

Université de Montréal

**Développement fonctionnel du système vestibulaire chez
l'opossum *Monodelphis domestica***

par Frédéric Lanthier

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences

en Sciences biologiques

Mai 2017

© Frédéric Lanthier, 2017

Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé :

**Développement fonctionnel du système vestibulaire chez
l'opossum *Monodelphis domestica***

Présenté par :
Frédéric Lanthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Thérèse Cabana, présidente

Dr Hughes Leblond, membre du jury

Dr Jean-François Pflieger, directeur de recherche

Résumé

Les marsupiaux naissent très immatures, mais doivent atteindre une tétine, sans aide de la mère, à laquelle ils s'attachent pour poursuivre leur développement. Des informations sensorielles sont nécessaires pour s'orienter vers la tétine, la trouver, et s'y attacher. Le système vestibulaire, associé au sens de l'équilibre, a été proposé comme pouvant guider les petits marsupiaux vers la tétine en agissant sur les réseaux moteurs spinaux. Diverses études des marsupiaux suggèrent que le développement de ce système pourrait être suffisamment avancé pour influencer les comportements moteurs chez les nouveau-nés, mais son fonctionnement n'a jamais été testé. Pour le faire, nous avons soumis des opossums âgés de P0 (jour de la naissance; postnatal 0) à P21 à des stimulations vestibulaires et traité les tissus de la tête par immunohistochimie pour révéler c-Fos, utilisé comme indicateur d'activité neuronale. Du marquage dans les noyaux vestibulaires a été observé seulement à partir de P15. Pour confirmer ces résultats, nous avons effectué deux types d'expériences de stimulation sur des préparations *in vitro* d'opossums et enregistré les réponses motrices induites. Ainsi, des élévations de la tête n'ont pas permis de déceler de réponse suite aux stimulations aux âges étudiés (P4-P12). Par contraste, des pressions mécaniques directement appliquées sur le labyrinthe afin de stimuler les organes vestibulaires ont entraîné des réponses à tous les âges testés (P1-P9). Nos résultats suggèrent que la fonction du système vestibulaire est limitée par la maturité de ses organes sensoriels, et qu'il n'influence pas la motricité des nouveau-nés d'opossum en conditions physiologiques avant environ la fin de la 2^e semaine de vie, même si les voies nerveuses entre les organes vestibulaires et la moelle épinière semblent déjà établies à la naissance.

Mots-clés : Système vestibulaire, développement, marsupial, *M. domestica*, c-Fos, physiologie

Abstract

Marsupials are born very immature, but must nevertheless find a teat, unaided by the mother, to which they attach to pursue their development. Sensory inputs are necessary to find the teat and attach to it, but the senses involved are still under discussion. The vestibular system, responsible for the sense of balance, was proposed as influencing motor behavior of newborns in various marsupial species by an action on spinal motor networks. Studies in the opossum *Monodelphis domestica* suggest that the development of the vestibular system could be advanced enough to influence locomotion at birth but its functionality has never been tested. To do that, we subjected intact opossums aged P0 (Postnatal day 0 ; day of birth) to P21 to vestibular stimulations and immunohistochemically processed their brain tissues to reveal c-Fos, used as a marker of neuronal activity. Immunoreactivity of neurons in the vestibular nuclei was observed only from P15 onwards. To confirm those results, we performed two series of experiments on *in vitro* preparations of newborn opossums, using stimulation of the vestibular apparatus and physiological recording of the induced motor responses. Thus, vertical head tilts did not induce motor response at any of the ages studied (P4-P12). In contrast, mechanical pressure applied on the labyrinth to stimulate the vestibular organs induced motor responses at all ages studied (P1-P9). Our results suggest that the vestibular system's function is limited by the maturity of its sensory organs and that it can't influence motor activity in physiological condition before the end of the 2nd postnatal week, even if functional pathways from the labyrinth to the spinal cord seem to be already in place at birth.

Keywords : Vestibular system, development, marsupials, *M. domestica*, c-Fos, physiology

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Table des matières..... | iii |
| Liste des figures | v |
| Liste des abréviations..... | vi |
| Remerciements..... | vii |
| 1 Introduction..... | 1 |
| 1.1 Les marsupiaux | 2 |
| 1.1.1 Phylogénie et histoire biogéographique..... | 3 |
| 1.1.2 Caractères distinctifs..... | 5 |
| 1.2 Naissance chez les marsupiaux..... | 7 |
| 1.2.1 Stratégie de reproduction..... | 8 |
| 1.2.2 Types de naissance..... | 10 |
| 1.2.3 Mode de locomotion des nouveau-nés..... | 12 |
| 1.3 <i>Monodelphis domestica</i> comme modèle..... | 14 |
| 1.3.1 Description générale | 14 |
| 1.3.2 Gestation et naissance | 16 |
| 1.3.3 Stade de développement à la naissance | 17 |
| 1.3.4 Influences sensorielles sur la motricité chez l’opossum nouveau-né | 21 |
| 1.4 Système vestibulaire chez le mammifère adulte..... | 25 |
| 1.4.1 Organes vestibulaires..... | 25 |
| 1.4.2 Noyaux et systèmes de projection vestibulaire..... | 28 |
| 1.5 Développement du système vestibulaire chez les marsupiaux | 30 |
| 1.6 c-Fos en tant qu’indicateur d’activité neuronale..... | 36 |
| 1.7 Problématique | 40 |
| 2 Matériel et Méthode..... | 42 |

| | |
|--|----|
| 2.1 Immunohistochimie c -Fos | 43 |
| 2.1.1 Stimulations à l'aide du nutator | 43 |
| 2.1.2 Préparation des tissus et traitement immunohistochimique..... | 45 |
| 2.1.3 Observation et traitement des résultats | 46 |
| 2.2 Élévation de la tête..... | 47 |
| 2.2.1 Préparation des spécimens | 47 |
| 2.2.2 Stimulations par élévation de tête et enregistrements..... | 48 |
| 2.2.3 Traitement et analyse des résultats | 50 |
| 2.3 Stimulations mécaniques des organes vestibulaires | 52 |
| 2.3.1 Préparation des spécimens | 52 |
| 2.3.2 Stimulations par pression sur le labyrinthe et enregistrements..... | 53 |
| 2.3.3 Traitement et analyse des résultats | 54 |
| 3 Résultats..... | 56 |
| 3.1 Expression de c-Fos suite à des stimulations vestibulaires..... | 56 |
| 3.1.1 Immunoréactivité c -Fos des structures vestibulaires | 56 |
| 3.1.2 Immunoréactivité c-Fos de régions non vestibulaires | 59 |
| 3.2 Activité des triceps en réponse à des élévations de la tête..... | 60 |
| 3.3 Réponse des racines ventrales à des stimulations des organes vestibulaires | 63 |
| 4 Discussion | 68 |
| Bibliographie..... | 80 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Arbre phylogénétique des marsupiaux construit à partir de données moléculaires. ... | 4 |
| Figure 2 : Photographies d'un marsupium de wallaby | 7 |
| Figure 3 : Types de naissances observées chez les différentes espèces marsupiales | 11 |
| Figure 4 : Membre antérieur d'un nouveau-né <i>M. domestica</i> | 12 |
| Figure 5 : Opossum <i>Monodelphis domestica</i> adulte | 15 |
| Figure 6 : Opossum nouveau-né | 17 |
| Figure 7 : Schéma de l'oreille interne chez les mammifères | 26 |
| Figure 8 : Microphotographie d'une macule colorée à l'hématoxyline et éosine | 28 |
| Figure 9 : Section transverse du tronc cérébral de nouveau-né de wallaby après injection de DiI dans le labyrinthe droit | 34 |
| Figure 10 : Schéma du nutator, le dispositif utilisé pour stimuler le système vestibulaire | 44 |
| Figure 11 : Illustration schématique du protocole d'élévation de la tête de préparations <i>in vitro</i> | 51 |
| Figure 12 : Illustration schématique du protocole de stimulation par pression sur les organes vestibulaires de préparations <i>in vitro</i> | 53 |
| Figure 13 : Coupes transverses de tronc cérébral d'opossums illustrant le marquage c-Fos des noyaux vestibulaires | 57 |
| Figure 14 : Enregistrement typique du muscle triceps lors d'élévations de la tête | 62 |
| Figure 15 : Enregistrement typique d'une réponse d'une racine ventrale à la stimulation des organes vestibulaires | 64 |
| Figure 16 : Réponses des racines ventrales de préparations <i>in vitro</i> d'opossums néonataux à des pressions sur les organes vestibulaires | 66 |
| Figure 17 : Taux de réponse aux pressions sur les organes vestibulaires en fonction de l'âge | 67 |

Liste des abréviations

CPG : *Central pattern Generators* (Générateurs centraux de rythme)

E* : Jour Embryonnaire *

ir : Immunoréactif

LVe : Noyau vestibulaire latéral

Ma : Million d'années

MA : Membre(s) antérieur(s)

ME : Moelle épinière

MN : Motoneurone(s)

MVe : Noyau vestibulaire médial

P* : Jour Postnatal *

SNC : Système nerveux central

SpVe : Noyau vestibulaire spinal (inférieur)

SuVe : Noyau vestibulaire supérieur

VOR : Réflexes vestibulo-oculaires

Remerciements

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche, Jean-François Pflieger, de son aide précieuse, ses conseils et son support dans tous les aspects de mon temps passé aux études supérieures. De plus, j'aimerais le remercier d'avoir fait preuve de patience et de m'avoir supporté pendant les moments plus difficiles.

Je remercie aussi Thérèse Cabana de son aide, notamment lors de la préparation en vue des congrès de la CAN et de la SFN, de ses conseils par rapport à mes expérimentations et de ses commentaires par rapport au présent mémoire.

Je remercie Hughes Leblond de ses commentaires sur le présent mémoire, ainsi qu'Annie Angers, de ses recommandations lors de mon comité-conseil et de m'avoir prêté le nutator utilisé pour les stimulations vestibulaires

Je remercie également mes collègues, Marie-Josée et Naussicca, de l'accueil qu'elles m'ont donné à mon arrivée au laboratoire, de l'aide qu'elles m'ont apportée avec mes expériences, ainsi que de leur support moral. Je remercie aussi Edith d'avoir mis de la vie au laboratoire et de son support et son oreille attentive.

Je remercie Louise Pelletier de sa bonne humeur, de sa disponibilité et de son support et son aide en lien avec la coupe des spécimens et la microscopie. Je remercie aussi Chris Cameron et Réjean Dubuc de m'avoir prêté leur microscope à fluorescence.

Finalement, je remercie mes parents, qui m'ont toujours poussé à aller plus loin et sans qui je n'en serais probablement pas arrivé aux études supérieures.

1 Introduction

Les animaux exhibent une grande variété de comportements moteurs qui leur permettent de se déplacer et de répondre à leurs besoins. Pour être efficaces, ces comportements nécessitent l'apport d'informations sensorielles qui permettent aux mouvements d'être adaptés au milieu dans lequel l'animal se déplace. Avant et pendant les mouvements, une multitude d'informations sensorielles, visuelles et vestibulaires entre autres, est intégrée aux commandes motrices afin de permettre des comportements moteurs adaptés. L'étude de ces comportements nécessite de bien comprendre l'influence des différents systèmes sensoriels qui y participent, et par extension, d'étudier le développement sensorimoteur. Les modèles d'étude les plus utilisés en neurobiologie, le rat, la souris et le chat, sont déjà relativement bien développés à la naissance; ils ne peuvent pas encore supporté leur propre poids, mais sont capables de locomotion quadrupède dans l'eau ou lorsque soulevé en l'air (Bekoff *et al.*, 1979; Fady *et al.*, 1998). Une portion du développement sensorimoteur s'effectue donc avant la naissance chez ces animaux, ce qui aura des répercussions non négligeables sur la mise en place plus tardive des systèmes sensoriels et moteurs. Pour étudier les stades précoces du développement sensorimoteur, nous utilisons un mammifère marsupial à naissance très précoce : l'opossum *Monodelphis domestica*.

Les marsupiaux, ou métathériens, sont des mammifères que l'on retrouve en Amérique et en Australie, et qui forment une sous-classe distincte des euthériens (ou placentaires, comme le rat ou l'humain) principalement caractérisée par la naissance très précoce de leurs petits. Les nouveau-nés sont capables, sans aide extérieure, d'atteindre et de s'accrocher à une tétine sur le

ventre de la mère, à laquelle ils resteront attachés pendant plusieurs semaines, voire mois, pour poursuivre leur développement. Le développement des centres moteurs contrôlant les avant-bras est suffisamment avancé pour permettre aux nouveau-nés de se déplacer jusqu'à une tétine à l'aide de leurs membres antérieurs. Par contraste, les membres postérieurs sont complètement immobiles chez la plupart des espèces, notamment l'opossum, ce qui fait des marsupiaux des modèles intéressants pour l'étude comparative du développement des centres moteurs des renflements cervicaux et lombaires de la moelle épinière. De plus, le développement des différents systèmes sensoriels qui influencent les comportements moteurs précoces chez ces animaux est encore mal compris. Malgré plusieurs décennies d'études sur le sujet, on ne sait toujours pas avec certitude quels sens pourraient être partiellement fonctionnels à la naissance et contribuer à guider les nouveau-nés vers une tétine. Pour ajouter à notre compréhension des stades précoces du développement des mécanismes de contrôle sensorimoteur chez les mammifères, j'ai utilisé l'opossum *Monodelphis domestica* pour étudier le développement fonctionnel du système vestibulaire, un des sens qui ont été proposés comme guidant les nouveau-nés de marsupiaux.

1.1 Les marsupiaux

Le nom marsupial tient racine du mot latin *marsupium* signifiant « qui possède une poche », en référence au marsupium, le repli cutané situé sur le ventre des femelles de la plupart des espèces (Ashwell, 2010; Tyndale-Biscoe, 2005). Les marsupiaux forment un groupe extrêmement diversifié et complexe qui en est venu à occuper une multitude de niches

écologiques en Amérique et en Australie. Leur survie et prolifération a probablement été rendue possible par les adaptations de leurs caractères sexuels et leur mode de reproduction qui assurent leur succès reproducteur. Bien que l'immaturation des petits soit parfois considérée comme un désavantage d'un point de vue reproductif, leur mode de parturition et les petits semblent au contraire bien adaptés à cette condition.

1.1.1 Phylogénie et histoire biogéographique

La sous-classe des marsupiaux (ou métathériens) fait partie de la classe des mammifères, partagée avec les placentaires (euthériens) et les monotrèmes (protothériens). Bien qu'étudiées depuis des décennies, les relations de parenté entre les trois sous-classes de mammifères sont encore disputées (Penny and Hasegawa, 1997). Deux principales hypothèses ont été soulevées : « Marsupionta », qui place les monotrèmes comme intimement apparentés aux marsupiaux, et « Theria », qui rapproche les marsupiaux des placentaires en plaçant les monotrèmes à la base des mammifères. L'hypothèse Marsupionta est supportée par certaines études moléculaires (génomique mitochondriale et séquences d'ADN), mais la plupart des études récentes utilisant des gènes nucléaires (ex., le *recombinant activation gene1*; Baker *et al.*, 2004) ou des génomes mitochondriaux complets supportent l'hypothèse Theria (voir Killian *et al.*, 2001; Rheede *et al.*, 2006).

Le plus vieux fossile d'un ancêtre commun des placentaires et des marsupiaux a été trouvé en Chine et date de 125 Ma (Ji *et al.*, 2002). Des analyses moléculaires de gènes nucléaires placent la divergence des marsupiaux et des placentaires un peu plus tôt, il y a environ

175 Millions d'années (Ma) (voir Meredith *et al.*, 2008). Le dernier ancêtre commun des marsupiaux serait beaucoup plus jeune, et aurait vécu il y a environ 65-80 Ma, à la fin du Crétacé ou au début du Tertiaire (Meredith *et al.*, 2008).

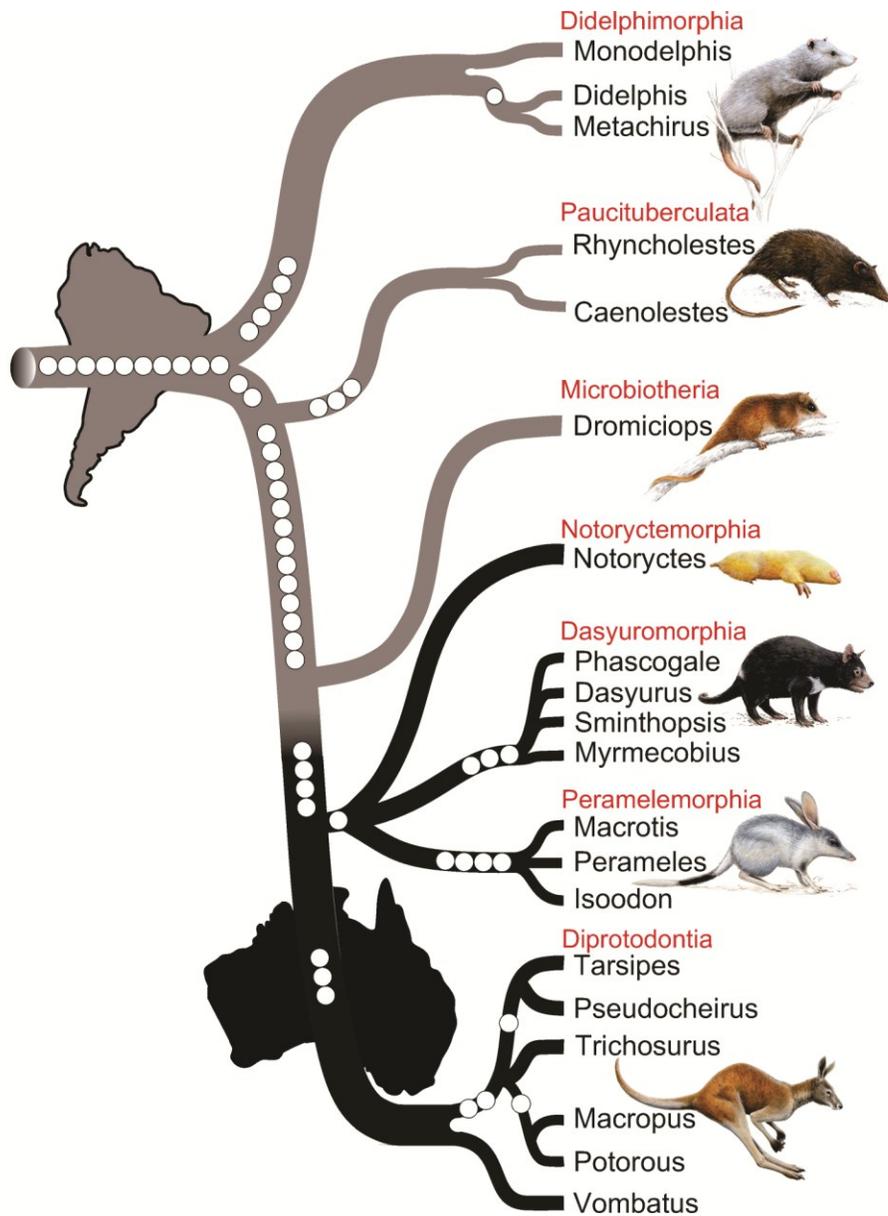


Figure 1 : Arbre phylogénétique des marsupiaux construit à partir de données moléculaires. Les sept ordres actuels sont indiqués en rouge. Adapté de Nilsson *et al.*, 2010.

La sous-classe des marsupiaux comprend sept ordres actuels regroupant 330 espèces qui sont distribuées en Australasie et en Amérique (Kemp, 2005) (Fig. 1). Les marsupiaux seraient apparus en Asie et se seraient dispersés vers l'Amérique du Nord, où une radiation évolutive aurait eu lieu. L'extinction de masse de la barrière Crétacé/Tertiaire (il y a environ 65 Ma) aurait ensuite fait disparaître la plupart des espèces. Après cette période, les marsupiaux américains auraient subi une radiation évolutive en migrant du nord vers le sud, avant de subir une nouvelle extinction à la barrière Pliocène et Pléistocène (il y a environ 2,5Ma), causée par des changements climatiques (Kemp, 2005). L'origine des marsupiaux en Australie est encore mal comprise. La théorie la plus consensuelle veut qu'un individu apparenté au Didelphidae ait traversé l'Antarctique à partir de l'Amérique du Sud pour se rendre en Australie il y a environ 60 Ma. La radiation évolutive qui a suivi aurait alors formé les 5 ordres modernes d'Australidelphia. Cependant, cette théorie est encore fortement incomplète (Kemp, 2005).

1.1.2 Caractères distinctifs

La majeure partie des caractères qui distinguent les marsupiaux a trait à leur reproduction, notamment la structure du placenta, les organes sexuels, le marsupium, et la naissance très précoce des petits. Cette dernière sera traitée au point 1.2.

Une des différences les plus importantes réside dans la présence d'un « vrai placenta » chez les euthériens, d'où le nom « placentaire ». Les euthériens possèdent un placenta, formé par la fusion du chorion et de l'allantoïde, intimement accolé à l'utérus et qui développe un important réseau de vaisseaux sanguins qui permet l'alimentation et l'oxygénation du fœtus

(Renfree, 2010). Chez les marsupiaux, la formation d'un placenta est plus variable, et quand il est présent, il est plutôt formé par le sac vitellin accolé à l'utérus; le chorion et l'allantoïde ne formant pas d'allantochorion chez la majeure partie des espèces (Freyer *et al.*, 2003). Une autre distinction réside dans le fait que le placenta s'infiltré profondément dans l'endomètre utérin chez les euthériens, afin de maximiser les échanges de nutriments entre la mère et le fœtus, alors que le placenta reste superficiel chez les marsupiaux (Freyer *et al.*, 2003).

Un autre caractère distinctif a trait aux organes sexuels, le pénis bifurque des mâles de et le vagin tripartite des femelles. Le gland du pénis possède deux têtes chez presque toutes les espèces, au moins australiennes, et le pénis de certaines espèces possède également un corps érectile supplémentaire (Tyndale-Biscoe & Renfree, 1987). Chez les femelles, le vagin est subdivisé en deux canaux latéraux, dans lesquels le sperme est injecté et qui communiquent avec l'utérus, et un canal médian se terminant en une paroi formée de tissu conjonctif, mais qui s'ouvre de manière temporaire pour laisser passer les petits lors de la parturition (Pearson, 1944).

Le marsupium est un repli cutané présent sur le ventre de la femelle chez la plupart des espèces marsupiales et chez les mâles de certaines espèces dans une forme rudimentaire. Russel (1982) a décrit six types de marsupiums, allant de crêtes de peau marginales à un repli formant une poche complète ouverte postérieurement ou antérieurement (Fig. 2). Le marsupium recouvre les tétines, qui varient en nombre selon les espèces, et c'est dans celui-ci que les petits vont passer la majeure partie de leur développement post-natal. Le marsupium joue évidemment un rôle de support et de protection, permet la thermorégulation des petits, qui sont ectothermes en bas âge, et joue un rôle antibactérien.

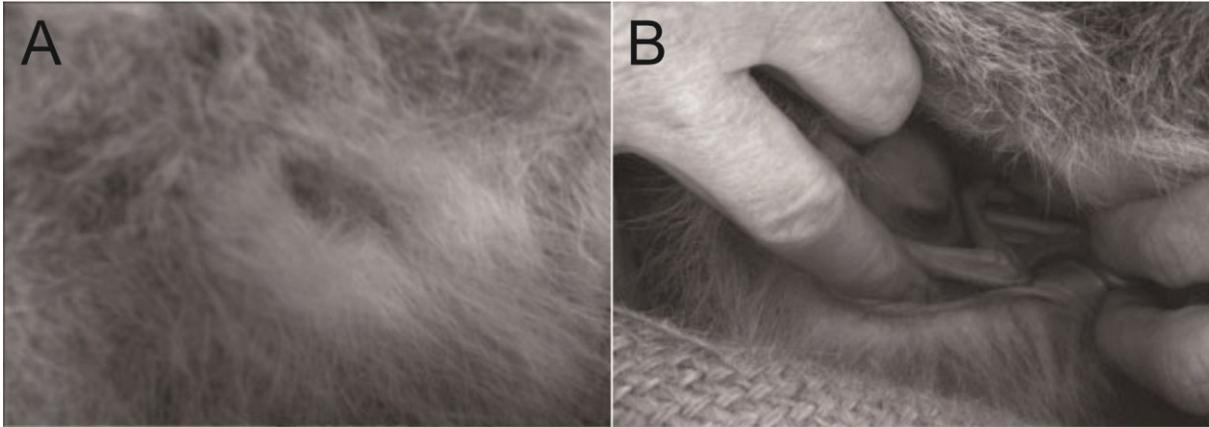


Figure 2 : Photographies d'un marsupium de Wallaby. L'ouverture est fermée en **A** et ouverte et contenant un petit en **B**. Adapté de Edwards & Deakin (2013).

