

2M11.2644.6

Université de Montréal

Synaptogenèse dans les renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière de  
l'opossum, *Monodelphis domestica*.

par

Jacinthe Gingras

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

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

Août 1998

© Jacinthe Gingras, 1998



QH  
302  
U54  
1998  
V.013



Université de Montréal

Bibliothèque



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:  
Synaptogenèse dans les renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière de  
l'opossum, *Monodelphis domestica*.

Présenté par:  
Jacinthe Gingras

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:	Dr Michel Ancil
Directeur de recherche:	Dr Thérèse Cabana
Membre du jury:	Dr Richard Robitaille

mémoire accepté le: 19. 0 8. 19 98

## Sommaire

Les systèmes moteurs commencent à se former très tôt au cours du développement embryonnaire, les rendant peu accessibles pour études chez les mammifères. Une façon d'éviter ce problème d'accessibilité aux stades précoces du développement mammalien est d'utiliser comme modèle expérimental une espèce marsupiale. Nous utilisons comme modèle expérimental le petit opossum brésilien *Monodelphis domestica*, un marsupial qui s'élève très bien en captivité. L'immaturation de cette espèce à la naissance a déjà permis, aux chercheurs du laboratoire de T. Cabana, d'étudier le développement de la plupart des voies motrices centrales, ainsi que le développement des membres dans des actes simples comme les réflexes sensorimoteurs, et plus complexe comme la locomotion. Compte tenu du retard considérable observé entre l'apparition et la maturation des comportements moteurs par rapport à la formation des différentes voies motrices, nous avons tenté de voir s'il existait une meilleure corrélation entre ces premiers et la formation des synapses (synaptogenèse) dans le renflement brachial et lombosacré (innervant les membres antérieurs et postérieurs respectivement) de la moelle épinière. En effet, l'apparition des fonctions motrices ne dépend pas seulement de la formation des voies qui les contrôlent, i.e. la croissance axonique, mais, entre autre, de l'établissement de connexions fonctionnelles entre elles (synaptogenèse).

Pour réaliser cette étude, nous avons effectué des coupes transversales du renflement brachial et lombosacré de la moelle épinière d'opossums d'âge croissant. La moelle épinière avait préalablement été fixée au paraformaldéhyde et cryoprotégée. Les renflements ont été embloqués individuellement, congelés puis coupés à 30  $\mu\text{m}$  au cryostat. Les coupes ont été révélées immunohistochimiquement avec des anticorps monoclonaux dirigés contre trois protéines présynaptiques: la synaptophysine, la synaptotagmine-I et la SNAP-25. Des photographies ont été prises en microscopie

photonique pour analyser la distribution spatio-temporelle du marquage des trois protéines mentionnées. Des observations simples en microscopie électronique ont également été effectuées.

Chez l'adulte, le marquage des trois protéines est concentré dans la matière grise de la moelle épinière sous forme de varicosités entourant les corps cellulaires et les dendrites (lorsque visibles) des cellules nerveuses.

Dans la matière blanche présomptive de l'opossum nouveau-né, le marquage initial (pour les trois protéines) est observé dans les funicules ventraux et latéraux. Au cours du développement, le marquage envahit les funicules dorsaux de la matière blanche. Lors de la quatrième et cinquième semaine postnatale (pour le renflement brachial et lombosacré respectivement), le marquage diminue considérablement dans la matière blanche, moment où les réflexes simples sont matures et où la locomotion apparaît. Ce n'est qu'au cours des deux semaines suivantes que le marquage disparaît complètement. Le développement du marquage dans les différents funicules de la matière blanche est corrélé avec le développement des différentes voies centrales. Dans la matière grise, le marquage apparaît tout d'abord dans la région ventrolatérale des cornes ventrales puis envahit, au cours de la première et de la deuxième semaine, les cornes dorsales, moment où les premiers réflexes sensorimoteurs simples apparaissent. Des varicosités accolées aux motoneurones présumés et aux dendrites proximaux sont observées pour la première fois au cours de la troisième semaine. Ce n'est qu'au cours de la quatrième semaine que la matière grise est complètement marquée.

Ainsi, la synaptogenèse chez l'opossum *Monodelphis domestica* se produit donc majoritairement postnatalement, ce qui a été confirmé en microscopie électronique. Des études antérieures ont démontré qu'il en est de même pour la formation des voies motrices

centrales, la myélinogenèse périphérique et centrale et l'apparition de la plupart des comportements moteurs. De plus, le développement du marquage des trois protéines synaptiques correspond à la croissance des principales voies motrices et à l'expression des comportements sensorimoteurs simples. La synaptogenèse s'effectue selon trois gradients généraux: le premier est rostrocaudal, c'est-à-dire que la synaptogenèse s'effectue dans le renflement brachial avant le renflement lombosacré, le second est ventrodorsal, c'est-à-dire que la synaptogenèse s'effectue dans la corne ventrale de la matière grise avant la corne dorsale et le troisième est latéromédian, c'est-à-dire que la synaptogenèse s'effectue dans la région latérale de la matière grise avant la région médiane. Enfin, il existe une meilleure corrélation entre la formation des voies motrices et la synaptogenèse qu'entre la première et la maturation des comportements moteurs.

