *Monodelphis domestica*, on constate aussi que l'opossum diffère des autres mammifères étudiés par certains autres aspects. Les motoneurones innervant les MA de l'opossum s'étendent des segments C4 à C8, mais vont jusqu'au premier segment thoracique (T1) chez le rat (Goering, 1928; McKenna

et al., 2000), le chat (Fritz et al., 1986; Sterling et Kuypers, 1967) et l'humain (Bear et al., 1996; Elliot, 1944). Les motoneurones innervant les membres postérieurs de l'opossum sont localisés dans deux seuls segments, L3 et L4, tandis qu'ils occupent 3 segments chez le rat (Swett et al., 1986), 4 chez le lapin (Portal et al., 1991) et 5 chez le chat (Nicolopoulos-Stournaras et Iles, 1983). On constate que le nombre de segments spinaux réservés à l'innervation des membres augmente avec la phylogénie, et que l'opossum, un marsupial, présente la condition la plus primitive.

Chacune des expériences effectuées démontre que les colonnes motrices responsables de l'innervation des muscles fléchisseurs et extenseurs des membres antérieurs et postérieurs ne sont pas tout à fait uniformes. Elles montrent un certain élargissement au cœur de la colonne même. Cette particularité, bien que légère, s'observe davantage dans les colonnes motrices des MA, puisque les pools de motoneurones des MP ne s'étendent que sur deux segments. Nous avons séparé les motoneurones marqués, dans chaque colonne motrice, selon la mesure de leur diamètre : les motoneurones avec un corps cellulaire de plus de 25  $\mu\text{m}$  sont comptés comme des motoneurones alpha ( $\alpha$ ), alors que ceux ayant un corps cellulaire inférieur à 25  $\mu\text{m}$  sont considéré comme des motoneurones gamma ( $\gamma$ ). Cette distinction de la séparation entre les deux types de motoneurones provient d'une convention préalablement établie chez le rat (Ishihara et al., 1988; Sickles et Oblak, 1984) et a été choisie puisque cet animal démontre plusieurs ressemblances morphologiques avec l'opossum *Monodelphis domestica*. Les motoneurones alpha, plus nombreux, innervent les fibres musculaires et sont responsables de la commande directe de la

contraction et, donc, du mouvement et du tonus musculaire. Les motoneurones  $\gamma$ , en quantité moindre, innervent les fibres intrafusales et sont responsables de réguler la tension dans les muscles (Guénard, 1996; Meyer, 1983). Il serait logique de retrouver une plus grande quantité de motoneurones  $\alpha$  reliés aux gros muscles proximaux (comme le *biceps brachii*, le *triceps brachii*, et le *quadratus femoris*), qui effectuent une action moins précise, avec une contraction plus intense et qui nécessitent plus d'énergie, que pour les petits muscles distaux (*flexor* et *extensors common profundus*, le *gastrocnemius medialis* et *lateralis* et le *tibialis anterior* et *posterior*) qui, eux, nécessitent des contrôles et des tensions musculaires plus précises.

### 3.4 Perspectives

Cette étude sur l'innervation des pools de motoneurones dans les renflements spinaux de l'opossum adulte sert de prélude à l'étude ontogénique. Au vu de ce qui a été dit en introduction sur l'histologie de la corne ventrale de la moelle du nouveau-né, l'on pourrait se questionner sur le comment de la ségrégation de la masse de motoneurones en colonnes longitudinales et en pools dorsoventraux et médiolatéraux. La séquence spatio-temporelle de ce développement sera-t-elle celle à laquelle on peut s'attendre ? Pouvons-nous supposer une formation en séquences ? En tout cas, il est certain que les résultats obtenus contribueront à mieux comprendre les autres événements développementaux chez l'opossum et permettront d'intéressantes corrélations avec la maturation et l'avènement des comportements moteurs. L'étude ontogénique à venir sera également d'une importance capitale pour des études

électrophysiologiques de la moelle épinière et des membres de l'opossum en développement, notamment dans l'investigation des décharges des unités motrices. Si l'on arrive à mieux adapter le protocole du traceur viral chez l'opossum, il sera des plus intéressant d'utiliser le PRV-152 pour retracer les circuits neuronaux de chaque groupe musculaire anatomo-fonctionnel, des motoneurones jusqu'aux niveaux encéphaliques supérieurs, grâce à la particularité de ce traceur, qui peut se répliquer dans les neurones et être transporté à travers les synapses.



**BIBLIOGRAPHIE**

Balslev Y, Saunders NR, Møllgard K. 1992. Onset of neocortical synaptogenesis in *Monodelphis domestica* (South American gray short-tailed opossum). *Synapse* 10: 267-270.

Barthélemy D, Cabana T. 2001. The development of vesicular acetylcholine transporter immunoreactivity in the hindlimbs of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 128: 191-195.