1.2 Naissance chez les marsupiaux

Les nouveau-nés marsupiaux sont aveugles, glabres, et pèsent entre 0,01 et 1 g selon les espèces (Russell, 1982). Pour donner une échelle de comparaison, le nouveau-né de la souris et celui de kangourou pèsent tous les deux environ 1 g alors qu'une souris adulte pèse environ 20 g et un kangourou mâle de 55 à 90 kg. Si un humain adulte pèse environ le poids d'un kangourou, le nouveau-né humain pèse en moyenne 3,4 kg. Le temps de gestation est également très court chez les marsupiaux, variant de 12 à 46 jours selon les espèces (Russell, 1982). En fait, la parturition se produit seulement quatre jours à deux semaines après la gastrulation, ce qui signifie que le développement des différents organes, dont le système nerveux central (SNC), doit être suffisamment avancé à la fin d'un court laps de temps pour permettre la survie de l'embryon hors de la mère. En effet, malgré leur immaturité, les nouveau-nés doivent se déplacer

sur le ventre de la mère afin d'atteindre une tétine et s'y accrocher pour poursuivre leur développement.

Cette section s'intéresse à la naissance chez les marsupiaux en ce qui a trait à la stratégie de donner naissance à des petits aussi immatures, aux différents modes de parturition et aux mouvements que les petits utilisent pour se rendre aux tétines.

1.2.1 Stratégie de reproduction

On définit ici stratégie de reproduction comme l'ensemble des adaptations d'une espèce qui contribuent à son succès reproducteur. Les marsupiaux ont adopté comme stratégie de donner naissance rapidement à une progéniture extrêmement immature. Malgré leur immaturité, le taux de mortalité des petits marsupiaux pendant leur période de lactation n'est pas particulièrement plus élevé que celui des placentaires (Russell, 1982). En effet, comme nous allons le voir dans cette section, les petits et la mère sont bien adaptés à cette stratégie qui possède plusieurs avantages, particulièrement d'un point de vue énergétique (Edwards & Deakin, 2013; Russell, 1982).

La période de lactation des marsupiaux est proportionnellement plus longue que chez les placentaires de taille semblable, tandis que le temps de gestation est considérablement réduit. La longue période de lactation apporte un avantage à la mère qui peut cannibaliser les petits pour récupérer son investissement énergétique si les conditions ne sont plus favorables à leur croissance. En effet, puisque la gestation est très courte, la perte d'énergie encourue par la mère jusqu'au début de la période de lactation est faible, la mère peut donc rapidement donner

naissance à une autre portée quand les conditions redeviennent favorables. Certaines espèces ont également la capacité de bloquer le développement d'un embryon au stade de blastocyste par des hormones relâchées lors de l'allaitement, un phénomène appelé diapause embryonnaire. Chez le wallaby, par exemple, si la mère entre en gestation pendant qu'elle allaite déjà un petit, un embryon peut quand même se développer jusqu'au stade de blastocyste, puis faire une pause développementale jusqu'au sevrage du premier-né (11 mois). Le blastocyste continue alors son développement, ce qui mène à la naissance rapide d'un deuxième petit. De plus, si le premier petit est perdu par accident, il peut être rapidement remplacé si les conditions sont encore favorables (Russell, 1982).

Le fait de donner naissance alors que les embryons sont encore petits et peu développés réduit le besoin d'un placenta complexe pouvant supporter de gros embryons avec d'importants besoins énergétiques. La plus grande part de l'énergie nécessaire à la croissance des petits vient du lait de la mère, qui change en composition pour accommoder leurs besoins (Green & Merchant 1988; Messer & Green, 2006). Comme l'a élégamment noté Renfree (2010), les marsupiaux ont, en quelque sorte, remplacé le placenta par la glande mammaire.

Les marsupiaux ont donc développé une stratégie de reproduction efficace qui leur permet de donner naissance à des petits précoces dans des environnements arides où l'abondance de ressources dans le futur est incertaine. Cette stratégie apporte de grands bénéfices à la mère d'un point de vue énergétique sans trop augmenter les risques pour les petits. De plus, cette stratégie permet de rapidement remplacer les portées perdues. Le désavantage le plus important de cette stratégie est que les nouveau-nés doivent parvenir à la tétine et s'y attacher immédiatement pour survivre.

1.2.2 Types de naissance

Gemmell *et al.* (2002) et Gemmell (2004) ont résumé les trois modes de parturition, observés chez différentes espèces marsupiales, qui dépendent principalement du type de marsupium. Dans les trois cas, peu avant la naissance, la mère lèche vigoureusement la région du sinus urogénital et la poche, entre autres, et se place ensuite en position de mise bas.

Chez les espèces ayant une poche ouverte vers l'avant, comme les kangourous, les opossums et les possums, la mère s'assoit sur son postérieur quelques minutes avant la naissance, normalement avec la queue étendue vers l'avant entre les pattes postérieures (Fig. 3 A). Les petits sortent alors du sinus urogénital et s'orientent rapidement tête vers le haut avant de grimper, sans aide de la mère, jusqu'à la poche. Arrivés à la poche, les petits se retournent pour y pénétrer et vont ensuite s'attacher à une tétine.

Chez les bandicoots (*Peramelemorphia*), qui ont une poche ouverte vers l'arrière, la mère est couchée sur le côté avec une patte postérieure levée. L'ouverture de la poche se retrouve positionnée latéralement au sinus urogénital, légèrement surélevée par rapport à ce dernier (Fig. 3 B). À la naissance des petits, la mère les lèche afin de les débarrasser des membranes amniotiques. Les petits vont alors ramper à l'aide de mouvements d'ondulation du corps jusqu'à l'intérieur de la poche. La mère se relève parfois pendant que les petits sont en déplacement, les forçant alors à grimper jusqu'à l'ouverture du marsupium.

Chez les chats marsupiaux (Dasyuridae), qui ont une poche rudimentaire formée de replis cutanés, la mère est debout, sur ses quatre pattes, penchée vers l'avant avec la tête près du sol (Fig. 3 C). La poche est donc située sous le sinus urogénital. Les petits sortent de ce sinus

urogénital dans une colonne de liquide visqueux qui longe le ventre de la mère vers la poche. Les petits sont transportés par la colonne de liquide et « nagent » vers le haut à l'aide de mouvements ondulatoires pour en sortir près des tétines.



Figure 3 : Types de naissances observées chez les différentes espèces marsupiales. A : Kangourou roux *Macropus rufus*. **B :** Bandicoot, *Isoodon macrourus*. **C :** Chat marsupial, *Dasyurus hallucatus*. Images A et B tirées de Gemmell *et al.* (2002) et C de Gemmell (2002).

Dans les trois cas, l'aide de la mère est inexistante ou extrêmement limitée, et les petits se déplacent donc d'eux-mêmes vers la poche, généralement vers le haut, et trouvent une tétine et s'y attachent. Généralement deux à trois minutes s'écoulent entre la sortie des petits et leur attachement à une tétine.

1.2.3 Mode de locomotion des nouveau-nés

Malgré le fait que les petits soient extrêmement immatures, ils ont la capacité de se déplacer activement jusqu'à la tétine en nageant ou en grim pant dans la direction de la poche. Les nouveau-nés d'opossums, de possums et de kangourous, qui doivent grimper sur le ventre de la mère en position assise, ont sans contredit le mode de locomotion le plus complexe des trois groupes. Leurs mouvements sont permis par des membres antérieurs (MA) relativement bien développés à la naissance, contenant un squelette cartilagineux muni d'articulations avec la ceinture pectorale, au coude et au poignet (Hughes & Hall, 1988). L'ossification des os longs a déjà commencé chez certaines espèces. Les doigts sont individualisés, préhensiles et munis de griffes (Fig. 4). Les fibres musculaires sont immatures, mais tous les groupes musculaires des avant-bras sont présents à la naissance (Hughes & Hall, 1988; Martin & Mackay, 2003). L'innervation des muscles est déjà commencée et se poursuit pendant plusieurs mois après la naissance (Barthelemy & Cabana, 2005).

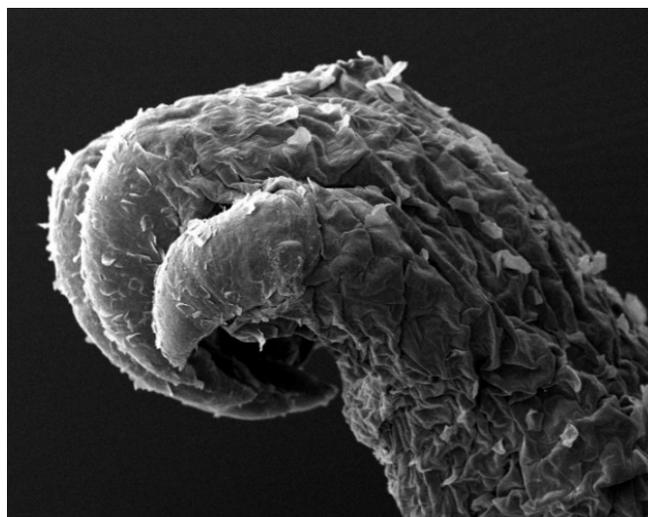


Figure 4 : Membre antérieur d'un nouveau-né *M. domestica*. Crédit photo : Cynthia Hébert-Brassard

Les mouvements effectués par les nouveau-nés sont rythmiques et alternés, consistant en une contraction des muscles para-axiaux, couplée à une extension du MA opposé et à des mouvements de préhension des doigts et de la paume (Hughes & Hall, 1988; Pflieger *et al.*,

1996). L'animal effectue donc un mouvement sinusoïdal, ce qui permet de projeter un membre vers l'avant, qui s'étend et agrippe les poils du ventre de la mère, puis effectue une flexion du bras en répétant les mouvements de l'autre côté. Une étude par ultrason de la gestation du wallaby a montré que des mouvements aléatoires des MA sont observables 4-5 jours avant la naissance et semblent augmenter en intensité à l'approche de celle-ci (Drews *et al.*, 2013). Les mouvements sont parfois observés alors que l'animal est attaché à la tétine (Pflieger *et al.*, 1996).

Ces mouvements rythmiques sont très probablement générés au niveau du renflement cervical de la moelle épinière (ME) par des générateurs centraux de rythmes ou CPG (*Central Pattern Generators*), des réseaux d'interneurones qui génèrent l'activité rythmique des motoneurones (MN) (pour plus de détails, voir Grillner, 1975; 1981; Kiehn, 2006). Néanmoins, l'activité locomotrice doit être modulée ou « guidée » par un ou plusieurs systèmes sensoriels afin de permettre au petit de se diriger vers la tétine, de la trouver et de s'y attacher. Ceci est mis en évidence par le fait que les nouveau-nés d'espèces qui ont une poche ouverte vers l'avant se retournent pour faire face à la poche en sortant de l'orifice urogénital et qu'ils changent de direction arrivés à l'entrée de la poche pour y pénétrer; ils ne grimpent pas aveuglément en ligne droite (Gemmell *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2009). Plusieurs sens ont été proposés comme pouvant potentiellement guider les petits, mais malgré plusieurs décennies de recherche sur le sujet, il existe encore beaucoup d'inconnus quant aux sens qui peuvent influencer la locomotion des nouveau-nés marsupiaux (voir Tyndale Biscoe, 2005). Pour mieux comprendre l'influence des sens sur les comportements moteurs à des stades précoces du développement sensorimoteur, nous utilisons l'opossum *Monodelphis domestica* comme modèle d'étude.

1.3 *Monodelphis domestica* comme modèle

Communément appelé opossum gris à queue courte ou opossum de laboratoire, *M. domestica* est une espèce d'Amérique du Sud qui s'est révélé être un excellent modèle de recherche grâce à sa petite taille, l'absence de marsupium qui facilite la récolte des embryons, sa courte période de gestation, et sa capacité de se reproduire à l'année. Cet opossum est employé dans une variété de champs de recherche (voir VandeBerg & Robinson, 1997; Vandeberg & Williams-Blangero, 2010) et est même le premier marsupial dont le génome a été complètement séquencé (Mikkelsen *et al.*, 2007). L'immaturation des nouveau-nés en fait un modèle idéal pour l'étude de stades de développement précoces difficilement accessibles chez les placentaires.

1.3.1 Description générale

M. domestica est un petit marsupial au pelage gris originaire d'Amérique du Sud appartenant à la famille des Didelphidae. Il mesure entre 17-20 cm, avec une courte queue de 6-8 cm. Les spécimens en captivité sont légèrement plus gros que les spécimens sauvages, les femelles pesant généralement 80 à 100 g et les mâles 90 à 150 g (Fig. 5) (Macrini, 2004). C'est un animal normalement actif seulement quelques heures après le crépuscule, plutôt solitaire et territorial, qui ne côtoie ses congénères qu'en période de reproduction. Il est omnivore, mangeant pratiquement n'importe quel petit animal ou fruit qu'il peut se procurer (Fadem *et al.*, 1982 ; Fadem & Rayves, 1985 ; Macrini, 2004 ; Vandeberg & Williams-Blangero 2010). C'est

un « mammifère généralisé » qui ne montre pas de spécialisations sensorielles ou motrices particulières, ce qui en fait un bon modèle d'étude du développement neurologique en général et moteur en particulier (Cabana, 2000).



Figure 5 : Opossum *Monodelphis domestica* adulte. Crédit photo : Deborah A. Triant.

Les femelles atteignent la maturité sexuelle à l'âge de cinq mois (Stonbrook & Harder, 1992) et peuvent avoir des portées jusqu'à environ l'âge de deux ans (Fadem *et al.*, 1982; VandeBerg & Williams-Blangero, 2010). En captivité comme en nature, l'œstrus de la femelle peut être provoqué par la présence du mâle (Baggot *et al.*, 1987 ; Fadem & Rayve, 1985) à longueur d'année. En captivité, la femelle peut produire et sevrer jusqu'à quatre portées

d'environ huit petits (4 à 13) par année. La naissance de portées de 15 petits a déjà été observée, mais le nombre de survivants est limité par le nombre de tétines (11-13) de la mère (Robinson *et al.*, 1991).

1.3.2 Gestation et naissance

Chez l'opossum, la fertilisation survient environ 24 h après l'accouplement. L'embryon atteint le stade de blastocyste 5,5 jours après l'accouplement, et l'organogenèse débute au 10^e jour. La naissance survient 14,5 jours après l'accouplement ou 13,5 jours après la fertilisation, soit environ quatre jours après le début de l'organogenèse (Mate *et al.*, 1994).

Selon VandeBerg & Williams-Blangero (2010), la femelle devient plus active quelques minutes avant la naissance puis se place avec un côté de son postérieur au sol, les pattes postérieures en l'air et la partie avant du corps relevée et courbée pour amener sa tête près du sinus urogénital. À la sortie des petits, la mère les lèche vigoureusement et réoriente l'orifice urogénital pour que les petits en sortent près des tétines. Les petits qui ne trouvent pas de tétine continuent à grimper et sont cannibalisés lorsqu'ils atteignent le dos de la mère. Le voyage vers la tétine et l'attachement à celle-ci se produit en seulement quelques minutes au total, voire quelques secondes.

Une fois attaché à la tétine, l'épithélium des lèvres des petits fusionne à celui de la tétine de la mère, ils ne s'en détachent pour la première fois que 3 semaines plus tard (Cabana, 2000). Pendant cette période, les petits performant encore les mouvements utilisés pour grimper jusqu'à

la tétine, augmentant en force et en amplitude avec le temps (Pflieger *et al.*, 1996). Environ sept semaines après la naissance, les jeunes opossums sont sevrés.

1.3.3 Stade de développement à la naissance

Comme les autres nouveau-nés marsupiaux, l'opossum est glabre, aveugle et sourd. Il mesure environ 10 mm du museau au postérieur et pèse environ 100mg. Le pavillon de l'oreille est replié et soudé à la peau de la tête et les paupières ne sont pas ouvertes. Le corps est recourbé à la manière d'un fœtus et la tête fait près du 1/3 de la longueur du corps (Fig. 6).



Figure 6 : Opossum nouveau-né.

Les os des MA (Membres antérieurs) sont tous sous forme de modèles cartilagineux (Barthélémy & Cabana, 2005; Martin & Mackay, 2003). Toutes les principales composantes, l'humérus, le radius, le cubitus, les carpes, métacarpes et phalanges ainsi que les articulations et les différents muscles, dont les striations sont visibles, peuvent être discernés. De plus, les MA sont munis de griffes formées par un épaissement de l'épiderme (Fig. 4). Les membres postérieurs, quant à eux, sont encore sous forme de bourgeons embryonnaires immobiles (Fig. 6). On peut y observer le fémur, le tibia, la fibula, les tarse et les métatarses sous forme cartilagineuse, mais les phalanges sont encore sous forme mésenchymateuse. Les muscles ne sont pas encore visibles, mais on peut observer la présence de fibres musculaires non striées.

Le développement du système nerveux chez les vertébrés s'effectue normalement selon trois gradients, ventro-dorsal, medio-latéral, et finalement à partir de l'obex vers les extrémités, c'est-à-dire que le développement de la ME s'effectue selon un gradient rostro-caudal et celui de l'encéphale selon un gradient caudo-rostral. De ce fait, le cortex et la ME caudale sont moins avancés dans leur développement que le tronc cérébral. De plus, les portions motrices du SNC, qui sont généralement situées en position ventrale, sont plus développées que les portions sensorielles, qui sont généralement en position plus dorsale.

À la naissance, le néocortex de l'opossum est extrêmement immature. Il comporte seulement deux couches cellulaires, un état considéré comme embryonnaire puisque l'adulte en possède six comme chez les autres mammifères. Les neurones corticaux sont encore en production jusqu'à P16 et leur migration vers les différentes couches se poursuit jusqu'à P25 (Puzzolo & Mallamaci, 2010). À titre de comparaison, chez la souris, la formation des neurones du cortex a lieu entre les jours embryonnaires 11 et 17 et se termine donc avant la naissance. Les astrocytes se différencient à partir d'environ P18 et les oligodendrocytes à partir d'environ P40 chez l'opossum, en comparaison à P4 et P15, respectivement, chez la souris (voir Puzzolo & Mallamaci, 2010). Le diencephale est également très peu développé, seul le noyau latéral de l'hypothalamus y est clairement défini.

Dans le mésencéphale on peut observer la substance noire et le faisceau longitudinal médian, mais le noyau rouge, important pour la locomotion chez l'adulte, n'est pas encore distinct (Wang *et al.*, 1992). Le cervelet est pratiquement absent à la naissance; ses cellules sont encore comprises dans les lèvres rhombiques (Wang *et al.*, 1992). Plusieurs des noyaux de la formation réticulée peuvent être discernés, particulièrement caudalement, de même que la plupart des noyaux moteurs ou sensoriels associés aux nerfs crâniens, incluant le noyau facial,

le noyau hypoglosse, le noyau spinal du trijumeau, ou encore le noyau vestibulaire latéral du complexe vestibulaire (Pflieger & Cabana, 1996; Swanson *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1992).

Le renflement cervical de la ME est encore relativement immature à la naissance. La matière grise n'a pas encore adopté sa forme typique de papillon. On observe plutôt une épaisse zone ventriculaire, une zone intermédiaire et une mince zone marginale, la même organisation embryonnaire qu'on peut observer au début de la formation de la ME. La zone ventriculaire disparaît avant la fin de la 2^e semaine (Gingras & Cabana, 1999). Le renflement cervical du nouveau-né reçoit déjà des axones provenant du noyau spinal du trijumeau et de la formation réticulée (Wang *et al.*, 1992) ainsi que des projections vestibulospinales (Pflieger & Cabana, 1996). À titre de comparaison, chez le rat, tous les systèmes de projections descendantes du tronc cérébral sont déjà en place à la naissance, incluant les projections du noyau rouge (Kudo *et al.*, 1993).

À la naissance, le renflement lombosacré est encore plus immature que le cervical, on y observe une zone ventriculaire plus épaisse et une zone marginale encore plus mince que dans le renflement cervical. La zone marginale n'est pas encore visible dorsalement à la naissance et la zone ventriculaire disparaît seulement à la fin de la 3^e semaine postnatale (Gingras & Cabana, 1999). Les MN présomptifs sont à peine plus gros que les autres neurones et difficilement reconnaissables autrement que par leur position ventrale (Cabana, 2000) ou à l'aide d'un marqueur à acétylcholine (Barthélemy & Cabana, 2005). Les seules projections supraspinales que reçoit le renflement lombosacré à la naissance sont du noyau vestibulaire latéral et de la formation réticulée caudale, et ce, en moins grande quantité que la ME cervicale (Wang *et al.*, 1992).

Le développement des MN et de l'innervation motrice des membres a été étudié en utilisant l'expression d'enzymes cruciales pour la synthèse et le transport de l'acétylcholine, le principal neurotransmetteur utilisé par ces cellules (Barthélemy & Cabana, 2005). Cette étude a permis de montrer que l'innervation des membres se produit en grande partie après la naissance, jusqu'au moins l'âge de deux mois. Les MN finiraient de se différencier en neurones cholinergiques selon un gradient rostro-caudal; deux semaines après la naissance dans le renflement cervical et trois semaines après la naissance dans le renflement lombaire. De la même façon, les MN atteignent leur taille adulte environ 6-7 semaines après la naissance dans le renflement cervical et 8 semaines après la naissance dans le renflement lombaire. Les auteurs de cette étude ont également rapporté avoir observé un gradient latéro-médial en ce qui a trait à l'apparition du phénotype cholinergique des MN. La localisation du transporteur de l'acétylcholine dans les muscles pendant le développement semble suggérer que les axones moteurs les pénètrent dès leur formation. De plus, l'innervation des membres suit un gradient rostro-caudal; celle des MA est plus importante que celle des membres postérieurs jusqu'à environ P50. Finalement, plus de marquage est observé dans les segments proximaux que distaux jusqu'à l'âge d'environ trois semaines dans les MA et quatre semaines dans les membres postérieurs, indiquant que l'innervation des membres suit également un gradient proximo-distal (Barthélemy & Cabana, 2005).

Le développement des afférences primaires segmentaires a été étudié aux niveaux cervicaux, thoraciques et lombaires de la ME (Kitchener *et al.*, 2006; Knott *et al.*, 1999). Il ressort de ces études que des afférences primaires se distribuent déjà dans la matière grise présomptive de la ME, du moins des niveaux cervicaux à lombaires, dès la naissance. Plusieurs de ces afférences, particulièrement dans les segments cervicaux, projettent vers les dendrites des

MN au niveau de la corne ventrale. L'innervation segmentaire se poursuit à un rythme relativement rapide durant la première semaine postnatale, mais une innervation semblable à ce qui est observé chez l'adulte au niveau de la corne dorsale est seulement visible environ un mois et demi à deux mois après la naissance. Kitchener *et al.* (2006) suggèrent qu'il existe « un délai d'aussi peu qu'un à deux jours entre l'innervation des niveaux cervicaux et lombaires de la moelle épinière » malgré les différences majeures qui existent entre les niveaux de développement des membres antérieurs et postérieurs.

1.3.4 Influences sensorielles sur la motricité chez l'opossum nouveau-né

Comme il a été mentionné précédemment, les mouvements locomoteurs utilisés par l'opossum nouveau-né pour se rendre jusqu'à la tétine sont très probablement générés par les CPGs du renflement cervical de la ME. Des informations sensorielles sont néanmoins nécessaires pour diriger les petits jusqu'à une tétine et provoquer leur attachement à celle-ci. L'état de développement des afférences primaires segmentaires permet de penser qu'elles influencent l'activité des MN mais ne peuvent sans doute pas servir ou suffire à guider le nouveau-né vers les tétines. Des systèmes céphaliques sont fort probablement nécessaires.

Les systèmes visuels et auditifs sont trop immatures pour expliquer les comportements moteurs observés chez les nouveau-nés. À la naissance, les yeux sont recouverts de peau. Les premiers axones rétino-fuges atteignent le chiasma optique à P3 (Taylor & Guillery, 1994). C'est seulement à partir d'environ P35 que les yeux s'ouvrent et que l'opossum présente des réflexes visuels (Cassidy *et al.*, 1994). De même, chez le nouveau-né, le pavillon de l'oreille externe est

soudé à la peau de la tête et le méat auditif s'ouvre seulement environ 30 jours après la naissance. À part quelques petites pièces cartilagineuses qui deviendront les osselets, l'oreille moyenne présomptive est remplie de mésenchyme plutôt que d'air, comme c'est le cas chez l'adulte (Sanchez-Villagra *et al.*, 2002). Les collicules inférieurs ne sont pas distincts à la naissance (Wang *et al.*, 1992). Différentes études utilisant des potentiels évoqués suggèrent que l'opossum commencerait à entendre vers la fin de la 4^e semaine postnatale (Aitkin *et al.*, 1997; Reimer, 1996).

Plusieurs auteurs ont proposé que l'olfaction influence les comportements précoces des marsupiaux nouveau-nés à cause de l'expression de certains marqueurs de maturité de l'épithélium olfactif (Shapiro *et al.*, 1997; Tarozzo *et al.*, 1995), de la présence d'afférences primaires olfactives atteignant les bulbes (Shapiro *et al.*, 1997; Tarozzo *et al.*, 1995), et de comportements chimiosensoriels exhibés par nouveau-nés (Schneider *et al.*, 2009; Veitch *et al.*, 2000). En effet, comme il a été mentionné plus tôt, les nouveau-nés des espèces qui ont une poche ouverte vers l'avant doivent se retourner lorsqu'ils atteignent l'ouverture du marsupium pour y pénétrer, ce qui suggère l'action de molécules, dégagées par les tétines ou l'intérieur du marsupium, qui attireraient les petits. Schneider *et al.* (2009) ont démontré que le wallaby (*Macropus eugenii*) se dirige préférentiellement vers un morceau de coton imbibé de fluides du marsupium plutôt qu'un coton contrôle. La même étude montre également que les systèmes olfactifs principal et accessoire semblent être assez développés pour permettre sa fonction chez le wallaby et chez d'autres marsupiaux (Schneider, 2011). Cependant, de nombreuses autres études montrent plutôt que le système olfactif est encore trop immature pour être fonctionnel. Le rôle du système olfactif lors de la naissance est donc encore débattu (Ashwell *et al.*, 2008; Brunjes *et al.*, 1992; Malun & Brunjes, 1994; Philpot *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1992); il est

possible que les comportements chimiosensoriels observés soient contrôlés par un autre système sensoriel, le goût par exemple. À notre connaissance, le développement fonctionnel de ce dernier sens n'a pas été étudié chez les marsupiaux nouveau-nés.

Une étude d'Adadja *et al.* (2013), effectuée sur des préparations *in vitro* de tronc cérébral et ME avec MA attachés d'opossums nouveau-nés, suggère que le système du trijumeau et le système vestibulaire sont les systèmes céphaliques qui auraient le plus d'influence sur la motricité des membres à la naissance. Les auteurs ont établi un seuil de stimulation en déterminant la plus faible intensité électrique qui permettait d'induire une extension des MA à partir de stimulation de la ME. Ils ont ensuite comparé ce seuil à l'intensité de stimulation nécessaire pour induire des mouvements similaires à partir, entre autres, du complexe vestibulaire, du ganglion du trijumeau, du bulbe olfactif et du tectum. Le tectum, qui servait de contrôle négatif, et le bulbe olfactif nécessitaient de trop fortes intensités de stimulation (respectivement 440 et 616 fois le seuil) pour penser que ces structures influencent la motricité à la naissance. Les systèmes du trijumeau et vestibulaire nécessitaient des intensités moyennes de 2 et 21 fois le seuil, respectivement, pour induire des extensions des membres antérieurs, ce qui suggère que ces systèmes peuvent influencer la locomotion, ou à tout le moins, que le ganglion du trijumeau et le complexe vestibulaire projettent déjà vers la ME cervicale à la naissance. De plus, Adadja *et al.* (2013) ont détecté, par immunohistochimie, la présence de NF200, un indicateur de maturité, dans les fibres du nerf trijumeau et dans les fibres vestibulaires.

Le système du trijumeau est responsable de l'innervation somesthésique de la face. Desmarais *et al.* (2016) ont démontré que des pressions sur la peau du museau induisent des mouvements bilatéraux et synchrones des MA sur des préparations *in vitro* d'opossums

nouveau-nés similaires à celles utilisées par Adadja *et al.* (2013). Lorsque la peau est retirée, les réponses observées sont pratiquement abolies, ce qui suggère que la réponse est médiée par les récepteurs sensoriels de la peau. À cet âge, la peau ne contient pas de récepteurs encapsulés (comme les Vater-Pacini), mais contient des cellules de Merkel, ce qui avait déjà été noté par Jones & Munger (1985). Celles-ci sont en plus grand nombre vers l'avant de la face, particulièrement au niveau du rostre (Desmarais *et al.*, 2016). Desmarais *et al.* (2016) suggèrent que le système du trijumeau, entre autres grâce aux cellules de Merkel, permet de maintenir les mouvements locomoteurs de l'animal par contact avec la peau de la mère. Ce système pourrait également jouer un rôle dans l'attachement du petit à la tétine. Des cellules de Merkel ont aussi été identifiées au niveau du rostre chez plusieurs autres espèces de marsupiaux nouveau-nés (Gemmell *et al.*, 1988), et les espèces marsupiales semblent avoir un système du trijumeau relativement bien développé à la naissance (voir Ashwell, 2015; Waite *et al.*, 1994).

L'état du système vestibulaire à la naissance chez les marsupiaux sera revu en détail au point 1.5. Brièvement, certaines des composantes du système semblent assez développées pour former un circuit reliant un des organes vestibulaires aux MN de la ME, le circuit utriculo-vestibulo-spinal (Pflieger & Cabana, 1996). Cependant, le développement fonctionnel du système vestibulaire n'a jamais été étudié chez l'opossum, ni chez d'autres marsupiaux nouveau-nés. Les rôles du système vestibulaire chez l'adulte et ses systèmes de projections descendantes relativement directs en font un excellent candidat pour influencer la locomotion pendant le développement chez les marsupiaux.

1.4 Système vestibulaire chez le mammifère adulte

Le système vestibulaire est un système sensoriel spécial dont les récepteurs périphériques sont situés dans l'oreille interne et qui sont innervés par le huitième nerf crânien, le nerf vestibulocochléaire (ou statoacoustique). Il permet de percevoir la position de la tête par rapport à la gravité et ses mouvements dans l'espace. Il joue un rôle important dans de nombreux comportements comme la stabilisation du regard et de la tête de l'animal dans l'espace en réponse à des perturbations perçues par les organes vestibulaires. Il joue également un rôle important dans le contrôle de la posture en position statique et lors de la locomotion. Ces fonctions sont permises par la structure des organes vestibulaires et par les nombreuses connexions du système vestibulaire avec d'autres structures du tronc cérébral et avec la ME (revues : Angelaki & Cullen, 2008 ; Goldberg, 2012).

1.4.1 Organes vestibulaires

L'oreille interne comprend deux parties imbriquées, le labyrinthe membraneux, interne, et le labyrinthe osseux qui épouse sa forme extérieurement. Le labyrinthe osseux est rempli d'un liquide semblable au fluide extracellulaire normal, appelé la périlymphe, et le labyrinthe membraneux de l'endolymphe, un liquide riche en potassium qui aide à la décharge des cellules sensorielles. L'oreille interne comprend la cochlée, l'organe sensoriel de l'audition, le vestibule du labyrinthe qui contient deux sacs membraneux, l'utricule et le saccule, ainsi que trois canaux semi-circulaires (horizontal, vertical antérieur et vertical postérieur) (Fig. 7).

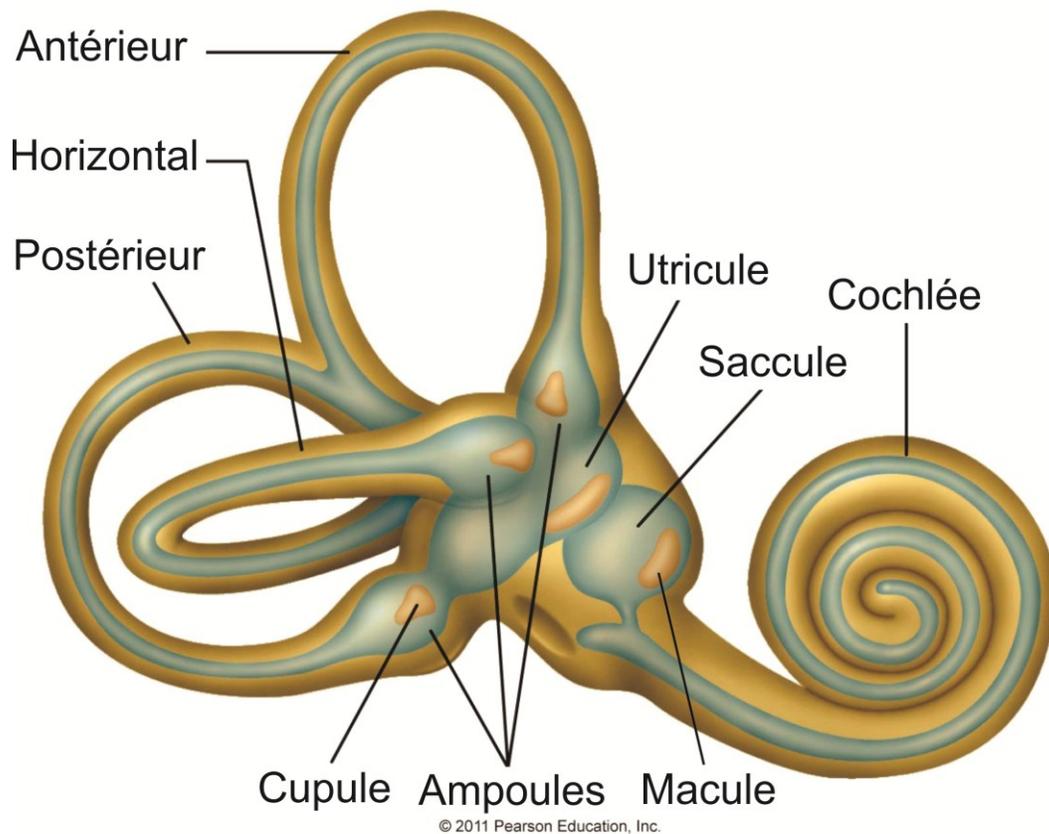


Figure 7 : Schéma de l'oreille interne chez les mammifères. Adapté de Stanfield (2012).

Les canaux semi-circulaires sont des structures tubulaires qui décrivent chacun un arc de cercle dont les extrémités débouchent dans l'utricule. Les trois canaux sont disposés de façon presque orthogonale. Chaque canal possède, à une de ses extrémités, un élargissement appelé ampoule. Les ampoules contiennent les organes sensoriels des canaux semi-circulaires, les crêtes ampoulaire. L'utricule et le saccule sont des sacs membraneux possédant chacun une région où l'épithélium est spécialisé pour la réception sensorielle, les macules utriculaire et sacculaire. La macule utriculaire est localisée dans le mur antérieur de l'utricule et est orientée

horizontalement chez l'animal au repos. La macule sacculaire est localisée dans le mur ventrolatéral du saccule et est orientée verticalement.

Les crêtes ampoulaire et les macules sont formées d'un neuroépithélium, composé de cellules réceptrices, les cellules ciliées, et de cellules de soutien. Le neuroépithélium est lui-même sous-tendu d'une fine couche de tissu conjonctif contenant les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses desservant l'organe, et couvert d'une membrane gélatineuse qui est nécessaire pour la fonction des organes. Dans le cas des canaux semi-circulaires, cette membrane est appelée cupule et est assez épaisse. Elle englobe les cils des cellules ciliées et s'attache au labyrinthe membraneux à la face opposée au neuroépithélium. Lors de mouvements angulaires de la tête, l'inertie de l'endolymphe fait en sorte que la cupule et la crête ampoulaire se déplacent selon des vecteurs différents, ce qui module l'activité des cellules ciliées. La membrane des macules est appelée la membrane otolithique (ou membrane des otoconies), car elle contient de petits cristaux de carbonate de calcium (Fig. 8) qui font en sorte qu'elle est entraînée par la gravité. Lors des mouvements de la tête, la membrane otolithique suit donc le vecteur de la gravité, et ce déplacement module l'activité des cellules ciliées.

Les cellules ciliées sont innervées par les prolongements périphériques des neurones du ganglion vestibulaire, ou ganglion de Scarpa. Les prolongements centraux de ces cellules ganglionnaires forment le nerf vestibulaire, qui rejoint le nerf cochléaire pour former le nerf vestibulocochléaire (VIII), qui pénètre dans le tronc cérébral à la jonction du myélocéphale et du métencéphale. Au niveau central, les fibres vestibulaires se divisent en collatérales ascendantes et descendantes qui innervent le complexe vestibulaire et le cervelet.

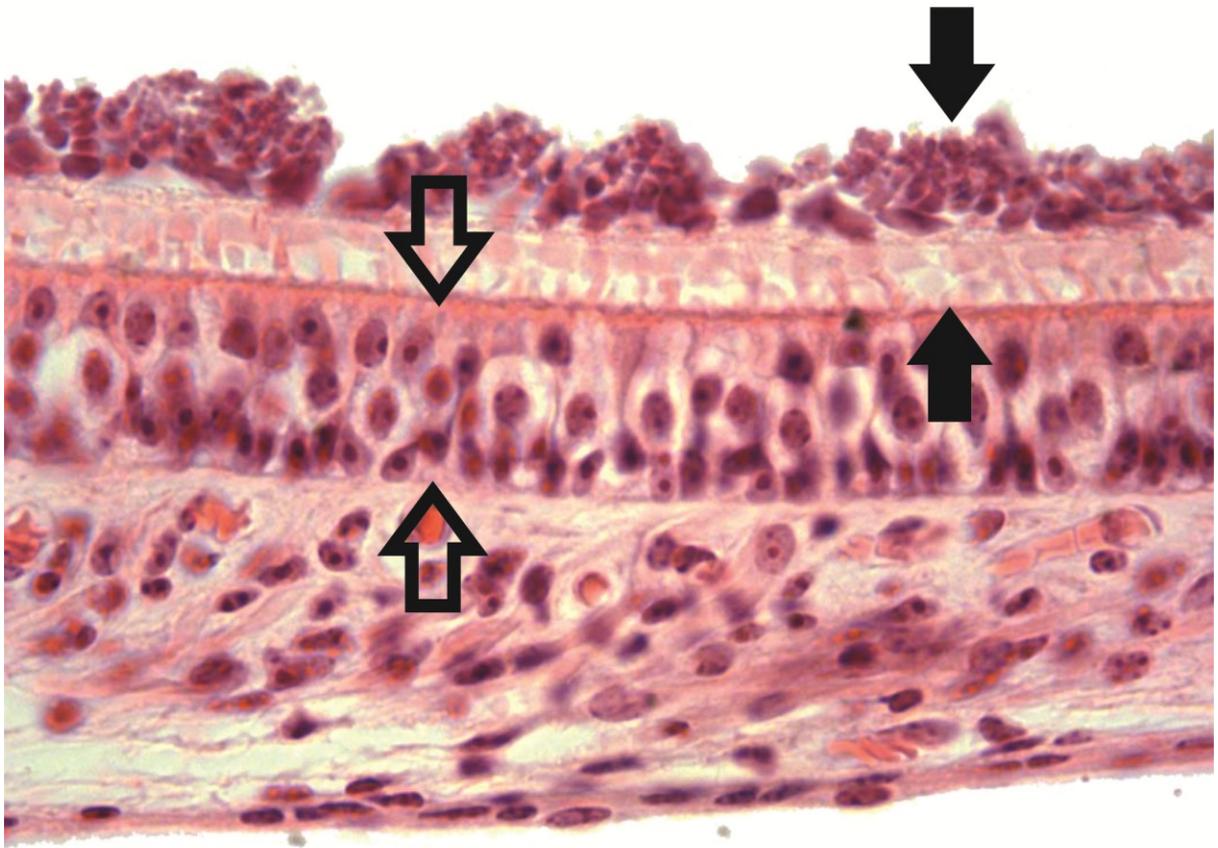


Figure 8 : Microphotographie d'une macule colorée à l'hématoxyline et éosine. La membrane des otoconies (flèches pleines) couvre le neuroépithélium (flèches évidées). Crédit photo : Jean-François Pflieger.

1.4.2 Noyaux et systèmes de projection vestibulaire

Le complexe vestibulaire peut être divisé en 4 noyaux principaux — les noyaux vestibulaires supérieur (SuVe), médial (MVe), latéral (LVe) et spinal (ou inférieur, SpVe) — ainsi que quelques noyaux de moindre importance (comme le noyau « y »). Le SuVe reçoit des afférences vestibulaires des fibres ascendantes qui poursuivent ensuite leur chemin vers le

cervelet. Le MVe et le SpVe sont principalement innervés par la branche descendante. Relativement peu d'afférences primaires vestibulaires se distribuent au niveau du LVe. Le SuVe projette principalement vers les noyaux vestibulaires controlatéraux et les noyaux oculomoteurs, innervant les muscles extraoculaires, et est fortement impliqué dans les réflexes vestibulo-oculaires (VOR). Le MVe est le plus volumineux des noyaux principaux et est aussi très impliqué dans les VOR. Il projette à la ME par la voie vestibulospinale médiale. Le LVe est le principal tributaire de la voie vestibulospinale latérale. Finalement, le SpVe, comme le MVe, projette ses axones vers la ME cervicale par la voie vestibulospinale médiale et contribue de façon mineure à la voie vestibulospinale latérale.

En raison de sa nature multimodale, le système vestibulaire partage des connexions avec un grand nombre de structures du tronc cérébral ainsi qu'avec la ME, mais il existe deux principales voies par lesquelles le complexe vestibulaire influence directement l'activité de la ME, les voies vestibulospinales latérale et médiale. La voie vestibulospinale latérale prend origine principalement de neurones du LVe, et marginalement du SpVe, voyage dans le funicule ventral et innerve les régions ventrales de la ME ipsilatérale sur toute sa longueur. Elle est impliquée dans le contrôle moteur de la musculature axiale et de celle des membres, et joue un rôle important dans le contrôle postural antigravitaire (Grillner *et al.*, 1970; Grillner & Hongo, 1972; voir Cohen *et al.*, 2017). La voie vestibulospinale médiale, quant à elle, est composée d'axones excitateurs et inhibiteurs, localisés médialement dans le funicule ventral, qui innervent des MN et interneurons de la ME cervicale bilatéralement. Elle prend origine principalement du SpVe, et moindrement des MVe et LVe, et permet un contrôle vestibulaire de la musculature du cou. Elle joue aussi un rôle dans la coordination cervico-oculaire.

Le système vestibulaire peut également exercer un contrôle indirect des MN de la ME par ses connexions avec la formation réticulée. La formation réticulée reçoit des inputs directement des noyaux vestibulaires (Peterson & Abzug, 1975 ; Peterson *et al.*, 1975) ainsi qu'indirectement par le noyau fastigial du cervelet chez l'adulte. Deux voies réticulospinales principales sont décrites, les voies latérales et médiales. Ces deux voies sont bilatérales et innervent la ME jusqu'aux segments lombaires.

Le système vestibulaire chez l'adulte marsupial est essentiellement identique à celui de l'adulte placentaire. Une étude de Henkel & Martin (1977 a et b) décrivant extensivement la structure du système vestibulaire et ses systèmes de projections chez l'opossum *Didelphis virginia* en arrive à la conclusion que le système vestibulaire est similaire à ce qui a été décrit pour le chat. En ce qui a trait à l'opossum *M. domestica*, une étude de Pflieger & Cabana (1996) décrit également le système vestibulaire de l'adulte comme étant similaire à celui des placentaires.

1.5 Développement du système vestibulaire chez les marsupiaux

Hartman (1920) a été le premier à souligner le fait que les nouveau-nés *D. virginia* manifestent un géotropisme négatif, c'est-à-dire qu'ils grimpent vers le haut peu importe l'orientation de la mère. La même observation a également été faite chez le quokka, *Setonix brachyurus*, par Cannon *et al.* (1976) qui avaient déclaré que la gravité est le seul guide du jeune quokka, même s'ils voyaient le système vestibulaire comme trop immature pour expliquer le géotropisme négatif. Ils suggéraient alors que le géotropisme pouvait être expliqué par une

action des propriocepteurs du cou, sans donner de détails fonctionnels, ou que le poids de la partie postérieure du corps de l'animal, inerte et entraînée par la gravité, orienterait passivement la tête du nouveau-né vers le haut.

Sur la base d'une étude anatomique et comparative du développement du système vestibulaire chez les monotrèmes, marsupiaux et placentaires, Ashwell & Shulruf (2014) ont montré que le stade de développement du système vestibulaire est corrélé à la longueur du corps de l'animal, ce qui suggère qu'il n'est pas précoce chez les marsupiaux par comparaison aux placentaires. En effet, chez les placentaires étudiés, la souris, le rat et l'humain, les stades de développement définis par Ashwell & Shulruf (2014) sont observés dans le même ordre et à des longueurs corporelles similaires à chez les marsupiaux. Chez tous les marsupiaux étudiés sauf les Dasyuridae, on peut distinguer un utricule, un saccule et les trois canaux semi-circulaires dès la naissance, mais dans tous les cas, les noyaux vestibulaires sont peu différenciés. À la naissance, les Dasyuridae ont un système vestibulaire moins bien développé que les autres familles de marsupiaux, seul l'utricule est présent, les canaux semi-circulaires sont encore en formation et le saccule n'est pas distinct du labyrinthe membraneux (Gemmell & Nelson, 1989; 1992).

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'utricule est l'organe sensoriel du système vestibulaire le moins immature à la naissance. À la naissance chez *M. domestica* (Pflieger & Cabana, 1996), *D. virginia* (Krause, 1991), un wallaby, *Macropus eugenii* (McCluskey *et al.*, 2008) et même un Dasyuridae, le chat marsupial *Dasyurus hallucatus* (Gemmell & Nelson, 1989; 1992), un utricule distinct possédant des cellules ciliées et une membrane otolithique est présent à la naissance, alors que le saccule et les canaux semi-circulaires atteignent un niveau de développement semblable quelques jours plus tard. De plus, l'utricule est innervé par le

ganglion vestibulaire (Krause, 1991), qui projette lui-même vers les noyaux vestibulaires (McCluskey *et al.*, 2008; Pflieger & Cabana, 1996), déjà chez les nouveau-nés. De larges complexes synaptiques peuvent être observés dès la naissance directement sous les cellules ciliées de la macule utriculaire chez *D. hallucatus* (Gemmell & Nelson 1989) et vraisemblablement chez les autres groupes de marsupiaux, puisque le développement de leur système vestibulaire est généralement plus avancé.

Les noyaux vestibulaires sont peu différenciés à la naissance chez les marsupiaux, mais lorsqu'une description en est donnée, les auteurs désignent le LVe comme étant le mieux développé (McCluskey *et al.*, 2008; Pflieger & Cabana, 1996). Chez le wallaby (McCluskey *et al.*, 2008) et l'opossum *M. domestica* (Pflieger & Cabana, 1996), des études de traçage anatomique ont démontré que le MVe, SpVe et LVe, ainsi que le cervelet présomptif reçoivent des afférences primaires des organes vestibulaires. De plus, chez *M. domestica*, les fibres innervant l'utricule et les noyaux vestibulaires sont immunoréactives (ir) pour NF200, une protéine indicatrice de maturité axonique, tel que déjà mentionné (Adadja *et al.*, 2013).

Suite à l'application de DiI, un traceur neuronal, dans le labyrinthe de l'opossum nouveau-né, Pflieger & Cabana (1996) ont observé des fibres marquées traversant la ligne médiane pour pénétrer dans le labyrinthe contralatéral. Ils ont également observé un groupe de cellules, marquées de façon rétrograde, dans la formation réticulée près de la ligne médiane. Le marquage de ces fibres diminue à partir de P15 et elles ne sont plus visibles chez l'adulte. De telles fibres commissurales transitoires ont aussi été observées chez le wallaby après application de DiI dans le labyrinthe et sur des coupes colorées à l'argent (Fig. 9; McCluskey *et al.*, 2008), mais elles disparaissent avant P5. Dans les deux cas, les auteurs ont suggéré que ces fibres

commissurales vestibulaires pourraient permettre de coordonner l'activité locomotrice des nouveau-nés alors qu'ils grimpent jusqu'à la tétine.