Barthélemy D, Cabana T. 2005. Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Brain Res Dev Brain Res* 155: 87-98.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 1996. *Neuroscience: à la découverte du cerveau*. Pradel, Williams & Wilkins, USA, 654 pages.

Billig I, Foris JM, Enquist LW, Card JP, Bates BJ. 2000. Definition of neuronal circuitry controlling the activity of phrenic and abdominal motoneurons in the ferret using recombinant strains of pseudorabies virus. *J Neurosci* 20: 7446-7454.

Billig I, Hartage K, Card JP, Yates BJ. 2001. Transneuronal tracing of neural pathways controlling abdominal musculature in the ferret. *Brain Res* 912: 24-32.

Browne, KM. 1950. The spatial distribution of segmental nerves to striate musculature of the hindlimb of the rat. *J Comp Neurol* 93: 441-455.

Cabana T, Desrosiers C, Nadeau A. 1992. The ontogenesis of corticobulbar projections and the virtual absence of corticospinal connections in the opossum *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abst* 17: 440.8.

Campbell NA, Mathieu R. 1993. *Biologie*. ERPI. Cummings Publishing Compagnie, Canada, 1190 pages.

Card JP, Enquist LW. 1995. Neurovirulence of pseudorabies virus. *Critical Rev Neurobiol* 9 : 137-162.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, 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: 291-299.

Coonan JR, Bartlett PF, Galea MP. 2003. Role of EphA4 in defining the position of a motoneuron pool within the spinal cord. *J Comp Neurol* 458: 98-111.

Cowley KC, Schmidt BJ. 1995. Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 74: 1109-17.

Crouch JE, Lackey MB. 1969. Text-atlas of cat anatomy. Lea and Febiger, Philadelphia, 398 pages.

Cruce WL. 1974. The anatomical organization of hindlimb motoneurons in the lumbar spinal cord of the frog, *Rana catesbiana*. *J Comp Neurol* 153: 59-76.

Dasen JS, Tice BC, Brenner-Morton S, Jessell TM. 2005. A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* 123 : 477-491.

de Neef, C. 1900. Les localisations motrices médullaires chez le chien et le lapin. *Névraxe* 2: 71-111.

Desrosiers C. 1995. Ontogenèse des voies spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum, *Monodelphis domestica*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.

Elliot HC. 1944. Studies on the motor cells of the spinal cord. IV. Distribution in experimental animals. *J Comp Neurol* 81: 97-103.

Ellsworth AHF. 1976. The North American opossum: an anatomical atlas. Robert E Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 1<sup>st</sup> Edition, 207 pages.

Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, Vanderberg JL, Hayssen V. 1982. Care and breeding of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). Lab Anim Sci 32: 405-409.

Fox WMA. 1964. A phylogenetic analysis of behavioral neuro-ontogeny in precocial and non-precocial mammals. Can J Comp Med Vet Sci 28: 197-202.

Fritz N, Illert M, Saggau P. 1986. Location of motoneurons projecting to the cat distal forelimb. I. Deep radial motornuclei. J Comp Neurol 244: 286-301.

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: 551-560.

Goering JH. 1928. Experimental analysis of motor-cell columns in the cervical enlargement of the spinal cord in the albino rat. J Comp Neurol 46: 125-151.

Gong S, Ledoux MS. 2003. Immunohistochemical detection of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). J of Neurosci Methods 126: 25-34.

Greene EC. 1974. Anatomy of the rat. Hafner Publishing Co, New York, 3<sup>rd</sup> Edition, 370 pages.

Grillner S. 1975. Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol Rev* 55: 247-304.

Guénard H. 1996. Physiologie humaine. Edition Pradel, Paris, 2e édition, 570 pages.

Hebel R, Stromberg MW. 1986. Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag, Germany, 271 pages.

Hollyday M. 1980. Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. *J Comp Neurol* 194: 143-170.

Hugues A. 1965. A quantitative study of the development of nerves in the hindlimb of *Eleutherodactylus martinicensis*. *J Embryol exp Morph* 13: 9-34.

Ishihara A, Naitoh H, Araki H, Nishihira Y. 1988. Soma size and oxidative enzyme activity of motoneurons supplying the fast twitch and slow twitch muscles in the rat. *Brain Res* 446: 195-198.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. McGraw-Hill, USA, 4<sup>th</sup> Edition, 1414 pages.

Kiesel, I. 1938. Nerve-cell groups in the anterior column of caudal part of spinal cord and localisation of motor branches of sciatic nerve in cats and guinea-pigs. *Fol Neuropath Eston* 17: 86-101.

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: 423-436.

Kraus DB, Fadem BH. 1987. Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Ani Sci* 37: 478-482.

Lakke EAJF. 1997. The projections to the spinal cord of the rat during development. A time-table of descent. *Adv Anat Embryol* 135: 1-143.