Chez *M. domestica*, Pflieger & Cabana (1996) ont effectuée des études de traçage neuronal par application de DiI dans la ME cervicale moyenne à caudale. Des neurones, marqués de façon rétrograde, ont été observés principalement dans le LVe ipsilatéral, mais aussi dans le LVe contralatéral, le MVe et le SuVe. Wang *et al.* (1994) ont également démontré la présence de projections vestibulospinales à la ME cervicale provenant du LVe. Chez le wallaby, aucune projection vestibulospinale n'a été observée à la naissance (McCluskey *et al.*, 2008). Il est possible que des projections vestibulospinales du LVe soient déjà présentes chez le wallaby nouveau-né, mais que les injections de DiI au niveau C6-7 aient été faites trop caudalement pour les dévoiler. Par comparaison, les voies vestibulospinales atteignent la ME cervicale entre E13-14 chez le rat (Auclair *et al.*, 1993; De Boer-van Huizen & Ten Donkelaar, 1999; Kudo *et al.*, 1993; Lakke, 1997) ce qui correspondrait environ à la naissance chez l'opossum. Des fibres réticulospinales ont été observées chez le wallaby par McCluskey *et al.* (2008) de même que chez l'opossum par Pflieger & Cabana (1996). Dans les deux cas, les auteurs suggèrent que le système vestibulaire pourrait exercer un contrôle indirect sur l'activité locomotrice au travers de la formation réticulée.

Finalement, Gingras & Cabana (1999) ont étudié la localisation de trois protéines synaptiques dans la ME d'opossums en développement. Du marquage a été observé dans la matière blanche présomptive chez le nouveau-né, particulièrement au niveau du renflement cervical dans les régions ventrales et ventro-latérales, ce qui correspond aux régions où passent les voies vestibulospinales et réticulospinales. La présence de ces protéines synaptiques chez l'opossum nouveau-né indique que la synaptogenèse de ces voies est déjà commencée à la

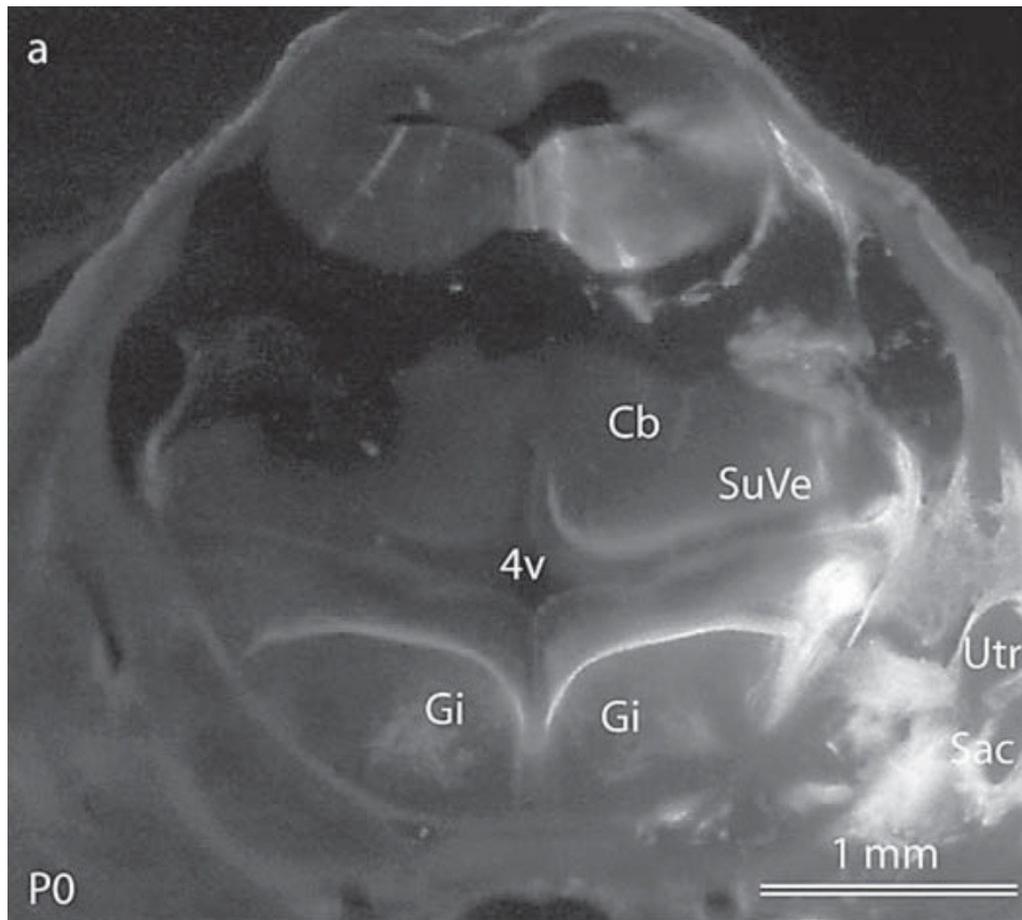


Figure 9 : Section transverse du tronc cérébral de nouveau-né de wallaby après injection de Dil dans le labyrinthe droit. On peut observer les fibres commissurales traversant la ligne médiane jusqu'à la bordure du tronc gauche, ainsi que les corps cellulaires marqués dans la formation réticulée. Adapté de McCluskey *et al.* (2008). 4v : 4^e ventricule, Cb : cervelet présumé, Gi : noyau gigantocellulaire de la formation réticulée, Sac : saccule, SuVe : noyau vestibulaire supérieur, Utr : utricule.

naissance, du moins au niveau du renflement cervical, et suggère que des synapses pourraient être présentes dès la naissance ou peu après. En effet, on observant la matière grise ventrale du renflement cervical en microscopie électronique, Gingras & Cabana (1999) rapportent avoir

observé des structures ressemblant à des synapses, quoiqu'immatures et en faible nombre, sur les dendrites de présumés motoneurones. Chez des ratons de P0 à P5, Kasumacic *et al.* (2010) ont observé une organisation des connexions vestibulospinales similaire à celle qui est observée chez l'adulte. Puisque les voies vestibulospinales arrivent à la moelle cervicale entre E13 et E14 chez le rat, une portion importante de la synaptogenèse s'effectuerait entre environ E14 et la naissance, ce qui correspondrait grossièrement à la période entre la naissance et P7 chez l'opossum.

En résumé, malgré le fait que le développement du système vestibulaire ne semble pas être adapté à une naissance précoce chez les marsupiaux, il est possible qu'il soit au moins partiellement fonctionnel à la naissance. L'utricule possède des cellules ciliées et une membrane otolithique et est directement connecté avec les noyaux vestibulaires, qui projettent eux-mêmes vers la ME cervicale. Il existe donc une voie nerveuse utriculo-vestibulo-spinale dès la naissance, au moins chez *M. domestica*. De plus, la formation réticulée, qui reçoit indirectement des afférences vestibulaires par les noyaux vestibulaires, pourrait également influencer la locomotion grâce aux voies réticulospinales. Chez le wallaby et l'opossum, un faisceau de fibres commissurales présent à la naissance pourrait permettre de coordonner les mouvements des petits. Finalement, l'expérience électrophysiologique d'Adadja *et al.* (2013) mentionnée plus tôt démontre que des stimulations électriques de relativement faible intensité peuvent provoquer des mouvements des MA, ce qui suggère que les fibres de la voie vestibulospinale font synapses sur les MN de la ME cervicale. Ceci est supporté par le fait que des protéines synaptiques ont été détectées dans les régions où passent les voies vestibulospinales et réticulospinales et que des synapses ont été observées au niveau des motoneurones du renflement cervical (Gingras & Cabana, 1999). En somme, l'état de développement du système vestibulaire à la naissance chez

les marsupiaux, ou du moins chez *M. domestica*, pourrait possiblement permettre un contrôle limité des comportements moteurs. Pour mieux comprendre le développement fonctionnel du système vestibulaire, nous avons d'abord utilisé un anticorps contre c-Fos, une protéine qui est largement utilisée comme indicateur de l'activité neuronale.

1.6 c-Fos en tant qu'indicateur d'activité neuronale

La protéine c-Fos est encodée par le gène c-fos, qui entre dans la catégorie des « *Immediate Early Genes* » (IEG) qu'on pourrait traduire par « gènes à réponse précoce ou à expression précoce immédiate ». La principale caractéristique des IEG est leur activation presque immédiate en réponse à des stimuli externes, qui survient dans les premières secondes et minutes suivant un stimulus externe, et ce, avant la synthèse de nouvelles protéines. L'expression des IEGs est principalement contrôlée par des cascades de signalisations cellulaires enclenchées par une modification de l'activité de seconds messagers intracellulaires, menant à l'expression de leur ARN messagers, puis à la traduction de la protéine qu'ils encodent. La plupart des protéines encodées par les IEGs sont des facteurs de transcription, c'est-à-dire des protéines qui régulent l'expression d'autres gènes. La modification de l'expression des gènes régulés par les IEGs permet d'apporter des changements phénotypiques à long terme dans la cellule. Les IEGs sont donc considérés comme un lien entre la réponse rapide d'une cellule à des stimuli et les changements à long terme qui sont apportés à la cellule en réponse à ces stimuli (voir Morgan & Curran, 1989 ; Sheng & Greenberg, 1990).

c-fos est un des premiers IEGs à avoir été découvert (voir Sheng & Greenberg, 1990), la protéine c-Fos qu'il encode est un facteur de transcription qui forme un hétérodimère avec c-jun, le produit d'un autre IEG. Cet hétérodimère forme un complexe spécifique aux sites de liaison AP-1 d'éléments de régulation de l'expression de plusieurs gènes. Il existe deux principaux facteurs de transcription qui régulent l'expression de c-Fos, CREB et les SRF (revue dans Kovacs, 1998). Une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut induire l'expression de c-Fos (Bading *et al.*, 1993) par, entre autres, la cascade de signalisation des MAP kinases qui phosphoryle le facteur de transcription CREB qui est exprimé constitutivement dans le noyau. CREB peut alors activer l'expression de c-fos par liaison de l'élément régulateur CRE. CREB peut également être phosphorylé par des kinases en réponse à une augmentation de la concentration d'AMP cyclique dans la cellule (Sassone-Corsi *et al.*, 1988 a). Autrement, la liaison des facteurs de croissance à des récepteurs à la surface de la cellule peut enclencher une cascade de signalisation qui active SRF, un facteur de transcription, qui peut également réguler l'expression de c-Fos.

Une augmentation de l'activité neuronale est souvent associée à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, notamment si elle implique l'ouverture de canaux à NMDA perméables au calcium ou de canaux calciques voltage dépendants. Comme il a été dit plus haut, une telle augmentation du calcium intracellulaire peut induire l'expression de c-Fos. L'ARNm de c-fos est détectable dans les neurones de quelques minutes à environ 30 minutes après une stimulation, et la protéine c-Fos est normalement détectable de 1 à 2 h après une stimulation (Kovacs, 1998). En étudiant l'expression de c-Fos dans le cadre d'un protocole de stimulation ciblée, on peut donc déterminer quels neurones ont été activés et, ainsi, inférer ceux qui répondent le plus spécifiquement à la stimulation. C'est ainsi que, par exemple, c-Fos a été utilisé comme

indicateur d'activité neuronale dans le but d'étudier la localisation des neurones impliqués dans la genèse du rythme locomoteur chez le chat (Dai *et al.*, 2005), de comparer les effets de la dopamine et du glutamate sur les neurones du striatum (Berretta *et al.*, 1992), d'étudier les régions de l'encéphale qui sont impliqués dans la réponse au stress chronique (Chen & Herbert, 1995), de comparer la réponse des neurones sensoriels de la ME à différentes stimulations de la peau (Hunt *et al.*, 1987), d'étudier la plasticité audiovisuelle du cortex visuel primaire (Piché *et al.*, 2007), de déterminer l'âge auquel les neurones vestibulaires répondent à différentes formes de stimulations (Lai *et al.*, 2004; 2010; Lai *et al.*, 2006), et bien d'autres études encore. En effet, c-Fos présente plusieurs avantages en comparaison à d'autres marqueurs d'activité (voir Kovacs, 1998; 2008), notamment sa faible expression dans la cellule au repos et le fait que son expression est largement répandue dans le SNC en réponse à une forte activité neuronale. Cependant, lorsqu'on utilise c-Fos comme marqueur d'activité neuronale, il faut garder à l'esprit deux problèmes potentiels : que l'expression de c-Fos peut être induite en absence d'activité neuronale et que c-Fos peut ne pas être exprimé par des neurones stimulés.

Dans le premier cas, puisque le Ca^{2+} et l'AMPC sont des seconds messagers employés par une grande variété de mécanismes cellulaires, c-Fos peut être exprimé en l'absence d'excitation neuronale et chez une grande variété de types cellulaires autres que des neurones, comme on peut le constater dans les exemples qui suivent. Tel que mentionné, des facteurs de croissance peuvent induire l'expression de c-Fos chez plusieurs types de cellules (Kruijer *et al.*, 1984; Muller *et al.*, 1984). Cette induction de c-Fos par SRF n'aurait pas d'incidence sur le taux de décharge d'un neurone. Pendant le développement, c-Fos peut donc être exprimé en réponse aux facteurs de croissance qui favorisent la synaptogenèse ou la croissance des axones par exemple. L'activation du gène c-fos a été observée dans les cellules gliales et possiblement les

microglies suivant un choc excitotoxique causé par une injection excessive de glutamate (Walker & Carlock, 1993). L'ARNm de c-Fos est exprimé par ces cellules jusqu'à 24 h après le choc initial, bien après la mort des neurones. L'activation des récepteurs dopaminergiques de type D1 peut aussi induire une expression de c-Fos chez un neurone par une augmentation des niveaux d'AMPC intracellulaires (Berretta *et al.*, 1992). Or, bien que l'activation de ce type de récepteur favorise la dépolarisation du neurone, c-Fos sera exprimé par le neurone même si un potentiel d'action n'est pas généré.

Dans le second cas, c-Fos peut ne pas être exprimé chez un neurone qui présentait une forte activité. Il a été montré qu'un changement dans l'activité afférente au neurone est nécessaire pour induire une expression de c-Fos et qu'une simple dépolarisation du neurone est souvent insuffisante pour que c-fos soit activé (revue dans Kovacs, 1998). Par exemple, un neurone qui exprime c-Fos en réponse à une activation synaptique ne l'exprime pas forcément lorsque des stimulations antidromiques sont utilisées (Luckman *et al.*, 1994). Or, une activation synaptique d'un neurone n'induit pas toujours une expression de c-Fos puisque une étude a montré que des neurones du gyrus dentelé qui présentaient de la potentialisation à long terme (LTP, *Long Term Potentiation*), suite à de courtes stimulations à très haute fréquence, n'exprimaient pas c-Fos (Douglas *et al.*, 1988). De plus, le gène c-fos est lui-même régulé par un site de liaison d'AP-1 inhibiteur, ce qui signifie que l'expression de c-Fos forme une boucle de rétroaction négative qui inhibe sa propre expression (Sassone-Corsi *et al.*, 1988 b). De ce fait, il existe une période réfractaire, après une forte activité, pendant laquelle un neurone n'exprime pas de c-Fos, ou l'exprime de façon réduite. Pour cette raison, pour obtenir une bonne expression de c-Fos lors d'études immunohistochimiques, il faut s'assurer que le système étudié soit au repos dans les heures précédant les stimulations.

1.7 Problématique

Vu l'état de développement du système vestibulaire à la naissance, particulièrement en ce qui a trait à la présence d'une voie utriculo-vestibulo-spinale, et le géotropisme négatif exhibé par plusieurs espèces marsupiales, il semblerait que le système vestibulaire puisse être l'un des sens qui influence les comportements moteurs chez les nouveau-nés marsupiaux. Cependant, mise à part l'étude d'Adadja *et al.* (2013), qui utilisait des stimulations électriques des noyaux vestibulaires sur des préparations *in vitro* d'opossums âgés de moins de 12 h, le développement fonctionnel du système vestibulaire n'a jamais été étudié chez les marsupiaux et son état fonctionnel à la naissance en conditions normales n'est donc pas connu.

Même si des données anatomiques suggèrent que le développement anatomique du système vestibulaire se fait de manière similaire chez les marsupiaux et les placentaires (au moins le rat) (Ashwell et Shulruf, 2013), notamment en ce qui a trait au développement des organes vestibulaires et des voies vestibulospinales (voir 1.5), les comparaisons fonctionnelles avec les mammifères placentaires sont difficile à établir, car il n'existe que peu d'étude abordant cette question. Toutefois, une série d'expériences sur des préparations *in vitro* de rat nouveau-nés (P0-P5) montrent que des stimulations électriques du nerf vestibulaire entraînent des réponses motrices au niveau de la ME (Kasumacic et al., 2010) ce qui indique que les voies nerveuses entre le labyrinthe et la ME deviennent fonctionnelles avant la naissance chez cette espèce.

En utilisant un modèle qui offre un accès facile à des stades de développement plus précoces, l'opossum, nous avons étudié le développement fonctionnel de ce système pour

apporter des éléments de réponse à la question de l'influence du système vestibulaire sur les comportements moteurs chez les marsupiaux nouveau-nés ainsi que, de manière plus générale, pour mieux comprendre le développement précoce de ce système chez les mammifères. Pour ce faire, nous avons commencé par soumettre des opossums âgés du jour de la naissance à P21 à des stimulations vestibulaires *in vivo*, et étudié le développement de l'expression de c-Fos, utilisé en tant qu'indicateur de l'activité neuronale, dans les noyaux vestibulaires.

Pour tester la possibilité que l'expression, ou l'absence, de c-Fos puisse ne pas être causée par l'activité vestibulaire en réponse aux stimulations (voir 1.6), nous avons voulu corroborer les résultats c-Fos par une mesure plus directe des réponses du système vestibulaire à des stimulations au cours du développement. Pour ce faire, nous avons fait subir des élévations de la tête à des préparations *in vitro* de tronc cérébral et ME avec MA attachés d'opossums d'âges variant de la naissance à P13. L'activité du triceps de l'animal était enregistrée afin de détecter d'éventuelles réponses motrices.

Afin d'étudier le développement des organes vestibulaires, et pour déterminer à partir de quel âge de fortes stimulations de ceux-ci peuvent induire une réponse du système vestibulaire, nous avons appliqué des pressions directement sur le labyrinthe de préparations *in vitro* de tronc cérébral et ME d'opossums âgés de P1 à P9, afin de stimuler mécaniquement les organes vestibulaires. L'activité des racines ventrales de la ME cervicale était enregistrée afin de détecter d'éventuelles réponses motrices des préparations.

2 Matériel et Méthode

Les opossums utilisés sont issus d'un élevage maintenu à l'Université de Montréal dans des conditions optimisées pour *M. domestica* (voir Desmarais *et al.*, 2016; Vandeberg & Williams-Blangero, 2010). Les opossums sont gardés dans des salles où l'éclairage est contrôlé automatiquement selon un cycle journalier de 12 h de luminosité et 12 h d'obscurité. Toutes les expériences présentées dans ce mémoire ont été commencées en début de journée, quelques heures après le début de la période de luminosité, à un moment où les opossums sont normalement au repos. Les expériences présentées respectent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'UdeM.

Les opossums adultes peuvent être agressifs en cohabitation, ils sont donc normalement gardés dans des cages individuelles. Pour effectuer les accouplements, les opossums sont placés en couple dans de grandes cages, séparés par un grillage en métal pendant les cinq à sept premiers jours. Cette période permet aux opossums de s'habituer à la présence de leur partenaire, ce qui diminue les agressions, et de déclencher l'œstrus de la femelle. Le grillage est ensuite retiré afin de mettre les animaux en contact pendant quatre jours avant qu'ils ne soient remis dans des cages individuelles. Treize jours après la mise en contact des opossums, la présence de petits est vérifiée quotidiennement sur la mère pendant une semaine. Les premières 24 h après la naissance sont considérées comme le jour postnatal 0 ou P0.

2.1 Immunohistochimie c-Fos

Des opossums, âgés du jour de la naissance à P21, ont été soumis à de relativement faibles stimulations vestibulaires à l'aide d'un nutator, puis les tissus du tronc cérébral des spécimens ont été traités par immunohistochimie avec un anticorps contre c-Fos, utilisé comme indicateur d'activité neuronale. Cette expérience est grandement inspirée d'études du développement vestibulaire effectuées chez le rat utilisant c-Fos comme indicateur de l'activité neuronale en réponse à des rotations verticales désaxées (Lai *et al.*, 2004), qui s'apparentent aux stimulations décrites ici-bas, et en réponse à des accélérations linéaires verticales (Lai *et al.*, 2006).

2.1.1 Stimulations à l'aide du nutator

Un total de 34 opossums ont été stimulés (3 P0, 7 P5, 7 P11, 3 P15, 5 P16, 6 P18 et 3 P21) et 18 opossums ont servi de contrôles (3 P0, 3 P5, 5 P11, 4 P16 et 3 P18). Les animaux expérimentaux ont été immobilisés dans de la gaze attachée dans un vase de pétri et les stimulations ont été effectuées en attachant le pétri à un nutator (Clay Adams Brand; Fig. 10), un dispositif comportant une plaque qui effectue des rotations verticales désaxées de 20° à une fréquence de 0,4 Hz (24 rotations/minute). Les mouvements que le nutator effectue ressemblent à ceux des dispositifs OVAR, utilisés dans plusieurs études du système vestibulaire (e.g. Lai *et al.*, 2004). Ces mouvements ont été jugés comme suffisants pour stimuler le système vestibulaire sans toutefois être trop différents des mouvements que subissent les petits lorsqu'attachés au

ventre de la mère. La température ambiante autour de l'appareil était maintenue entre 24-28 °C. Après 1 ou 2 h de traitement, selon les individus, les animaux ont été profondément anesthésiés par hypothermie en étant placés à -20 °C pendant 2 à 6 minutes, selon leur taille, avant d'être euthanasiés rapidement par décapitation. Les animaux contrôles provenaient des mêmes portées que les animaux stimulés et ont été laissés immobiles horizontalement pendant 1-2 h près du nutator avant d'être anesthésiés et sacrifiés.

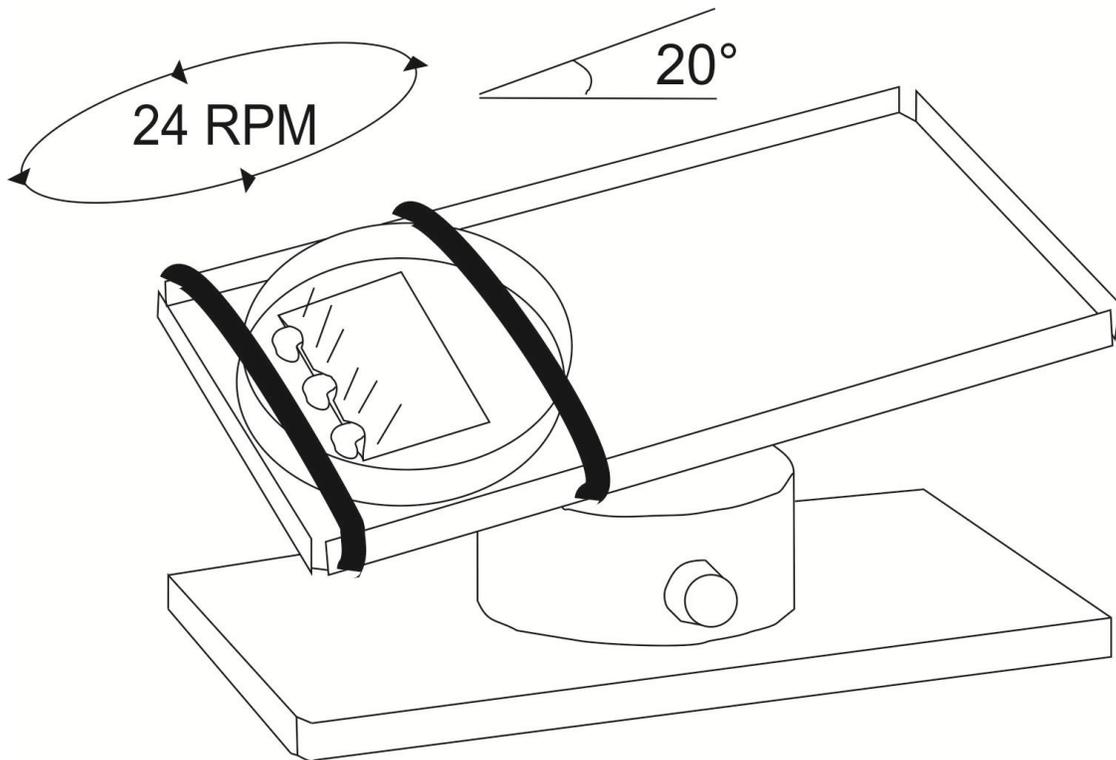


Figure 10 : Schéma du nutator, le dispositif utilisé pour stimuler le système vestibulaire.

2.1.2 Préparation des tissus et traitement immunohistochimique

Après décapitation, la mâchoire, la langue, la peau et le cartilage du dessus du crâne ont été retirés et une hémisphérectomie a été pratiquée pour faciliter la pénétration des tissus par l'agent de fixation, soit une solution de paraformaldéhyde 2 % (2 % formaldéhyde, tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4). Après 1 ou 2 jours, chaque tête était transférée une solution de sucrose 30 % (30 % sucrose, tampon phosphate 0,2 M, pH 7,4), comme cryoprotecteur, pendant 1 ou 2 jours, puis immergée dans de l'O.C.T (Optimal Cutting Temperature compound, Tissue Tek Sakura) rapidement refroidi sur glace sèche, et entreposée à -80 °C. Les tissus ont été débités en coupes de 20 µm à l'aide d'un cryostat (LeicaCM3050S) puis les coupes étaient apposées sur des lames Superfrost Plus (Fisherbrand) et conservées à 4 °C.

Les étapes du traitement immunohistochimique qui suivent ont été effectuées à la température de la pièce sauf lorsque autrement spécifié. Les coupes ont été d'abord hydratées à l'aide d'un tampon TBST (Tris buffer 0,05 M, NaCl 1,5 %, Triton X-100 0,3 %, pH 7,4) pendant 20 minutes, puis incubées pendant 24 h à 4 °C dans la solution de TBST contenant un anticorps IgG monoclonal de lapin dirigé contre c-Fos (1 :200, Cell Signaling Technology) et 5 % de sérum normal de chèvre (NGS). Les coupes ont ensuite été lavées cinq fois pendant 10 minutes dans la solution de TBST, puis incubées pendant 2 h dans la solution de TBST contenant un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome (1 : 400, Alexa-Fluor 488, Molecular probes) et 5 % NGS. Les coupes ont ensuite été lavées trois fois pendant 20 minutes : une fois à l'aide de TBST, puis deux fois à l'aide de TBST contenant quelques gouttes de HCl.

Finalement, les coupes ont été recouvertes de Fluoromount G (SouthernBiotech) et d'une lamelle, puis conservées à 4 °C.

Des contrôles omettant l'anticorps primaire ont été effectués lors de l'optimisation du protocole d'utilisation de l'anticorps c-Fos et se sont avérés concluants, c'est-à-dire qu'aucun marquage n'a été observé chez les spécimens contrôles dans des régions où du marquage c-Fos était observé chez les spécimens expérimentaux.

2.1.3 Observation et traitement des résultats

Les coupes ont été observées au microscope à fluorescence (Olympus BX61WI) sous un filtre FITC (bande d'excitation : 450-490 nm, pic d'émission : 520 nm) à la recherche de karyons de cellules ir pour c-Fos. Les spécimens étaient considérés comme ayant réagi aux stimulations lorsque plus de deux karyons ir étaient observés dans au moins un des noyaux vestibulaire d'un seul côté, sur au moins trois coupes successives. De plus, la quantité de karyons ir dans chacun des noyaux vestibulaires a été notée pour chaque coupe.

Des coupes d'intérêt ont été photographiées à l'aide d'une caméra digitale (Retiga 2000R Qimaging) contrôlée par un logiciel d'acquisition d'images (Image Pro Plus 7.0 Media Cybernetics). Des images complètes de coupes d'intérêt ont été reconstruites à l'aide de Corel Draw X6 (Corel Corporation). Le même programme a été utilisé pour tracer les contours des régions et structures d'intérêt et modifier le contraste et la luminosité le cas échéant. La localisation des noyaux vestibulaires et autres structures du SNC chez l'opossum en

développement a été vérifiée à l'aide de l'atlas du cerveau de rat en développement de Paxinos *et al.* (1991) et celui du cerveau du wallaby en développement d'Ashwell (2010).

2.2 Élévation de la tête

Des préparations *in vitro* de tronc et ME avec MA attachés d'opossums âgés de P4 à P12 ont été soumises à des élévations de la tête alors que l'activité d'un triceps était enregistrée. Tous les nerfs crâniens des préparations, sauf les nerfs vestibulo-cochléaires et faciaux, avaient été sectionnés. Les expériences ont d'abord été effectuées chez quatre spécimens (1 P4*, 1 P6*, 1 P9* 1 P12*) ayant tous les nerfs rachidiens intacts. Ces expériences ont montré que la tension exercée sur le cou lors d'élévation répétée de la tête pourrait activer des récepteurs sensoriels innervés par les nerfs rachidiens. Les expériences ont été répétées chez six autres spécimens (1 P8, 1 P9, 2 P11, 2 P12), suivant la section des trois premières paires de nerfs rachidiens.

2.2.1 Préparation des spécimens

Les préparations *in vitro* s'inspirent de celles développées au laboratoire (Adadja *et al.*, 2013; Desmarais *et al.*, 2016; Lavallée et Pflieger, 2009). Chaque animal a d'abord été anesthésié puis la mâchoire a été retirée. Après éviscération, une section au niveau de la dernière vertèbre thoracique a été réalisée avant de plonger le spécimen dans une boîte de pétri, dont le fond était recouvert de Sylgard (Dow Corning), et remplie de solution physiologique (125 mM

NaCl; 3 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 1 mM NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂ et 15 mM dextrose) préalablement oxygénée, titrée (pH 7,4) et refroidie à 4 °C. La peau du dessus de la tête et du dos a alors été retirée, puis l'encéphale a été exposé par une craniotomie. Après retrait des hémisphères cérébraux suite à une section devant le diencephale, une laminectomie a permis d'exposer la ME jusqu'au niveau thoracique. La peau et les muscles du cou et de la tête ont été retirés. Le diencephale, le mésencéphale, le cervelet et les méninges ont été réséqués puis le museau de l'animal a été coupé pour faciliter la circulation du liquide physiologique. Tous les nerfs crâniens sauf les nerfs vestibulo-cochléaire et les nerfs faciaux ont été sectionnés et la peau et le fascia des MA ont été retirés pour exposer les muscles sous-jacents. Finalement, le spécimen a été solidement épinglé au Sylgard, du cou jusqu'au niveau thoracique, pour minimiser ses mouvements, mais la tête était laissée libre, à l'horizontale. La boîte de pétri contenant le spécimen a été placée sous un microscope. Une pompe péristaltique (Watson-Marlow) servait à renouveler constamment le bain avec de la solution physiologique oxygénée à température de la pièce (20-24 °C).

2.2.2 Stimulations par élévation de tête et enregistrements

Après une période de récupération de 30 min à 1 h, une microspatule métallique a été placée sous la tête. La spatule était prolongée d'un manche lui-même inséré dans un micromanipulateur permettant d'imprimer manuellement des mouvements de haut en bas. Sous contrôle visuel, la tête était ainsi soulevée puis rabaissée de manière à induire une rotation verticale du cou d'au moins 45-60° (Fig. 11). La stimulation complète, incluant le soulèvement

puis rabaissement de la tête, durait environ trois secondes. Les stimulations ont été faites de sorte à maximiser l'amplitude du mouvement de la tête, donc de stimuler au maximum le système vestibulaire, particulièrement l'utricule, qui répond à des perturbations par rapport au vecteur de gravité (voir 1.4.1), tout en minimisant les mouvements du cou et du corps de l'animal.

Une électrode à succion fabriquée à partir d'un capillaire de verre à paroi mince (Diamètre externe : 1,2 mm; interne : 0,6 mm; A-M systems), étiré afin d'obtenir une ouverture d'un diamètre de 60 à 80 μm à l'aide d'une étireuse à pipette (P-97, Sutter Instrument), a été placée sur un triceps. Le triceps a été choisi parce que c'est le plus gros muscle des MA de l'opossum et qu'il est responsable de l'extension des avant-bras, mouvement qui fait partie intégrante de l'activité motrice des nouveau-nés (Desmarais *et al.*, 2016; Hughes & Hall, 1988; Pflieger *et al.*, 1996). Cinq stimulations ont ensuite été effectuées, en laissant un temps de repos de cinq minutes entre les stimulations. L'activité musculaire a été enregistrée par l'électrode connectée à un module d'entrée à haute impédance (HZP, Grass Technologies) (Fig. 11). Le début de la stimulation a été enregistré en parallèle sous la forme d'un artefact généré par une pédale. Les deux signaux — l'activité musculaire et les artefacts de stimulation — ont été amplifiés (10 000X; Grass CP511 AC Amplifier, Grass Technologies) et filtrés (bande passante : 3 Hz à 3 KHz) avant d'être numérisés (Digidata 1322A, Axon instruments). L'acquisition et l'enregistrement des données ont été réalisés grâce au logiciel Clampex 9,2 (Axon instruments).

Suite à des expériences préliminaires durant lesquelles nous n'avons pas observé de mouvements des MA en réponse aux stimulations, des électrodes à succion ont été utilisées, en place de fils d'argent comme il était utilisé pour les enregistrements des triceps par Desmarais

et al. (2016), afin d'augmenter le rapport signal bruit pour détecter d'éventuelles réponses trop faibles pour induire des mouvements des muscles. La viabilité de la préparation et la qualité du signal étaient occasionnellement vérifiées en appliquant une pression sur la main de l'animal, ce qui élicitait presque systématiquement une réponse clairement visible dans les enregistrements (voir Fig. 14 C).

2.2.3 Traitement et analyse des résultats

Les tracés d'enregistrement ont été rectifiés et analysés à l'aide du logiciel Clampfit 10.6. Une déflexion du tracé EMG était considérée comme une réponse à la stimulation si elle a) suivait de près l'artefact de stimulation (donné par la pédale), b) correspondait à une déflexion du tracé ayant une amplitude supérieure à deux fois l'amplitude moyenne du signal enregistré dans les 10 secondes précédant la stimulation et c) durait au moins deux secondes. Lorsqu'une réponse était observée, son amplitude moyenne sur deux secondes a été comparée à l'amplitude moyenne sur les 10 secondes précédant la stimulation (voir Fig. 15), moyennes calculées à l'aide de l'outil « statistics » (mean) du logiciel Clampfit 10.6.

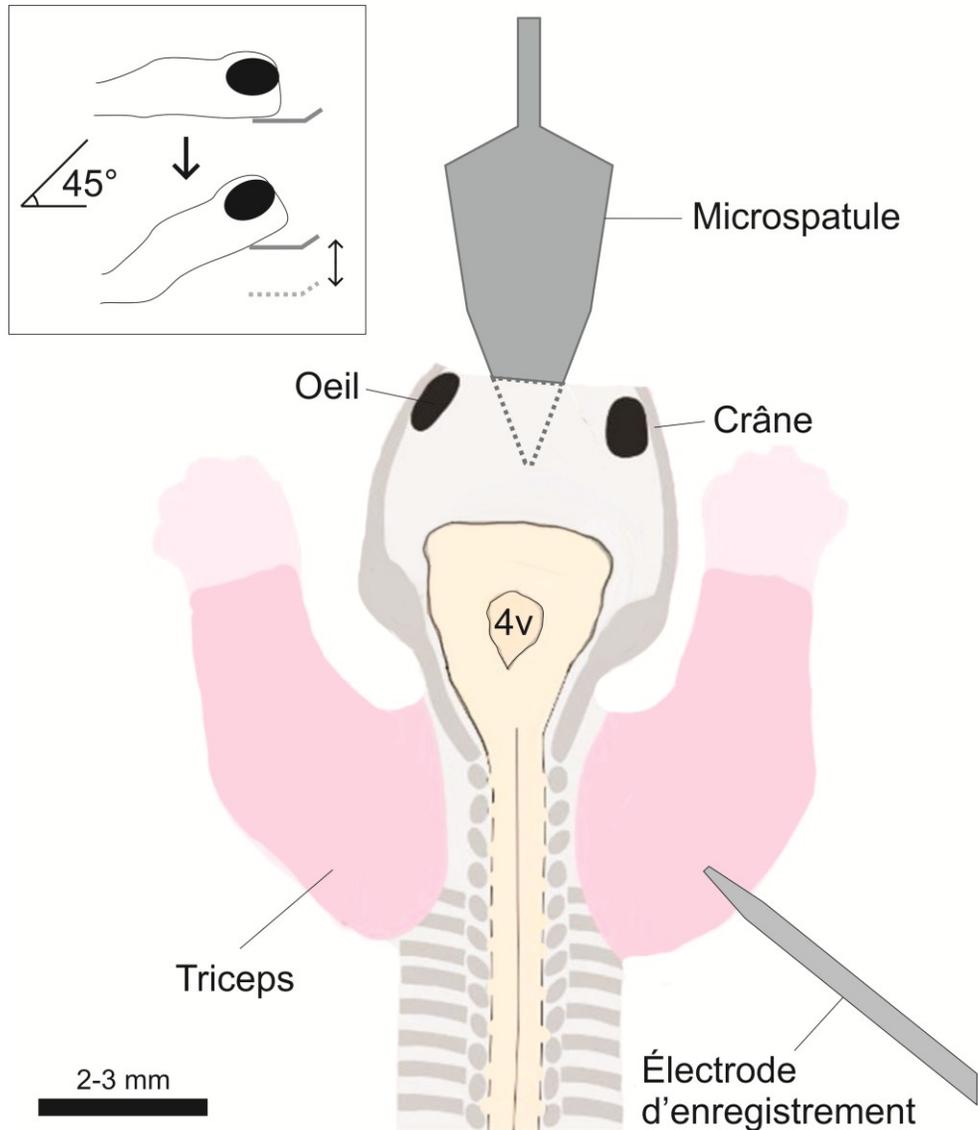


Figure 11 : Illustration schématique du protocole d'élévation de la tête de préparations *in vitro*. La figure principale montre la préparation en vue dorsale telle que placée dans le bain (non représenté). L'encadré en haut à gauche représente une vue de profil de la microspatule qui soulève la tête de l'animal en lui faisant subir une rotation verticale d'au moins 45°. L'œil est représenté par un cercle noir. La barre d'échelle représente approximativement de 2 mm (à P4) à 3 mm (à P12).

2.3 Stimulations mécaniques des organes vestibulaires

Des pressions mécaniques ont été appliquées directement sur le labyrinthe membraneux de l'oreille interne de préparations *in vitro* de tronc et ME d'opossums (1 P1, 1 P3, 1 P4, 2 P5, 1 P6, 2 P7 et 2 P9), dans le but de stimuler les organes vestibulaires, alors que l'activité des racines ventrales du renflement cervical de la ME était enregistrée à l'aide d'électrodes à succion.

2.3.1 Préparation des spécimens

Les animaux ont d'abord été anesthésiés puis disséqués tel que décrit en 2.2.1, à la différence qu'une portion dorsale du labyrinthe a été sectionnée afin de former une ouverture dans le vestibule permettant l'accès aux organes vestibulaires. Les racines dorsales et ventrales ont été sectionnées le plus loin possible de la ME avant que celle-ci ne soit dégagée de la colonne vertébrale. Chaque spécimen a été solidement épinglé au fond du pétri de manière à rendre les racines ventrales accessibles, puis placé sous un microscope avec le système de perfusion décrit ci-haut.

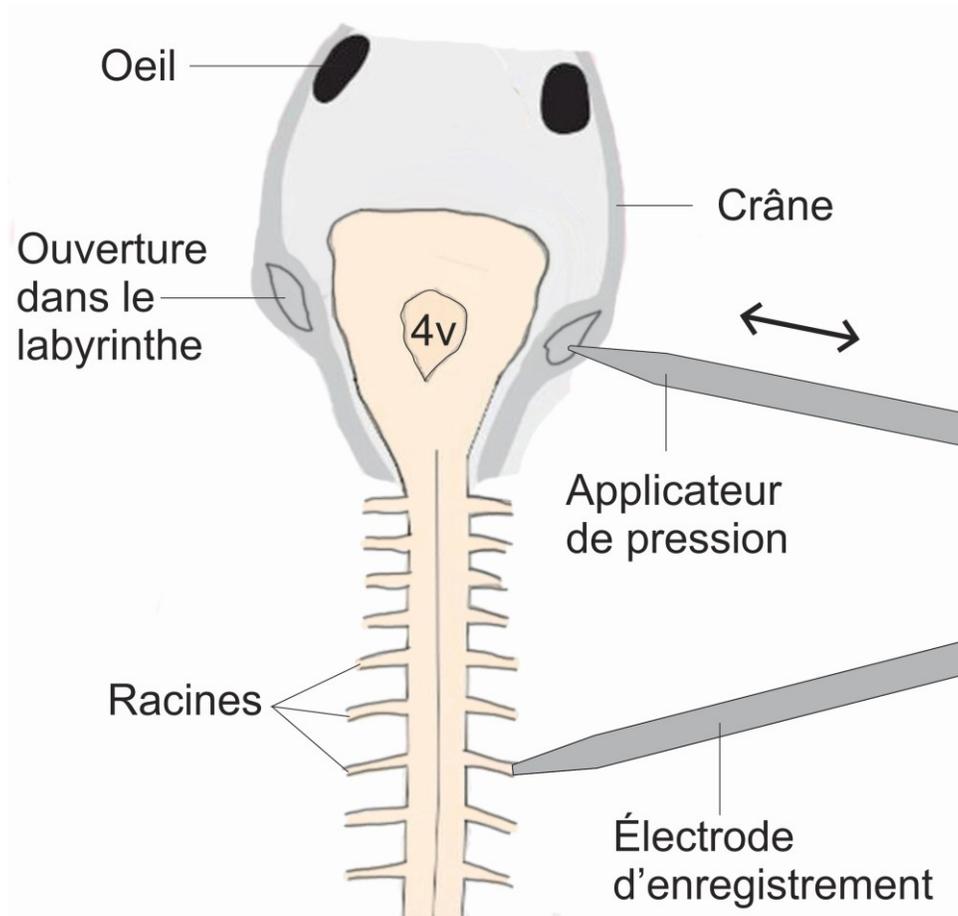


Figure 12 : Illustration schématique du protocole de stimulation par pression sur les organes vestibulaires de préparations *in vitro*. La ME était épinglée face ventrale vers le haut à son extrémité pour permettre l'accès aux racines ventrales (non illustré).

2.3.2 Stimulations par pression sur le labyrinthe et enregistrements

Après une période de repos de 30 min à 1 h, une électrode à succion, telle que décrite en 2.2.2, a été attachée à une racine ventrale entre C4 et C8, ce qui correspond aux niveaux contenant des fibres nerveuses innervant les membres antérieurs (Fig. 12). L'électrode à succion était connectée à un module d'entrée à haute impédance (HZP, Grass Technologies) lui-même

relié au système d'amplification, de numérisation et d'enregistrement décrit précédemment. Les paramètres d'amplification (10 000X) et de bande passante (3 Hz – 3 KHz) étaient aussi identiques.

Une tige de verre au bout effilé attachée à un micromanipulateur a ensuite été insérée dans l'ouverture du labyrinthe puis avancée délicatement, sous contrôle visuel, de manière à appliquer une pression sur le labyrinthe. La tige était avancée jusqu'à ce qu'un déplacement des macules, clairement visibles sous forme de taches sombres au microscope à champ clair, soit observé, mais en prenant soin de ne pas abimer le labyrinthe et de ne pas causer de déplacement du crâne. Le mouvement de la tige de verre était effectué le plus rapidement qu'il était possible de le faire sans risquer de détruire le labyrinthe, de façon à maximiser la stimulation des organes vestibulaires par la pression appliquée sur le labyrinthe et par leur déplacement. Une série de stimulations consistant en une succession rapide de trois pressions et, en moyenne, 10 séries espacées de 1 minute a été effectuée. Si possible, des stimulations étaient également exercées au niveau du second labyrinthe.

2.3.3 Traitement et analyse des résultats

Les signaux enregistrés ont été rectifiés et analysés à l'aide du logiciel Clampfit 10.6. Une déflexion du tracé EMG était considérée comme une réponse à la stimulation si elle respectait les critères décrits en 2.2.3. Les moyennes d'amplitude, calculées à l'aide de l'outil « statistics » de Clampfit 10.6, de l'activité des 10 secondes précédant la stimulation, 10 secondes suivant la stimulation, et des 2 secondes d'activité la plus intense ont été notées à fin

d'analyse (voir Fig. 15). Le temps de 10 secondes de moyenne suivant la stimulation a été choisi en considérant que la stimulation pouvait durer jusqu'à 5 secondes et que les réponses observées duraient environ 5 à 10 secondes en moyenne. Un temps de 10 secondes suivant le début de la stimulation est donc approprié pour maximiser les chances de percevoir une augmentation de l'activité suite à la stimulation. De la même façon, les deux secondes d'activité la plus intense ont été sélectionnées pour maximiser les chances de détecter une réponse.

3 Résultats

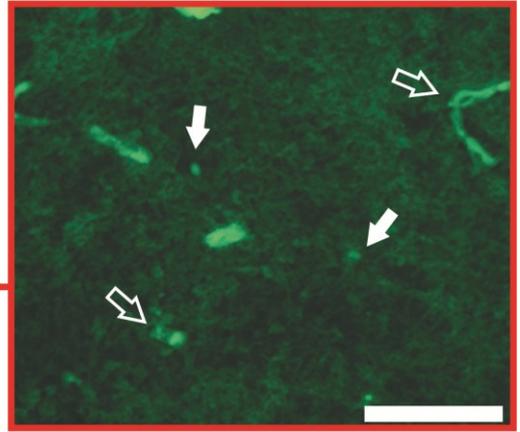
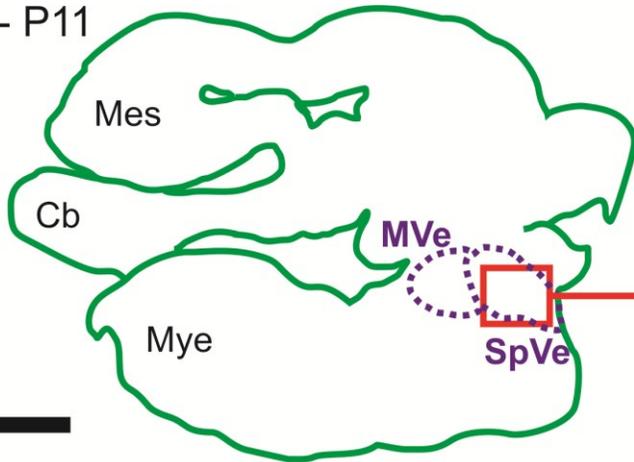
3.1 Expression de c-Fos suite à des stimulations vestibulaires

Des opossums (3 P0, 7 P5, 7 P11, 3 P15, 5 P16, 6 P18, 3 P21), ont été stimulés à l'aide du nutator. Des animaux contrôles (3 P0, 3 P5, 5 P11, 4 P16, 3 P18), laissés immobiles, ont aussi été étudiés. Les tissus de la tête ont été traités par immunohistochimie afin de révéler la protéine c-Fos, utilisée comme indicateur d'activité neuronale, puis un recensement de la distribution et du nombre des cellules ir et leur localisation dans les structures vestibulaires et autres noyaux centraux d'intérêt a été effectuée.

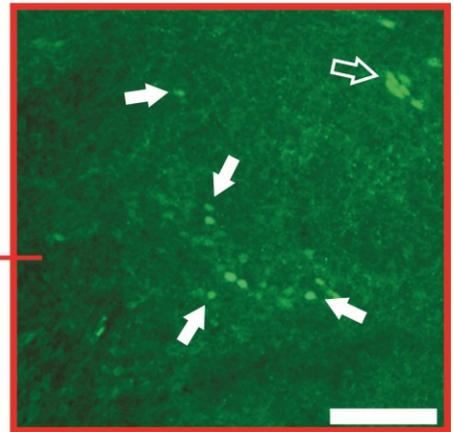
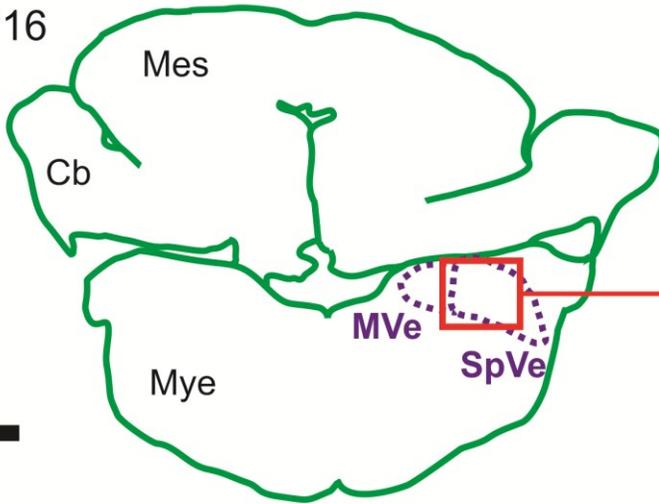
3.1.1 Immunoréactivité c -Fos des structures vestibulaires

Chez les spécimens P0 et P5, aucun karyon ir n'a été observé dans les noyaux vestibulaires chez les spécimens contrôles ou stimulés. À P11, de une à trois cellules exprimant c-Fos dispersées sur quelques coupes ont été observées dans le SpVe chez 29 % (2/7) des spécimens stimulés (Fig. 13 A). Toutefois, des cellules marquées ont aussi été observées dans le même noyau chez 40 % des contrôles (2/5).