Lamoureux S, Gingras J, Cabana T. 2005. Myelogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 63: 143-56.

Landmesser L. 1978. The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol* 284: 371-389.

LaVail JH, LaVail MM. 1974. The retrograde introaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 157: 303-358.

Leblond H, Cabana T. 1996. Population of myelinated nerve fibers in the C8 and L4 ventral and dorsal roots un the opossum, *Monodelphis domestica*. *Acta Anat.*155: 194-199.

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: 203-216.

Martin KEA, Mackay S. 2003. Postnatal development of the fore- and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Anat* 202: 143-152.

Mate KE, Robinson ES, Vandeberg JL, Pedersen RA. 1994. Timetable of in vivo embryonic development in the grey short-tailed opossum (*Monodelphid domestica*). *Mol Reprod Devel* 39: 365-374.

McKenna JE, Prusky GT, Whisaw IQ. 2000. Cervical motoneuron topography reflects the proximodistal organisation of muscles and movements of the rat forelimb: A retrograde carbocyanine dye analysis. *J Comp Neurol* 419: 286-296.

- Meyer P. 1983. *Physiologie humaine*. Flammarion medecine-sciences, Paris, 1407 pages.
- Miller S. 1970. Excitatory and inhibitory propriospinal pathways from lumbo-sacral to cervical segments in the cat. *Acta Physiol Scand* 80: 25A-26A.
- Nguyen SH. 1994. *Manuel d'anatomie et de physiologie*. Editions Lamarre, Paris, 411 pages.
- Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF. 1983. Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 10; 217: 75-85.
- Nudo RJ, Masterton RB. 1990. Descending pathways to the spinal cord: III. Sites of origin of the corticospinal tract. *J Comp Neurol* 296: 559-583.
- Pflieger JF, Cabana T. 1996. The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat Embryol* 194: 75-88.
- Pflieger JF, Cassidy G, Cabana T. 1996. Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behav Brain Res* 80:137-143.



Portal JJ, Corio M, Viala D. 1991. Localization of the lumbar pools of motoneurons which provide hindlimb muscles in the rabbit. *Neurosci Lett* 124: 105-107.

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*. *Devel Brain Res* 75: 75-90.

Reed, AF. 1940. The nuclear masses of the cervical cord of *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol* 72: 187-206.

Romanes, G.J. 1941. The development and significance of the cell-columns in the ventral horn of the cervical and upper thoracic spinal cord of the rabbit. *J Anat* 76: 112-130.

Romanes GJ. 1946. Motor localization and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord. *J of Anat* 80: 117-131.

Romanes GJ. 1951. The motor cell columns of the lumbo-sacral spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 94: 313-63.

Romanes GJ. 1964. The motor pools of the spinal cord. *Prog Brain Res* 11: 93-119.

Ryan JM, Cushman J, Jordan B, Samuels A, Frazer H, Baier C. 1998. Topographic position of forelimb motoneuron pools is conserved in vertebrate evolution. *Brain Behav Evol* 51: 90-99.

Sherrington CS. 1892. Notes on the arrangement of some motor fibers in the lumbosacral plexus. *J Physiol (London)* 13: 621-772.

Sherrington CS. 1910. Flexion-Reflex of the limb, crossed-extension reflex and reflex stepping and standing. *J Physiol (Lond.)* XL. 28-121.

Sickles DW, Oblak TG. 1984. Metabolic variation among  $\alpha$ -motoneurons innervating different muscle fiber types. I. Oxidative enzyme activity. *J Neurophysiol* 51: 529-537.

Soza RF, Lamoureux S, Cabana T. 2002. The localization of amino acids in the spinal cord enlargements of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abstr* 850.6.

Soza RF, Lamoureux S, Cabana T. 2003. The localization of amino acids in the spinal cord enlargements of the opossum, *Monodelphis domestica*: A developmental study. *Soc Neurosci Abstr* 707.12.

- Sterling P, Kuypers HGJM. 1967. Anatomical organization of the brachial spinal cord of the cat. II. The motoneuron plexus. *Brain Res* 4: 16-32.
- Swett, JE, Eldred E, Buchwald JS. 1970. Somatotopic cord-to-muscle relations in efferent innervation of cat gastrocnemius. *Am J Physiol* 219: 762-766.
- Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LC. 1986. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 93: 227-252.
- Vanderhorst VGJM., Holstege G. 1997. Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46-76.
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. 2000. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53: 635-647.
- Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF. 1992. The origin of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 68: 203-206.
- Wiley J., and Sons. 1982. *Methods in neurosciences; Tracing neural connections with HRP*, IBRO Handbook series, Vol 1, Chichester; New York, Xvi, 251 pages.

Wilson VJ, Melvill-Jones G. 1979. *Mammalian vestibular physiology*. Plenum Press, London.



Handwritten text, possibly a signature or date, located in the bottom right corner of the page.