A - P11



B - P16



C - P16

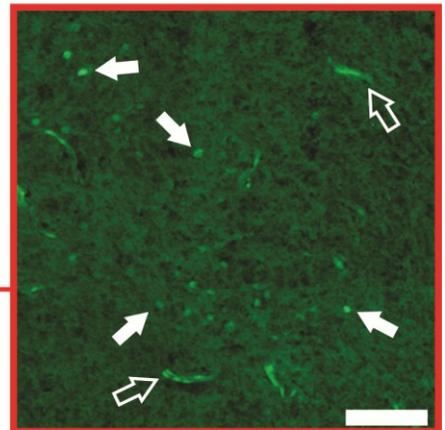
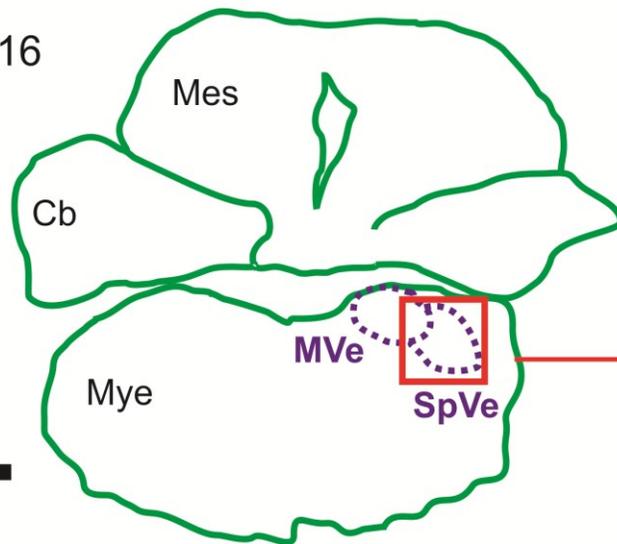


Figure 13 : Coupes transverses de tronc cérébral d’opossums illustrant le marquage c-Fos des noyaux vestibulaires. Les schémas à gauche représentent les coupes transverses de tronc cérébral d’opossums stimulés à P11 (A) et P16 (B), et d’un opossum contrôle à P16 (C). Les microphotographies à droite correspondent approximativement aux régions encadrées en rouge dans les schémas de gauche. Les flèches pleines pointent des exemples de karyons ir et les flèches évidées pointent des vaisseaux sanguins. On note une forte augmentation de la quantité de cellules ir de P11 (A) à P16 (B), ainsi que des similitudes dans le nombre de cellules ir et l’intensité du marquage chez des animaux stimulés (B) et contrôles (C) du même âge. Les échelles en noir à gauche représentent 500 µm, les échelles en blanc à droite représentent 100 µm. Cb : Cervelet, Mes : Mésencéphale, MVe : Noyau vestibulaire médian, Mye : Myélocéphale, SpVe : Noyau vestibulaire spinal.

À P15 et P16, 88 % (7/8) des spécimens stimulés montraient jusqu’à 10 cellules ir sur certaines coupes dans le SpVe (Fig. 13 B). Le LVe était également marqué à moindre degré chez certains des spécimens. Les mêmes noyaux étaient marqués chez 50 % (2/4) des spécimens contrôles (Fig. 13 C). À P18, 75 % (3/4) des spécimens stimulés présentaient des cellules ir, principalement dans les SpVe et LVe, mais également dans le MVe. Des spécimens contrôles présentaient du marquage semblable aux animaux stimulés dans 67 % des cas (2/3). À P21, 100 % (3/3) des spécimens stimulés présentaient des cellules ir dans les noyaux vestibulaires. Le marquage était plus important et constant que chez les spécimens plus jeunes, certaines coupes présentant jusqu’à 20 à 30 cellules ir dans le LVe ou SpVe. Nous avons également observé de 5 à 10 cellules dans les noyaux SpVe et LVe sur plusieurs coupes consécutives chez deux des spécimens. De plus, des karyons ir étaient observables dans tous les noyaux vestibulaires, incluant le SuVe qui n’était pas marqué chez les spécimens plus jeunes.

Nonobstant une seule cellule marquée dans une macule d'un spécimen stimulé à P11, aucun des spécimens étudiés ne présentait de cellules ir dans le ganglion ou les organes vestibulaires. Il est à noter qu'une forte variété interindividuelle a été observée en ce qui a trait à l'intensité de fluorescence du marquage, le nombre de karyons ir et, à moindre mesure, les noyaux vestibulaires présentant des noyaux ir, et ce, même chez les spécimens du même âge, de la même portée et qui subissaient tous les traitements de façon concomitante.

3.1.2 Immunoréactivité c-Fos de régions non vestibulaires

La présence de c-Fos dans des régions non vestibulaires a été notée chez tous les spécimens afin de vérifier le bon fonctionnement de la technique immunohistochimique. De plus, pour déterminer si les stimulations vestibulaires pouvaient induire une expression c-Fos dans des régions autres que les noyaux vestibulaires, l'expression de c-Fos chez les animaux stimulés et contrôles a été comparée. Aucune différence notable n'a été observée entre les spécimens stimulés et contrôles, la description qui suit s'applique donc aux deux traitements. Encore une fois, une forte variabilité interindividuelle a été observée. Le jour de la naissance, les seules structures notables qui contenaient des noyaux ir étaient la formation réticulée du myélocéphale et le locus coeruleus qui était faiblement marqué. À partir de P5, on voit apparaître des noyaux ir dans la formation réticulée plus rostralement, au niveau du métencéphale. On observe également un marquage plus important du locus coeruleus, de même que du marquage des noyaux spinal et principal du trijumeau. À P11, la formation réticulée au niveau mésencéphalique, les noyaux solitaire et facial et l'olive supérieure contenaient

également des noyaux ir. Plus rostralement, on observe aussi des cellules ir dans l'hypothalamus, l'hypophyse et ce qui semble être l'hippocampe présomptif. En règle générale, la quantité de cellules exprimant c-Fos et l'intensité du marquage semblaient augmentées avec l'âge. Toutes les régions qui démontraient des cellules ir chez des spécimens plus jeunes étaient également marquées chez au moins un des spécimens plus âgés.

3.2 Activité des triceps en réponse à des élévations de la tête

L'activité électrophysiologique d'un triceps de préparations *in vitro* était enregistrée alors que celles-ci ont subi des élévations de la tête. Cette série d'expériences a d'abord été effectuée chez quatre spécimens (1 P4*, 1 P6*, 1 P9*, 1 P12*) chez qui tous les nerfs crâniens sauf le vestibulocochléaire et le facial étaient coupés bilatéralement puis chez six autres spécimens (1 P8, 1 P9, 2 P11, 2 P12) ayant subi une section bilatérale des trois premières paires de nerfs rachidiens en plus de celle des nerfs crâniens. Les tracés d'enregistrements ont été rectifiés puis les moyennes de l'amplitude du signal des 10 secondes précédant et suivant le début de la stimulation ont été notées. Si une réponse était visible sur le tracé, la moyenne de l'amplitude du signal pendant les deux secondes suivant le début de la réponse était également notée (voir Fig. 15).

Les enregistrements pour le spécimen P9* n'ont pas été inclus dans l'analyse parce que ce spécimen présentait une activité spontanée, rythmique et continue après avoir récupéré de la dissection. Chez ce spécimen, l'amplitude moyenne pendant les bouffées d'activité correspondait à 200 à 500 % de l'amplitude moyenne de l'activité de base. Chez les neuf autres

spécimens, des résultats ont été obtenus pour un total de 40 stimulations avant la coupe des nerfs vestibulaires et faciaux. Sur ces 40 stimulations, seulement deux ont été associées à une réponse débutant 2,5 et 3,2 s après le début de l'élévation de la tête. Ces réponses consistaient en des bouffées d'activité avec des amplitudes moyennes représentant une augmentation de 20,3 et 40,5 % par rapport au niveau de base et ont été observées chez des spécimens chez qui les nerfs rachidiens étaient intacts. Aucune réponse n'a été obtenue lors des 38 autres enregistrements (e.g. Fig. 14 A). Les moyennes d'amplitude du signal des 10 secondes suivant les stimulations de ces spécimens variant entre 0,83-1,14 fois l'amplitude du signal de base, avec une moyenne de $1,01 \pm 0,05$.

Vu l'apparition de cellules ir dans les noyaux vestibulaires vers P15, il aurait été intéressant d'effectuer des élévations de tête chez des spécimens plus âgés pour déterminer à quel âge apparaissent les réponses motrices suite à cette stimulation. Plusieurs essais ont été tentés avec des spécimens plus âgés (1 P14, 1 P15, 1 P16 et 1 P19), mais il n'a pas été possible de conserver les préparations *in vitro* fonctionnelles pour une durée de temps suffisante pour appliquer les stimulations. Il est probable que la taille des spécimens et la densité des tissus à ces âges limitent la diffusion de la solution physiologique, ce qui entraîne une dégradation accélérée de la préparation.

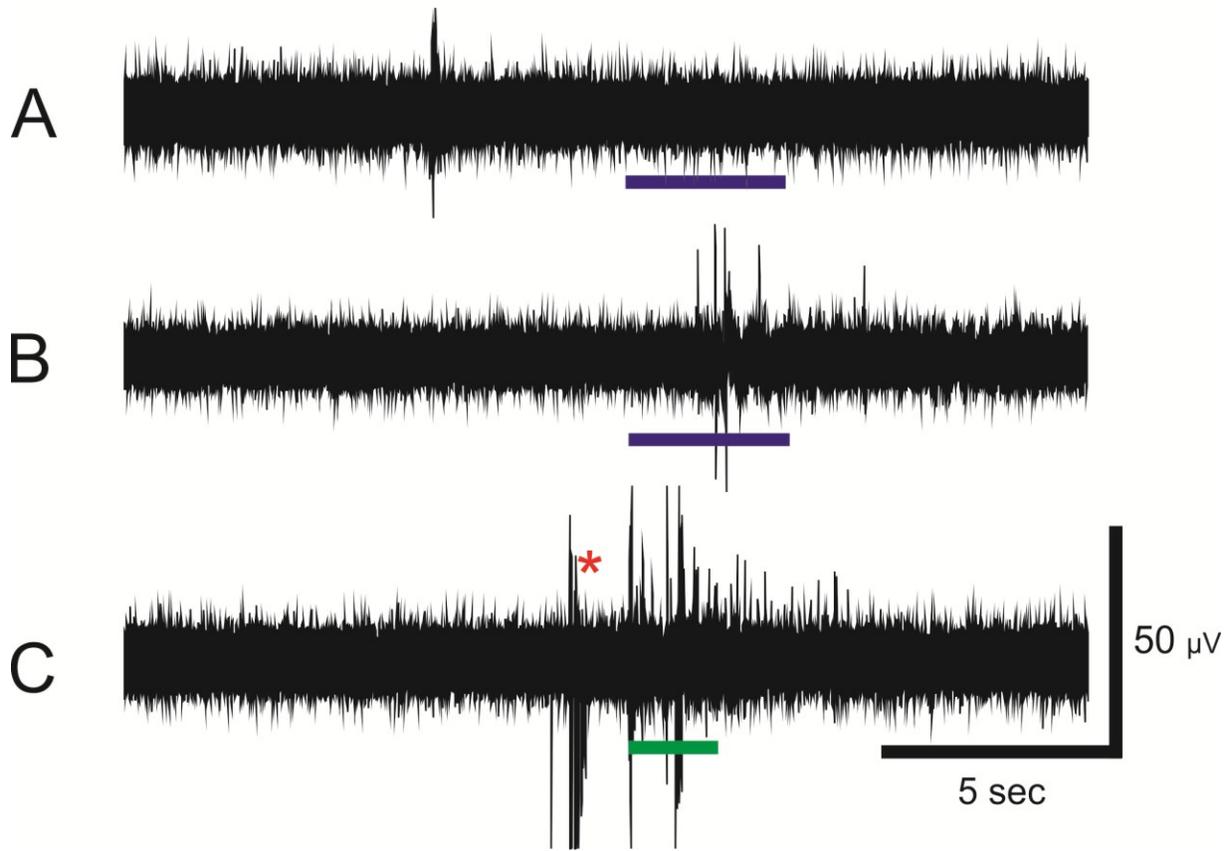


Figure 14 : Enregistrement typique du muscle triceps lors d'élévations de la tête. Le tracé en A montre une réponse typique du triceps chez un spécimen P11 dont les nerfs crâniens, à l'exception des vestibulocochléaires et faciaux, et les nerfs rachidiens des segments cervicaux rostraux étaient sectionnés. Le tracé en B montre une réponse chez un spécimen P12, mais dont les nerfs rachidiens étaient intacts, après section des nerfs vestibulocochléaires. Les bandes indigo représentent le temps pendant lequel la tête était élevée puis abaissée. C montre que le spécimen en A répond à une pression sur la main appliquée sur la durée de la bande verte, ce qui atteste de la viabilité de la préparation. L'astérisque en rouge signale un artefact. Les échelles dans le coin inférieur droit sont applicables aux trois tracés.

3.3 Réponse des racines ventrales à des stimulations des organes vestibulaires

Des pressions mécaniques ont été appliquées directement sur le labyrinthe membraneux de l'oreille interne de préparations *in vitro* de tronc et ME d'opossums (1 P1, 1 P3, 1 P4, 2 P5, 1 P6, 2 P7 et 2 P9), dans le but de stimuler les organes vestibulaires, alors que l'activité des racines ventrales du renflement cervical de la ME était enregistrée à l'aide d'électrodes à succion.

Le niveau de base de l'activité a été déterminé pour chaque essai en mesurant l'amplitude moyenne de l'activité des 10 secondes précédant le début de la stimulation. Cette amplitude a été comparée à l'amplitude moyenne pendant les 10 secondes suivant la stimulation. Lorsque qu'une augmentation importante de l'activité était observée suivant la stimulation, l'amplitude moyenne pendant les deux secondes d'activité la plus intense était également notée (voir Fig. 15). Puisque les stimulations duraient plusieurs secondes, et que le début et la fin des stimulations étaient indiqués par un artefact généré par une pédale activée en parallèle à la stimulation (voir section 2.2.2), il était impossible de déterminer avec certitude le début de la réponse. Ce problème se posait particulièrement lorsque les spécimens montraient de l'activité spontanée. Considérer seulement les 2 secondes de plus forte activité suite à la stimulation nous permettait de pallier en partie à cette incertitude et d'augmenter les chances de détecter une réponse. Afin de vérifier que les augmentations d'activité étaient dues aux stimulations vestibulaires, les nerfs vestibulaires étaient ensuite coupés préalablement à de nouvelles stimulations chez certains spécimens (1 P3, 1 P4, 2 P5, 1 P7).

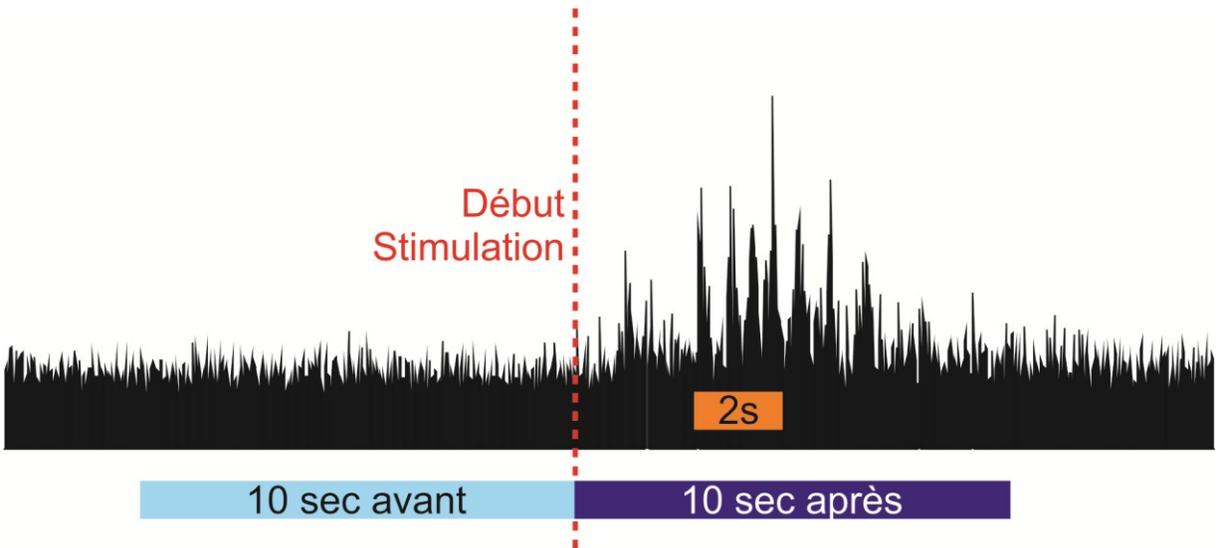
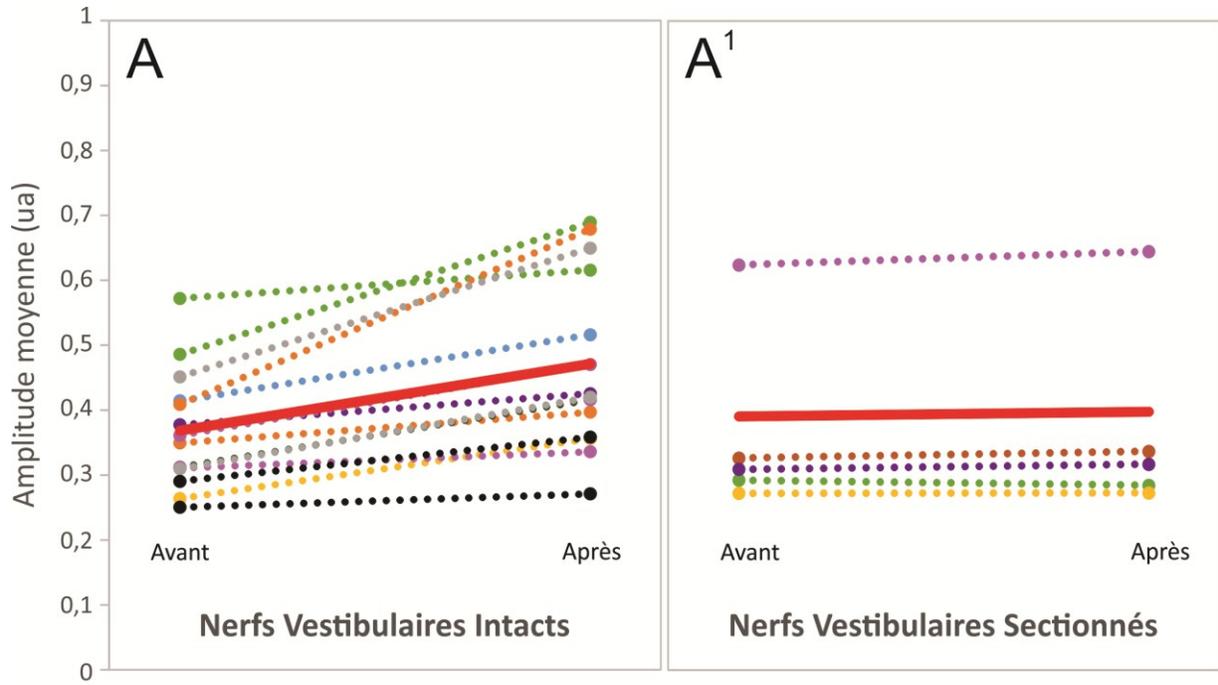


Figure 15 : Enregistrement typique d'une réponse d'une racine ventrale à la stimulation des organes vestibulaires. Le tracé en noir a été rectifié à l'aide de ClampFit. La ligne pointillée rouge représente le début de la stimulation. La bande bleu pâle représente les 10 secondes précédant l'artefact de stimulation servant au calcul de l'amplitude moyenne de l'activité de base. La bande bleu foncé représente les 10 secondes suivant la stimulation pendant lesquelles l'amplitude moyenne de la réponse est calculée. La bande orange représente un exemple de sélection des 2 secondes d'activité la plus intense suivant la stimulation desquelles l'amplitude moyenne de la réponse est calculée.

Près de 69 % (99/143 essais) des stimulations effectuées sur ces préparations ont provoqué une augmentation d'activité des racines lors des 10 s post-stimulus, l'activité de base étant de $0,39 \pm 0,09$ unités arbitraires (ua) et celle après stimulation (sur 10 sec) de $0,49 \pm 0,14$ ua pour l'ensemble des réponses, tous spécimens confondus (Fig. 16 A). Lorsqu'on considère les âges, le taux de réponse est de 50 % (5/10) à P1, 40 % (8/20) à P3, 100 % (10/10) à P4, 73 % (24/33) à P5, 100 % (5/5) à P6, 52 % (14/27) à P7, et 75 % (33/44) à P9 (Fig. 17). Si on considère

seulement les 99 stimulations ayant provoqué une réponse, en moyenne, tous spécimens confondus, l'amplitude moyenne de l'activité est de $0,36 \pm 0,08$ ua avant la stimulation et de $0,58 \pm 0,22$ ua pendant la réponse (sur les deux secondes d'activité la plus intense; Fig. 16 B). La moyenne des augmentations de la réponse était donc $62,8 \pm 46,3$ %, ce qui est statistiquement significatif (Two way ANOVA repeated measures, P value : $<0,0001$).

Sectionner le nerf demandait de retirer les électrodes avant de déplacer le spécimen sous une loupe à dissection pour l'opération puis de ramener le spécimen à la station d'enregistrement et de replacer les électrodes. C'est pourquoi nous n'avons obtenu d'enregistrements après coupe du nerf que pour 1 P3, 1 P4, 2 P5, et 1 P7. Dans ces conditions, aucune stimulation (0/38) n'a induit de réponse sous forme de bouffées d'activité dans les racines. On observe une variation de -7,1 à +11,6 % de l'amplitude moyenne du tracé (sur 10 secondes) avant et après stimulation selon les essais. La variation moyenne pour l'ensemble des spécimens est de $1,2 \pm 3,5$ % suivant la stimulation. (Fig. 16 A₁).



● P1 ● P3 ● P4 ● P5 ● P5 ● P6 ● P7 ● P9 ● P9 — Moy

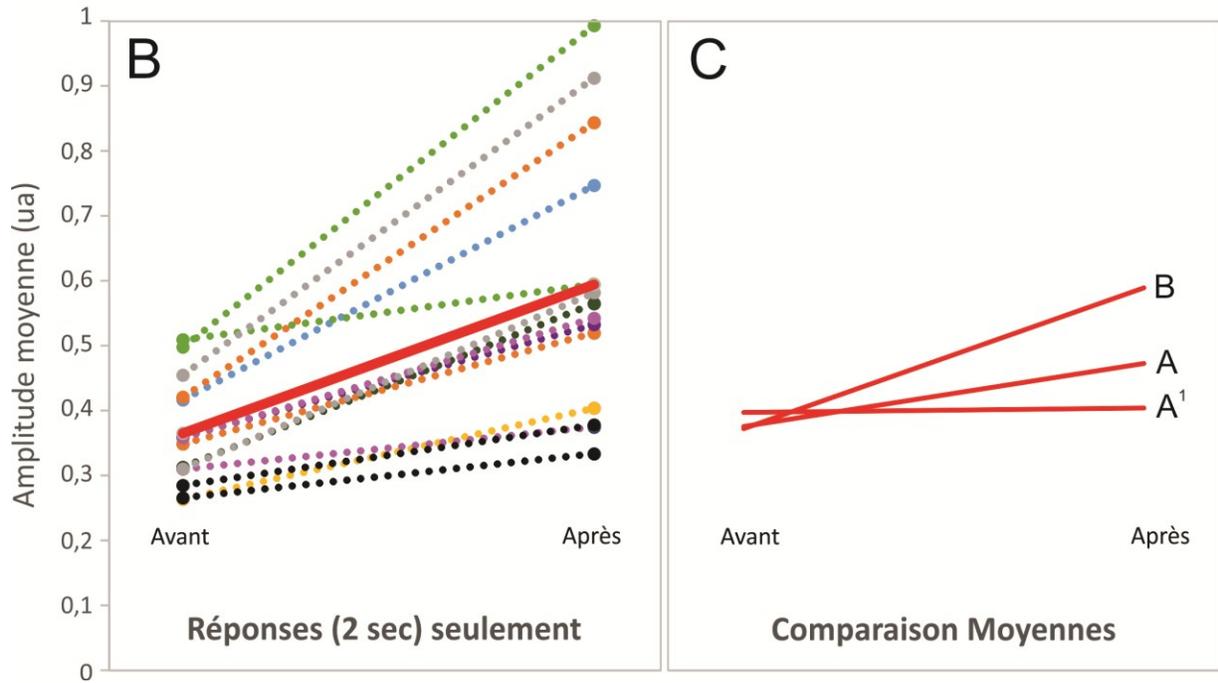


Figure 16 : Réponses des racines ventrales de préparations *in vitro* d’opossums néonataux à des pressions sur les organes vestibulaires. Chaque paire de points reliés par une droite pointillée représente les changements dans l’amplitude moyenne d’activité enregistrée avant ou après stimulation dans une racine ventrale pour un spécimen dont l’âge est donné au centre de la figure. Sur chaque graphique, la ligne rouge (moy) représente la variation moyenne de l’amplitude pour tous les spécimens. **En A et A₁** : Le deuxième point représente la moyenne d’amplitude des 10 secondes suivant la stimulation pour tous les essais d’un spécimen, avant et après coupe des nerfs vestibulaires, respectivement. **En B** : Le deuxième point représente la moyenne d’amplitude des deux secondes montrant la plus forte activité suivant la stimulation lorsqu’une réponse était visible. **En C** : les moyennes représentées en A, A₁ et B ont été superposés à fin de comparaison. ua : unités arbitraires.

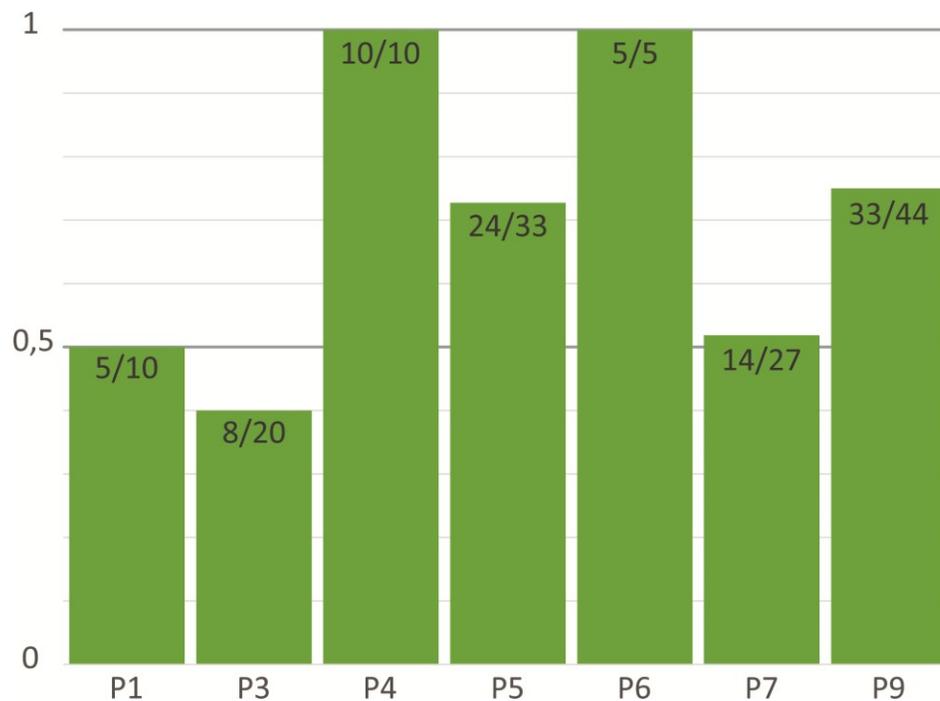


Figure 17 : Taux de réponse aux pressions sur les organes vestibulaires en fonction de l’âge. Les fractions à l’intérieur des colonnes représentent le nombre de réponses sur le nombre total de stimulations pour chaque âge testé.

4 Discussion

Ce projet avait comme but principal d'en apprendre davantage sur le développement fonctionnel du système vestibulaire pendant les premières semaines suivant la naissance chez l'opossum afin de mieux comprendre le développement sensorimoteur précoce des mammifères. Nos expériences cherchaient également à répondre à la question de savoir si le système vestibulaire est déjà partiellement fonctionnel à la naissance. Nous avons effectué des stimulations vestibulaires sur des opossums intacts du jour de la naissance à l'âge de P21, puis traité les tissus de la tête par immunohistochimie à l'aide de c-Fos, utilisé comme indicateur d'activité neuronale. L'observation de cellules marquées pour c-Fos dans les noyaux vestibulaires à partir de P15 seulement suggère que le système n'est pas fonctionnel en conditions physiologiques pendant les deux premières semaines de vie. Ces résultats sont supportés par le fait que des élévations de la tête ne provoquent pas de réponses des MA dans des préparations *in vitro* de tronc et ME avec MA attachés d'opossums âgés de P4 à P12. De plus, l'observation de cellules ir pour c-Fos à P15 coïncide avec l'âge où commencent à apparaître les réflexes impliquant le système vestibulaire (Cassidy *et al.*, 1994). Afin de déterminer à partir de quel âge les organes vestibulaires commencent à répondre à de fortes stimulations, nous avons appliqué des pressions directement sur les organes vestibulaires par une ouverture pratiquée dans le labyrinthe de préparations *in vitro* d'opossums âgés de P1 à P9. Une augmentation de l'activité des racines ventrales de la ME au niveau cervical est observable dès P1, ce qui suggère que certains des récepteurs vestibulaires pourraient être partiellement fonctionnels dès la naissance.

Dans les expériences de stimulation d'animaux intacts, l'absence d'immunoréactivité pour c-Fos dans les noyaux vestibulaires avant P15 suggère que le système vestibulaire n'est pas sensible à des perturbations vestibulaires, du moins en condition normale. Il est toutefois possible que des stimulations plus intenses aient pu induire l'expression de c-Fos. En effet, les études de Lai *et al.* (2004) et Lai *et al.* (2006) ont montré que des stimulations à une vitesse de 1.5 Hz pendant 90 minutes étaient optimales pour obtenir une grande quantité de cellules marquées pour c-Fos chez le rat adulte. Nonobstant qu'il est douteux que des opossums âgés de P0-P7 (environ) puissent survivre à un traitement aussi intensif, l'utilisation de stimulations aussi rapides ne nous aurait pas permis de déterminer si le système vestibulaire est partiellement fonctionnel dans les premières semaines suivant la naissance puisque les perturbations normales que pourrait subir un animal sont beaucoup moins intenses. C'est pourquoi nous avons employé des stimulations par nutator et les élévations de la tête qui, bien que fortes, sont certainement plus représentatives des perturbations que subit le nouveau-né lorsqu'il grimpe jusqu'à la tétine ou lorsqu'il est attaché à sa mère.

L'intensité relativement faible de nos stimulations pourrait également expliquer pourquoi on n'observe pas de différences notables entre le marquage c-Fos des animaux stimulés et contrôles après P15. En effet, il est possible que nos stimulations vestibulaires utilisant le nutator n'étaient pas assez puissantes pour avoir un effet sur l'expression de c-Fos. En comparaison, les études sur le rat de Lai *et al.* (2004) et Lai *et al.* (2006) qui ont permis d'observer plus de neurones exprimant c-Fos dans les noyaux vestibulaires de rats stimulés que chez les rats contrôles (i.e., non-stimulés et labyrinthectomisés) utilisaient des stimulations beaucoup plus rapides, 2 Hz plutôt que 0,4 Hz, et des mouvements de jusqu'à 24 cm plutôt que quelques cm comme c'est le cas dans nos expériences. Une manière de confirmer

cette hypothèse serait de faire des stimulations en utilisant de plus fortes intensités de stimulation, mais, tel que mentionné, il est possible que les opossums âgés de moins d'une semaine ou deux ne survivent pas à des stimulations assez longtemps pour induire une forte expression de c-Fos. Une autre manière de le vérifier serait d'utiliser des spécimens labyrinthectomisés comme contrôles, ce qui pourrait nous permettre de discerner l'effet des perturbations que subissent les spécimens attachés à leur mère de l'activité de base des noyaux vestibulaires. Cependant, une chirurgie aussi délicate serait extrêmement compliquée, voire impossible chez des spécimens en bas âges, sans compter le temps de récupération nécessaire après la chirurgie.

Tel que mentionné en 1.6, une période de repos avant les stimulations favorise une forte expression de c-Fos. Malgré le fait que toutes les expériences aient été effectuées pendant la journée, période pendant laquelle les opossums sont normalement au repos, il est probable que les mères, auxquelles les spécimens étaient attachés, aient été actives dans les heures précédant les stimulations. Puisque c-Fos est exprimé lors d'un changement dans l'activité afférente et que nos stimulations se voulaient similaires à ce que subissent les animaux en conditions physiologiques, des déplacements de la mère dans les heures précédant la stimulation pourrait diminuer ou même empêcher l'expression subséquente de c-Fos. Les mouvements des spécimens eux-mêmes pourraient également créer un problème similaire. Les jeunes opossums sont relativement immobiles lorsqu'attachés à la tétine, mais deviennent très actifs une fois séparés de la mère. De ce fait, les manipulations précédant les stimulations pourraient également influencer les résultats c-Fos. Une immobilisation complète des spécimens pendant plusieurs heures avant les stimulations pourrait pallier à ce problème, mais, malheureusement, les jeunes opossums ne peuvent être maintenus *in vivo* pendant une longue période une fois détachés de la

mère. De plus, leur petite taille et leur posture recroquevillée rendent une immobilisation complète de la tête extrêmement difficile.

La présence de cellule ir pour c-Fos dans des régions autres que les noyaux vestibulaires suggèrent que l'absence de c-Fos avant P15 n'était pas due à un problème avec la technique immunohistochimique. Effectivement, le patron d'expression de c-Fos qui a été observé chez nos animaux contrôles et stimulés peut être expliqué en grande partie par la littérature. Par exemple, le stress que subissent les animaux à cause des manipulations inhérentes à l'expérience et à cause de leur immobilisation peut expliquer, au moins en partie, le marquage qui a été observé dans plusieurs régions, notamment le locus coeruleus, le noyau solitaire et la formation réticulée (Revue dans Kovacs, 1998). Le marquage observé dans l'hypothalamus et au niveau de ce qui semble être l'hippocampe présomptif est aussi normalement observé chez l'animal au repos (voir Kovacs, 2008). L'expression de c-Fos observée dans les régions plus rostrales pourrait être expliquée par le fait que ces régions présentent encore de la division et différenciation cellulaire, puisque c-Fos est induit par des facteurs de croissance (Kruijer *et al.*, 1984; Muller *et al.*, 1984). Gubits *et al.* (1988) ont observé une augmentation considérable des niveaux d'expression de c-Fos à P13 chez le rat, alors que l'activité mitotique s'atténue. Selon eux, cette augmentation pourrait être due à une augmentation de l'activité synaptique. L'augmentation, que nous avons observée avec l'âge, de la quantité de cellules ir pour c-Fos et du nombre de régions marquées pourrait être due à la même raison.

Afin de corroborer les résultats c-Fos et de vérifier que l'absence de marquage dans les animaux intacts ne découlait pas d'une stimulation inadéquate des organes vestibulaires, nous avons utilisé des élévations directes de la tête sur des préparations *in vitro* d'opossums. Ces élévations de tête entraînaient forcément un mouvement de tout le système vestibulaire et plus

particulièrement de la macule utriculaire, l'organe le moins immature à la naissance chez l'opossum (Pflieger et Cabana, 1996). Ces mouvements n'ont pas généré de réponse des triceps chez les spécimens pour lesquels les deux premières paires de nerfs rachidiens étaient coupées, ce qui supporte l'hypothèse que le système vestibulaire n'exerce pas de contrôle locomoteur en conditions normales pendant les deux premières semaines de vie. Des expériences ont été tentées chez des spécimens plus âgés afin de déterminer à partir de quel âge une influence du système vestibulaire sur la locomotion est détectable. Malheureusement, les préparations *in vitro* de spécimens plus âgés que P12 ne survivaient pas assez longtemps après la dissection pour permettre d'effectuer les manipulations.

Cette absence de réponse des triceps n'est très probablement pas due à une immaturité de ses fibres musculaires puisque l'on sait que le triceps est capable de contractions chez le nouveau-né et participe aux mouvements d'extension des avant-bras qui sont utilisés pour atteindre la tétine (Desmarais *et al.*, 2016; Hughes & Hall, 1988; Pflieger *et al.*, 1996). De plus, les fibres musculaires des muscles proximaux des MA sont denses et déjà striées à la naissance, contrairement aux muscles des membres postérieurs (Barthélemy & Cabana, 2005). La maturité des jonctions neuromusculaires dans le triceps ou des MN de la ME n'est pas non plus en cause puisque différentes études ont montré que des commandes descendantes peuvent induire une activité des triceps chez l'opossum nouveau-né. En effet, des stimulations électriques des noyaux vestibulaires et du ganglion du trijumeau d'intensités relativement faibles (Adadja *et al.*, 2013) de même que des pressions appliquées sur la peau de la face d'opossums nouveau-nés (Desmarais *et al.*, 2016) induisent des mouvements des MA sur le même type de préparations *in vitro* que celles utilisées ici. Finalement, le fait que de faibles réponses puissent quelques fois être observées lors d'élévations de tête de spécimens dont les nerfs rachidiens sont intacts

(Fig. 14 B), et lorsqu'une pression est appliquée sur la main de l'animal (Fig. 14 C) suggère que l'absence de réponse est effectivement due à l'immaturation du système vestibulaire, et non pas à un problème avec la préparation *in vitro* ou avec les enregistrements.

Puisque le système vestibulaire de l'opossum ne semble pas être capable de réagir à des perturbations vestibulaires en conditions normales avant la fin de la 2^e semaine de vie, il ne pourrait participer au guidage de l'opossum nouveau-né vers les tétines. Selon Gemmell *et al.* (2002) et Gemmell (2004), chez les chats marsupiaux, les petits voyagent dans la colonne de liquide visqueux qui les amène près des tétines. Similairement, chez les bandicoots, la mère positionne le sinus urogénital près des tétines pour que les petits en sortent directement sur l'aire mammaire. Seuls les diprotodontes (kangourous, opossums et possums) ont normalement une longue distance à parcourir (relativement à la taille du nouveau-né), vers le haut, entre l'orifice urogénital et la tétine (voir 1.2.2), et seraient donc ceux qui nécessiteraient le plus un contrôle du système vestibulaire pour parcourir cette distance dans la bonne direction. Cependant, si on se base sur la description de la naissance chez l'opossum donnée par VandeBerg & Williams-Blangero (2010) (voir 1.3.2), il est forcé d'admettre que l'opossum nouveau-né ne parcourt pas une très grande distance contre la gravité pour atteindre la tétine. Ashwell & Shurluf (2014) ont noté que le niveau de développement vestibulaire semble corrélé aux besoins locomoteurs de l'animal à la naissance. Or, le développement du système vestibulaire chez l'opossum semble un peu plus avancé que celui du Wallaby (McCluskey *et al.*, 2008; Pflieger & Cabana, 1996), du moins en ce qui a trait aux projections vestibulospinales, qui atteignent déjà la ME cervicale à la naissance chez l'opossum, mais pas encore chez le wallaby nouveau-né.

VandeBerg & Williams-Blangero (2010) ont toutefois noté que « les petits [opossums] qui ne trouvent pas de tétines continuent à ramper, généralement vers le haut ». Les nouveau-

nés diprotodontes se retournent également pour faire face au haut après leur sortie de l'orifice urogénital. Si le système vestibulaire n'est pas fonctionnel en conditions physiologiques à la naissance, qu'est-ce qui explique les comportements antigravitaires observés chez plusieurs espèces? Tel que proposé par Cannon *et al.* (1976), le poids inerte de la partie postérieure du corps de l'animal pourrait passivement orienter les petits vers le haut.

Les noyaux vestibulaires montrent de l'immunoréactivité pour c-Fos à partir de P15 et le marquage augmente en intensité avec l'âge. Si on assume un rythme de développement semblable du rat et de l'opossum, ce qui semble être le cas pour le système vestibulaire (Ashwell & Shurluf, 2014), nos résultats sont comparables à ce qui a été observé par Lai *et al.* (2004) et Lai *et al.* (2006). Considérant qu'un rat (21 jours de gestation) naît une semaine plus tard que l'opossum, un rat à P7 serait à un stade de développement similaire à celui d'un opossum P14. Chez le rat, c'est à partir de P7 que des cellules ir pour c-Fos ont été observées dans les noyaux vestibulaires, principalement le MVe et le SpVe, suite à des stimulations vestibulaires des organes otolithiques utilisant un piston vertical (Lai *et al.*, 2006) ou des rotations verticales désaxées (Lai *et al.*, 2004). Chez le rat comme chez l'opossum, on observe d'abord plus de cellules marquées dans le SpVe que dans le LVe, ce qui semble contre-intuitif considérant que ce dernier est le noyau vestibulaire le moins immature à la naissance. De plus, le LVe est le noyau qui répond le mieux aux signaux provenant de l'utricule chez l'adulte (Gacek, 1969), portion dont le développement est plus précoce que celui des autres régions du labyrinthe. Cependant, il faut noter que la macule du saccule est visible deux ou trois jours après la naissance chez l'opossum (Pflieger & Cabana, 1996) et, chez le wallaby, les macules utriculaire et sacculaire se ressemblent à partir de P5 (McCluskey *et al.*, 2008). Le développement du

sacculé pourrait donc être suffisamment avancé pour qu'il soit au moins partiellement fonctionnel à P15.

L'apparition de cellules ir pour c-Fos et leur augmentation en nombre pendant la troisième semaine s'accordent avec le développement de différents comportements chez l'opossum néonatal. Par exemple, le réflexe de redressement (*body righting*), qui consiste en un retournement de l'animal sur le ventre, lorsque placé sur le dos sur une surface, a été observé dans 20 % des essais chez des spécimens à P15 et dans 100 % des essais à P30 (Cassidy *et al.*, 1994). Aussi, l'opossum commence à être capable de locomotion quadrupède vers la fin de la 3^e semaine, ce qui demande l'apport du système vestibulaire au moins dans le maintien postural (Pflieger *et al.*, 1996). Par comparaison, les réflexes de redressement du rat apparaissent à environ P10, sont observés dans 50 % des essais à P13 et tous les essais à P17 (Sans *et al.*, 1968). Cela suggère que l'implication du système vestibulaire dans le contrôle moteur commence peu après qu'il soit possible d'induire du marquage ir pour c-Fos dans les noyaux vestibulaires suite à des stimulations des organes otolithiques (environ P7 selon Lai *et al.*, 2004 et Lai *et al.*, 2006). Cependant, les réflexes céphaliques rotatoires, qui consistent en une rotation de la tête de l'animal dans le sens inverse d'un mouvement de rotation dans le plan horizontal, sont observables dès la naissance chez le rat (Parrad & Cottreau, 1977). Le réflexe peut être observé dans plus de 50 % des essais à P4 et dans tous les essais à P7. Ces résultats n'impliquent pas un contrôle locomoteur chez le rat nouveau-né, mais suggèrent que les récepteurs des canaux semi-circulaires sont déjà au moins partiellement fonctionnels à la naissance. En effet, une étude électrophysiologique utilisant des accélérations angulaires dans le plan horizontal afin de stimuler le canal semi-circulaire horizontal a détecté un changement dans la fréquence de décharge de neurones des noyaux vestibulaires dès les premières heures de vie du raton (Lannou

et al., 1979). Cependant, des stimulations de haute intensité étaient nécessaires pour détecter des changements dans une faible proportion de cellules. Le seuil d'intensité de stimulation nécessaire pour induire une réponse diminue de plus de moitié avant P4 et continue de diminuer jusqu'à environ P30.

Nos expériences de stimulation des organes vestibulaires, par pressions mécaniques sur le labyrinthe, indiquent que leur stimulation peut induire des réponses motrices dès la naissance. Ces résultats corroborent les observations antérieures selon lesquelles des connexions nerveuses reliant les organes vestibulaires à la ME sont présentes à la naissance (Pflieger & Cabana, 1996) et qu'elles semblent être fonctionnelles puisque des stimulations électriques des noyaux vestibulaires peuvent induire des mouvements des MA (Adadja *et al.*, 2013). Toutefois, le taux de réponse des spécimens à P0 et P5 est assez faible, ce qui pourrait être expliqué par le fait que le très petit labyrinthe chez les plus jeunes opossums est facilement endommagé par les stimulations. En effet, des observations faites lors d'expériences préliminaires visant à mettre au point le protocole, mais non comptabilisées dans les résultats, ont permis de constater que le labyrinthe était parfois endommagé par des stimulations répétées. De plus, les résultats semblent indiquer que les jeunes spécimens réagissent fortement aux premières stimulations puis que les réponses s'atténuent par la suite, ce qui n'est pas le cas chez les animaux plus âgés, qui présentent souvent de fortes réponses jusqu'aux toutes dernières stimulations.

Le fait que, dès P1, des réponses aux pressions sur le labyrinthe aient été observées semble contredire le fait que les stimulations par nutator et par élévations de la tête n'aient pas induit d'expression de c-Fos ou d'activité des triceps. Cependant, il faut rappeler que les pressions sur le labyrinthe occasionnaient un déplacement complet des macules à l'intérieur du labyrinthe, en plus de la pression qui devait être exercée sur les membranes otolithiques et

possiblement sur les fibres nerveuses qui innervent ces organes. Par comparaison, le déplacement des membranes otolithiques lors des stimulations par nutator ou par élévation de la tête est beaucoup plus indirect. Cela porte à croire que la fonction du système vestibulaire serait limitée principalement par la faible sensibilité des organes vestibulaires. Différents facteurs peuvent limiter la sensibilité des organes même si certaines composantes, comme les cellules ciliées ou les fibres nerveuses, pourraient être fonctionnelles. Par exemple, bien que présente sur la macule utriculaire à la naissance chez l'opossum, la membrane des otolithes observée par Pflieger & Cabana (1996) semble posséder peu d'otolithes, qui ne sont probablement pas encore calcifiés. En effet, une étude du développement de l'utricule chez la souris suggère que le processus de cristallisation des otolithes commencerait vers le 19^e jour embryonnaire (Van de Water *et al.*, 1978), ce qui correspondrait environ à P5 chez l'opossum. Si les otolithes ne sont pas calcifiés chez l'opossum nouveau-né, l'inertie de la membrane des otolithes pourrait être trop faible pour permettre la fonction de l'utricule. Cependant, lors de stimulations par pressions directes sur les récepteurs comme celles que nous avons utilisées, l'immaturation de la membrane des otolithes n'empêcherait pas la décharge des récepteurs. Des études plus détaillées du développement de l'appareil vestibulaire sont nécessaires pour bien comprendre les facteurs qui limitent sa sensibilité à de jeunes âges. En somme, les réponses des racines ventrales à des pressions sur le labyrinthe ne signifient pas que les organes vestibulaires sont fonctionnels chez l'animal intact, mais suggère qu'au moins certains des récepteurs, probablement dans l'utricule (voir 1.5), sont assez matures pour décharger lorsque fortement stimulés.

Puisque le développement des structures essentielles du système vestibulaire semble suivre le même patron de développement chez les marsupiaux et placentaires, rien n'empêche

le développement fonctionnel de se produire de façon similaire. Comme il a déjà été mentionné, l'expression de c-Fos et des réflexes sensorimoteurs impliquant le système vestibulaire commence à des temps comparables chez l'opossum et le rat. Chez l'opossum, nous avons observé une réponse motrice suite à une stimulation directe des organes vestibulaires avant que des élévations de la tête puissent induire une réponse des membres et deux semaines avant l'expression de c-Fos. Chez le raton nouveau-né, des réponses de neurones des noyaux vestibulaires ont été observées suite à de très fortes stimulations des canaux semi-circulaires (Lannou *et al.*, 1979) quatre jours avant qu'une expression de c-Fos soit observée suite à des stimulations d'intensité comparable (Lai *et al.*, 2010). Si les ampoules des canaux semi-circulaires peuvent déjà être stimulées à la naissance, il est fort probable que des pressions sur le labyrinthe, similaires à celles utilisées dans la présente étude, puissent induire une réponse motrice avant la naissance chez le rat. En effet, tel que discuté en 1.5, le développement du neuroépithélium de l'utricule précède celui des canaux semi-circulaires de plusieurs jours (Ashwell & Shulruf, 2014).

Il a déjà été montré que, dès la naissance, des projections fonctionnelles des noyaux vestibulaires à la ME sont présentes chez l'opossum (Adadja *et al.*, 2013) et chez le rat (Kasumacic *et al.*, 2010). L'activité motrice qu'on observe en réponse à des pressions sur le labyrinthe corrobore les résultats de ces études. De plus, nos résultats suggèrent que les noyaux vestibulaires seraient capables, dès la naissance, d'envoyer une commande motrice à la ME en réponse à de l'activité afférente. Or, la fonctionnalité du système vestibulaire serait limitée, *in vivo*, par le développement des organes vestibulaires qui deviendraient sensibles à des stimulations vestibulaires normales seulement plusieurs semaines après la naissance. Dans des préparations *in vitro* de ganglion vestibulaire de souris (Desmadryl *et al.*, 1986) et de rat

(Curthoys, 1982), de l'activité spontanée, lente et irrégulière, peut déjà être observée à la naissance et cette activité devient plus régulière et rapide avec le temps. Puisque les noyaux vestibulaires semblent avoir le potentiel d'influencer l'activité motrice très tôt dans le développement, il est possible qu'ils relaient cette activité du ganglion vers la ME mais que son intensité soit insuffisante pour provoquer des réactions motrices notables. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse, mais considérant que le développement des réseaux neuronaux est influencé, entre autres, par l'activité afférente (revues : Katz & Shatz, 1996; Vinay *et al.*, 2002), il est possible que le système vestibulaire aide à façonner les réseaux moteurs à des âges précoces, longtemps avant que son influence sur les comportements moteurs devienne évidente.

En résumé, nos résultats suggèrent que, en conditions normales, le contrôle du système vestibulaire sur les comportements moteurs se met en place à la fin de la 2^e semaine de vie et pendant la 3^e semaine, peu avant l'apparition des réflexes sensorimoteurs impliquant le système vestibulaire et le début de la locomotion quadrupède. Le système vestibulaire n'est donc probablement pas fonctionnel chez l'opossum nouveau-né et n'exercerait pas de contrôle locomoteur lors de l'ascension vers la tétine. Nos résultats immunohistochimiques concordent avec des études similaires effectuées chez le rat, chez qui les grandes étapes du développement structurel et fonctionnel du système vestibulaire se produisent à des temps similaires à ceux de l'opossum. Finalement, nous avons confirmé la présence d'une voie nerveuse reliant les organes vestibulaires aux MN de la ME et nos résultats suggèrent qu'au moins quelques-uns des récepteurs vestibulaires puissent être partiellement fonctionnels à la naissance, malgré le fait que les organes ne soient pas suffisamment sensibles pour répondre à des perturbations en conditions normales avant plusieurs semaines après la naissance.

Bibliographie

- Adadja, T., Cabana, T., & Pflieger, J.-F. (2013). Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Neuroscience*, *228*, 259–70.
- Aitkin, L., Cochran, S., Frost, S., Martsi-McClintock, A., & Masterton, B. (1997). Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*: evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus. *Hearing Research*, *113*(1–2), 69–75.
- Angelaki, D. E., & Cullen, K. E. (2008). Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annual Review of Neuroscience*, *31*, 125–50.
- Ashwell, K. W. S. (2010). Atlas of the brain of the developing tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *The Neurobiology of Australian Marsupials*, 1st edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ashwell, K. W. S. (2015). Timing of mammalian peripheral trigeminal system development relative to body size: A comparison of metatherians with rodents and monotremes. *Somatosensory and Motor Research*, *0*(0), 1–13.
- Ashwell, K. W. S., Marotte, L. R., & Cheng, G. (2008). Development of the olfactory system in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain, Behavior and Evolution*, *71*(3), 216–230.
- Ashwell, K. W., & Shulruf, B. (2014). Vestibular development in marsupials and monotremes. *Journal of Anatomy*, *224*(4), 447–458.
- Auclair, F., Bélanger, M. C., & Marchand, R. (1993). Ontogenetic study of early brain stem projections to the spinal cord in the rat. *Brain Research Bulletin*, *30*(3–4), 281–9.

- Bading, H., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*, *260*(5105), 181–186.
- Baggott, L. M., Davis-Butler, S., & Moore, H. D. (1987). Characterization of oestrus and timed collection of oocytes in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Reproduction and Fertility*, *79*(1), 105–114.
- Baker, M. L., Wares, J. P., Harrison, G. A., & Miller, R. D. (2004). Relationships Among the Families and Orders of Marsupials and the Major Mammalian Lineages Based on Recombination Activating Gene-1. *Journal of Mammalian Evolution*, *11*(1), 1–16.
- Barthélemy, D., & Cabana, T. (2005). Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Developmental Brain Research*, *155*(2), 87–98.
- Bekoff, A., & Trainer, W. (1979). The development of interlimb co-ordination during swimming in postnatal rats. *The Journal of Experimental Biology*, *83*, 1–11.
- Berretta, S., Robertson, H. A., & Graybiel, A. M. (1992). Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. *Journal of Neurophysiology*, *68*(3), 767–777.
- Brunjes, P. C., Jazaeri, A., & Sutherland, M. J. (1992). Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *The Journal of Comparative Neurology*, *320*(4), 544–554.
- Cabana, T. (2000). The development of mammalian motor systems: The opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Research Bulletin*, *53*(5), 615–626.
- Cannon, J.R., Bakker, H.R., Bradshaw, S.D., & McDonald, I.R. (1976) Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka. *Nature*, *259*, 42.

- Cassidy, G., Boudrias, D., Pflieger, J. F., & Cabana, T. (1994). The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 43(4–5), 244–53.
- Chen, X., & Herbert, J. (1995). Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: Correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience*, 64(3), 675–685.
- Cohen, B., King, W. M., Nichols, R., Yates, B. J., McCall, A. A., & Miller, D. M. (2017). Descending influences on vestibulospinal and vestibulosympathetic Reflexes. *Frontiers in Neurology*, 8(8), 1–15.
- Curthoys, I. S. (1982). Postnatal developmental changes in the response of rat primary horizontal semicircular canal neurons to sinusoidal angular accelerations. *Experimental Brain Research*, 47(2), 295–300.
- Dai, X., Noga, B. R., Douglas, J. R., & Jordan, L. M. (2005). Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. *Journal of Neurophysiology*, 93(6), 3442–3452.
- De Boer-van Huizen, R. T., & Ten Donkelaar, H. J. (1999). Early development of descending supraspinal pathways: A tracing study in fixed and isolated rat embryos. *Anatomy and Embryology*, 199(6), 539–547.
- Desmadryl, G., Raymond, J., & Sans, A. (1986). In vitro electrophysiological study of spontaneous activity in neonatal mouse vestibular ganglion neurons during development. *Developmental Brain Research*, 25(1), 133–136.
- Desmarais, M. J., Beaugard, F., Cabana, T., & Pflieger, J. F. (2016). Facial Mechanosensory Influence on Forelimb Movement in Newborn Opossums, *Monodelphis domestica*. *Plos One*, 11(2), 15.

- Douglas, R. M., Dragunow, M., & Robertson, H. A. (1988). High-frequency discharge of dentate granule cells, but not long-term potentiation, induces c-fos protein. *Molecular Brain Research*, 4(3), 259–262.
- Drews, B., Roellig, K., Menzies, B. R., Shaw, G., Buentjen, I., Herbert, C. A., & Renfree, M. B. (2013). Ultrasonography of wallaby prenatal development shows that the climb to the pouch begins in utero. *Scientific Reports*, 3, 1458.
- Edwards, M. J., & Deakin, J. E. (2013). The marsupial pouch: implications for reproductive success and mammalian evolution. *Australian Journal of Zoology*, 61(1), 41.
- Fadem, B. H., & Rayve, R. S. (1985). Characteristics of the oestrous cycle and influence of social factors in grey short-tailed opossums (*Monodelphis domestica*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 73(2), 337–42.
- Fadem, B. H., Trupin, G. L., Maliniak, E., VandeBerg, J. L., & Hayssen, V. (1982) Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory animal sciences*, 32, 405–409.
- Fady, J. C., Jamon, M., & Clarac, F. (1998). Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Developmental Brain Research*, 108(1–2), 111–123.
- Freyer, C., Zeller, U., & Renfree, M. B. (2003). The marsupial placenta: a phylogenetic analysis. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology*, 299(1), 59–77.
- Gacek, R. R. (1969). *The Course and central termination of first order neurons supplying vestibular endorgans in the cat*. Uppsala : Almqvist & Wiksells.
- Gemmell, R. T. (2002). Induction of birth in the bandicoot (*Isodon macrourus*) with prostaglandin and oxytocin. *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(2), 291–300.

- Gemmell, R. (2004). Implications of Marsupial Births for an Understanding of. *International Journal of Comparative Psychology*, 17(1), 53–70.
- Gemmell, R. T., & Nelson, J. (1989). Vestibular system of the newborn marsupial cat *Dasyurus hallucatus*. *The Anatomical Record*, 225(3), 203–208.
- Gemmell, R. T., & Nelson, J. (1992). Development of the vestibular and auditory system of the northern native cat, *Dasyurus hallucatus*. *The Anatomical Record*, 234(1), 136–143.
- Gemmell, R. T., Peters, B., & Nelson, J. (1988). Ultrastructural identification of Merkel cells around the mouth of the newborn marsupial. *Anatomy and Embryology*, 177(5), 403–408.
- Gemmell, R. T., Veitch, C., & Nelson, J. (2002). Birth in marsupials. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131(4), 621–630.
- Gingras, J. & Cabana, T. (1999). Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 414(4), 551–560.
- Goldberg, J. M. (2012). *The vestibular system : a sixth sense*. New York : Oxford University Press.
- Green, B., & Merchant, J. C. (1988). The Composition of Marsupial Milk. Dans *The Developing Marsupial : models for biomedical research*. Eds : Tyndale-Biscoe, C. H., & Janssens, P. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Grillner, S. (1975). Central Locomotion Mechanisms in Vertebrates : and Reflex Interaction. *Physiological Reviews*, 55(2).
- Grillner, S. (1981). Control of Locomotion in Bipedes, Tetrapods, and Fish. Dans *Comprehensive Physiology*. New Jersey : John Wiley & Sons.
- Grillner, S., & Hongo, T. (1972). Vestibulospinal Effects on Motoneurons and Interneurons in the Lumbosacral Cord. *Progress in Brain Research*, 37(C), 243–262.

- Grillner, S., Hongo, T., & Lund, S. (1970). The vestibulospinal tract. Effects on alpha-motoneurons in the lumbosacral spinal cord in the cat. *Experimental Brain Research*, 10(1), 94–120.
- Gubits, R. M., Hazelton, J. L., & Simantov, R. (1988). Variations in c-fos gene expression during rat brain development. *Brain Research*, 427(2), 197–201.
- Hartman, C. G. (1920). Studies in the development of the opossum *Didelphys virginiana* L. V. The phenomena of parturition. *The Anatomical Record*, 19(5), 251–261.
- Henkel, C. K., & Martin, G. F. (1977 a). The vestibular complex of the american opossum, *Didelphis virginiana*. I. Conformation, cytoarchitectur and primary vestibular input. *Journal of Comparative Neurology*, 172(2), 299–320.
- Henkel, C. K., & Martin, G. F. (1977 b). The vestibular complex of the american opossum *Didelphis virginiana*. II. Afferent and efferent connections. *Journal of Comparative Neurology*, 172(2), 321–348.
- Hughes, R. L., & Hall, L. S. (1988). Structural adaptations of the newborn marsupial. Dans C. H. Tyndale-Biscoe & P. A. Janssens (Eds.), *The Developing Marsupial: Models for Biomedical Research*. Berlin : Springer.
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(13), 632-634.
- Jones, T. E., & Munger, B. L. (1985). Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosensory Research*, 3(2), 169–184.
- Kasumacic, N., Glover, J. C., & Perreault, M.-C. (2010). Segmental patterns of vestibular-mediated synaptic inputs to axial and limb motoneurons in the neonatal mouse assessed by optical recording. *TJP The Journal of Physiology*, 588(24), 4905–4925.

- Katz, L. C., & Shatz C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290), 1133–1138.
- Kemp, T. S., & Thomas, S. (2005). *The origin and evolution of mammals*. New York : Oxford University Press.
- Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 279–306.
- Killian, J. K., Buckley, T. R., Stewart, N., Munday, B. L., & Jirtle, R. L. (2001). Marsupials and Eutherians reunited: Genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution. *Mammalian Genome*, 12(7), 513–517.
- Kitchener, P. D., Hutton, E. J., & Knott, G. W. (2006). Primary sensory afferent innervation of the developing superficial dorsal horn in the South American opossum *Monodelphis domestica*. *CNE Journal of Comparative Neurology*, 495(1), 37–52.
- Knott, G. W., Kitchener, P. D., & Saunders, N. R. (1999). Development of motoneurons and primary sensory afferents in the thoracic and lumbar spinal cord of the South American opossum *Monodelphis domestica*. *CNE Journal of Comparative Neurology*, 414(4), 423–436.
- Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor : a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–97.
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- *c-fos* and Beyond. *JNE Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672.
- Krause, W. J. (1991). The vestibular apparatus of the opossum (*Didelphis virginiana*) prior to and immediately after birth. *Acta Anatomica*, 142(1), 57–59.
- Kruijjer, W., Cooper, J., Hunter, T., & Verma, I. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature*, 312, 711–16.

- Kudo, N., Furukawa, F., & Okado, N. (1993). Development of descending fibers to the rat embryonic spinal cord. *Neuroscience Research*, *16*(2), 131–141.
- Lai, S.-K., Lai, C.-H., Yung, K. K. L., Shum, D. K. Y., & Chan, Y.-S. (2006). Maturation of otolith-related brainstem neurons in the detection of vertical linear acceleration in rats. *The European Journal of Neuroscience*, *23*(9), 2431–2446.
- Lai, C.-H., Tse, Y.-C., Shum, D. K. Y., Yung, K. K. L., & Chan, Y.-S. (2004). Fos expression in otolith-related brainstem neurons of postnatal rats following off-vertical axis rotation. *The Journal of Comparative Neurology*, *470*(3), 282–96.
- Lai, C. H., Yiu, C. N. S., Lai, S. K., Ng, K. P., Yung, K. K. L., Shum, D. K. Y., & Chan, Y. S. (2010). Maturation of canal-related brainstem neurons in the detection of horizontal angular acceleration in rats. *Journal of Comparative Neurology*, *518*(10), 1742–1763.
- Lakke, E. A. J. F. (1997). *The projections to the spinal cord of the rat during development : a time-table of descent*. Berlin; New York : Springer.
- Lannou, J., Precht, W., & Cazin, L. (1979). The postnatal development of functional properties of central vestibular neurons in the rat. *Brain Research*, *175*(2), 219–232.
- Lavallée, A., & Pflieger, J.-F. (2009). Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: an anatomical study. *Brain Research*, *1282*, 1–9.
- Luckman, S. M., Dyball, R. E., & Leng, G. (1994). Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *The Journal of Neuroscience*, *14*, 4825–4830.
- Ji, Q., Luo, Z.-X., Yuan, C.-X., Wible, J. R., Zhang, J.-P., & Georgi, J. A. (2002). The earliest known eutherian mammal. *Nature*, *416*(6883), 816–822.

- Jones, T. E., & Munger, B. L. (1985). Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosensory Research*, 3(2), 169–184.
- Macrini, T. (2004). *Monodelphis domestica*. *Mammalian Species*, 760, 1–8.
- Malun, D., & Brunjes, P.C. (1996) Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *Journal of Comparative Neurology*, 368 : 1–16.
- Martin, K. E. A., & Mackay, S. (2003). Postnatal development of the fore- and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Anatomy*, 202(1), 143–152.
- Mate, K. E., Robinson, E. S., Vandeberg, J. L., & Pedersen, R. A. (1994). Timetable of In Vivo Embryonic Development in the Grey Short-Tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Molecular Reproduction and Development*, 39(4), 365.
- McCluskey, S. U., Marotte, L. R., & Ashwell, K. W. S. (2008). Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain, Behavior and Evolution*, 71(4), 271–286.
- Meredith, R. W., Westerman, M., Case, J. A., & Springer, M. S. (2008). A Phylogeny and Timescale for Marsupial Evolution Based on Sequences for Five Nuclear Genes. *Journal of Mammalian Evolution*, 15(1), 1–36.
- Messer, M., & Green, B. (2006). Milk Carbohydrates of Marsupials II. Quantitative and Qualitative Changes in Milk Carbohydrates during Lactation in the Tammar Wallaby (*Macropus eugenii*). *Australian journal of Biological Sciences*, (1964), 519–532.
- Mikkelsen, T. S., Wakefield, M. J., Aken, B., Amemiya, C. T., Chang, J. L., Duke, S., & Lindblad-Toh, K. (2007). Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature*, 447(7141), 167–177.

- Morgan, J. I., & Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends in Neurosciences*, *12*(11), 459–462.
- Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., & Curran, T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, *312*(5996), 716–20.
- Nilsson, M. A., Churakov, G., Sommer, M., Tran, N. Van, Zemann, A., Brosius, J., & Schmitz, J. (2010). Tracking marsupial evolution using archaic genomic retroposon insertions. *PLoS Biology*, *8*(7), e1000436.
- Parrad, P. J., & Cottureau, P. (1977). Apparition des réactions rotatoires chez le rat nouveau-né. *Physiology & Behavior*, *18*(6), 1017–1020.
- Paxinos, G., Tork, I., Tecott, L.H. & Valentino, K.L. (1991). *Atlas of the developing rat brain*. Cambridge : Academic Press.
- Pearson, J. (1944). The female urogenital system of the Marsupialia with special reference to the vaginal complex. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*.
- Penny, D., & Hasegawa, M. (1997). The platypus put in its place. *Nature*, *387*, 549–550.
- Peterson, B.W., & Abzug, C. (1975). Properties of projections from vestibular nuclei to medial reticular formation in the cat. *Journal of Neurophysiology*, *38*(6), 1421–1435.
- Peterson, B. W., Maunz, R. A., Pitts, N. G., & Mackel, R. G. (1975). Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Experimental Brain Research*, *23*(4), 333–351.
- Pflieger, J. F., & Cabana, T. (1996). The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy and Embryology*, *194*(1), 75–88.
- Pflieger, J. F., Cassidy, G., & Cabana, T. (1996). Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behavioural Brain Research*, *80*(1–2), 137–143.

- Philpot, B. D., Jazaeri, A. A., & Brunjes, P. C. (1994). The development of serotonergic projections to the olfactory bulb of *Monodelphis domestica* (the grey, short-tailed opossum). *Developmental Brain Research*, 77(2), 265–270.
- Piché, M., Chabot, N., Bronchti, G., Miceli, D., Lepore, F., & Guillemot, J. P. (2007). Auditory responses in the visual cortex of neonatally enucleated rats. *Neuroscience*, 145(3), 1144–1156.
- Puzzolo, E., & Mallamaci, A. (2010). Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Development*, 5, 8.
- Reimer, K. (1996). Characterization of the brainstem auditory evoked potential (BAEP) in the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Audiology*, 35(4), 204–216.
- Renfree, M. B. (2010). Review: Marsupials: placental mammals with a difference. *Placenta*, 31(A), S21-26.
- Robinson, E. S., Renfree, M. B., Short, R. V., & Vandeberg, J. L. (1991). Mammary glands in male marsupials. 2.* Development of teat primordia in *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, 3(3), 295–301.
- Russell, B. Y. E. M. (1982). Patterns of parental care and parental investment in marsupials. *Biological Reviews*, 57(3), 423–486.
- Sánchez-Villagra, M. R., Gemballa, S., Nummela, S., Smith, K. K., & Maier, W. (2002). Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in marsupial mammals. *Journal of Morphology*, 251(3), 219–238.
- Sans, A., Pujol, R., & Marty, R. (1968) Étude du réflexe de redressement dans la période postnatale chez divers mammifères. *Psychologie France*, 13, 351–353.

- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., & Verma, I. M. (1988 a). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, 334(6180), 314–319.
- Sassone-Corsi, P., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P. L., & Verma, I. M. (1988 b). Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes & Development*, 2(12 A), 1529–1538.
- Schneider, N. Y. (2011). The development of the olfactory organs in newly hatched monotremes and neonate marsupials. *Journal of Anatomy*, 219(2), 229–42.
- Schneider, N. Y., Fletcher, T. P., Shaw, G., & Renfree, M. B. (2009). The olfactory system of the tammar wallaby is developed at birth and directs the neonate to its mother's pouch odours. *Reproduction (Cambridge, England)*, 138(5), 849–57.
- Shapiro, L. S., Roland, R. M., & Halpern, M. (1997). Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Morphology*, 234(2), 109–129.
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485.
- Stanfield, C .L. (2012) *Principles of Human Physiology*. New Jersey : Pearson.
- Stonebrook, M. J., & Harder, J. D. (1992) Sexual maturation in female gray short — tailed opossums, *Monodelphis domestica*, is dependent upon male stimuli. *Biology of Reproduction*, 46, 290 – 294
- Swanson, J. J., Kuehl-Kovarik, M. C., Elmquist, J. K., Sakaguchi, D. S., & Jacobson, C.D. (1999) Development of the facial and hypoglossal motor nuclei in the neonatal Brazilian opossum brain. *Developmental Brain Research*, 112(2), 159-72.

- Tarozzo, G., Peretto, P., Biffo, S., Varga, Z., Nicholls, J. G., & Fasolo, A. (1995). Development and migration of olfactory neurones in the nervous system of the neonatal opossum. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 262(1363), 95–101.
- Taylor, J. S. H., & Guillery, R. W. (1994). Early development of the optic chiasm in the gray short tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 350(1), 109–121.
- Tyndale-Biscoe, H. (2005). *Life of marsupials*. Melbourne : Csiro Publishing.
- Tyndale-Biscoe, C. H. & Renfree, M. B. (1987). *Reproductive physiology of marsupials*. New York : Cambridge University Press.
- Van Rheede, T., Bastiaans, T., Boone, D. N., Hedges, S. B., De Jong, W. W., & Madsen, O. (2006). The platypus is in its place: Nuclear genes and indels confirm the sister group relation of monotremes and therians. *Molecular Biology and Evolution*, 23(3), 587–597.
- VandeBerg, J. L., & Robinson, E. S. (1997). The Laboratory Opossum (*Monodelphis Domestica*) in Laboratory Research. *ILAR Journal*, 38(1), 4–12.
- Vandeberg, J. L., & Williams-Blangero, S. (2010). The Laboratory Opossum. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, 8, 246–261.
- Van De Water, T. R., Wersäll, J., Anniko, M., & Nordeman, H. (1978). Development of the sensory receptor cells in the utricular macula. *Otolaryngology*, 86(2), 297-304.
- Van Rheede, T., Bastiaans, T., Boone, D. N., Hedges, S. B., De Jong, W. W., & Madsen, O. (2006). The platypus is in its place: Nuclear genes and indels confirm the sister group relation of monotremes and therians. *Molecular Biology and Evolution*, 23(3), 587–597.
- Veitch, C. E., Nelson, J., & Gemmell, R. T. (2000). Birth in the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula* (Marsupialia : Phalangeridae). *Australian Journal of Zoology*, 48(6), 691–700.

- Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E., & Pflieger, J. F. (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 40(1-3), 118-29.
- Waite, P. M. E., Marotte, L. R., & Leamey, C. A. (1994). Timecourse of development of the wallaby trigeminal pathway. I. Periphery to brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 350(1), 75-95.
- Walker, P. D., & Carlock, L. R. (1993). Immediate Early Gene Activation During the Initial Phases of the Excitotoxic Cascade. *Journal of Neuroscience Research*, 36, 588-595.
- Wang, X. M., Xu, X. M., Qin, Y. Q., & Martin, G. F. (1992). The origins of supraspinal projections to lumbosacral and cervical levels of the spinal cord in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 68(2), 203-16.