**Mots clés:** Synaptogenèse, renflement brachial, renflement lombosacré, synaptophysine, synaptotagmine-I, SNAP-25, *Monodelphis domestica*.

## Table des matières

Sommaire .....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des figures et des tableaux.....	viii
Liste des annexes.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements .....	xi

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction .....	1
1.2 Développement de l'opossum <i>Monodelphis domestica</i> .....	3
1.2.1 Développement somatique.....	3
1.2.2 Développement des comportements moteurs.....	4
1.2.2.1 Réflexes sensorimoteurs simples .....	4
1.2.2.2 Locomotion spontanée .....	5
1.2.3 Développement des centres nerveux moteurs .....	5
1.2.3.1 Moelle épinière et voies propriospinales .....	6
1.2.3.2 Système vestibulaire.....	8
1.2.3.3 Voies descendantes.....	10
1.2.3.4 Voies ascendantes .....	11
1.2.3.5 Myélinogenèse .....	12
1.3 Synaptogenèse.....	14
1.3.1 Synapse et protéines synaptiques.....	14
1.3.1.1 Libération du neurotransmetteur par exocytose .....	15
1.3.1.2 Recyclage des vésicules et des protéines synaptiques .....	18
1.3.1.3 Synaptotagmine-I.....	19
1.3.1.4 Synaptophysine.....	20
1.3.1.5 SNAP-25 .....	20
1.3.2 Croissance axonale et formation de la synapse .....	21
1.4 Problématique.....	22

1.5 Méthodologie .....	22
1.5.1 Immunohistochimie .....	22
1.5.2 Microscopie électronique .....	23
1.5.3 Analyse des résultats .....	24
2. ARTICLES SCIENTIFIQUES PRODUITS LORS DE CE TRAVAIL	
2.1 Article 1:	
Gingras, J., Cabana, T. (1998) The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum <i>Monodelphis domestica</i> . <i>Developmental Brain Research</i> . 106: 211-216.....	41
2.2 Article 2:	
Gingras, J., Cabana, T. (199?) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the postnatal opossum, <i>Monodelphis domestica</i> . (en préparation) sera soumis à Synapse .....	56
3. DISCUSSION ET CONCLUSION .....	86
3.1 Gradients de formation .....	88
3.2 Synaptogenèse et comportements moteurs .....	91
3.3 Perspective .....	93
4. BIBLIOGRAPHIE .....	95
ANNEXES	

## Liste des figures et des tableaux

Figure 1: Schéma des composantes d'un neurone .....	25
Figure 2: Photomicrographie d'une synapse axo-dendritique .....	27
Figure 3: Schéma des principales protéines présynaptiques impliquées lors de l'exocytose.....	29
Figure 4: Schémas (A) du rôle du calcium et des synapsines lors de la dissociation des vésicules synaptiques du cytosquelette et (B) du rôle des protéines Rab lors de l'arrimage de ces dernières .....	31
Figure 5: Schéma du complexe SNARE .....	33
Figure 6: Photographie d'un cône de croissance .....	35
Tableau 1: Nombre d'opossums <i>Monodelphis domestica</i> utilisés en immunohistochimie pour les trois marqueurs synaptiques ainsi que pour la microscopie électronique simple.....	37
Tableau 2: Différences et similitudes entre la synaptophysine, la synaptotagmine-I et la SNAP-25 dans les BR et LS de la moelle épinière chez <i>Monodelphis domestica</i> . ....	39

## Liste des annexes

Annexe 1: Protocole immunohistochimique anti-synaptophysine.....	xii
Annexe 2: Protocole immunohistochimique anti-synaptotagmine-I.....	xiv
Annexe 3: Protocole immunohistochimique anti-SNAP-25.....	xvi

## Liste des abréviations utilisées dans ce mémoire

BR: renflement brachial

C: segment cervical

CAMKII: protéine kinase II Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante.

cm: centimètre

CPG: central pattern generator (générateur de patrons centraux)

Fig.: figure

h: heure

L: segment lombaire

LDPP: longues voies propriospinales descendantes

LS: renflement lombosacré

MA: membres antérieurs

mg: milligramme

mm: millimètre

MP: membres postérieurs

NSF: N-ethyl-maleimide sensitive fusion proteins

P: jour postnatal

PA: potentiel d'action

Rab (a ou b): rabphiline (a ou b)

SNAP: soluble NSF attachment proteins

SNC: système nerveux central

µm: micromètre

µs: microseconde

VAMP: vesicle-associated membrane proteins

VS: vésicule synaptique

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, Mme Thérèse Cabana qui a su m'éclairer tout au long de mes recherches et tout particulièrement lors de la rédaction de ce mémoire. Ses nombreux conseils et ses connaissances ont été très appréciés.

Je tiens également à remercier mon copain François qui a rendu ces deux années de recherche si agréables et ensoleillées. Ta patience, ton support moral et affectif, tes conseils hors pairs, tes nombreuses folies et ton encouragement m'ont permis de mener à terme ce projet.

Je remercie aussi Gilles Cassidy, Louise Pelletier et Jean-Luc Verville pour leurs nombreux conseils techniques et leur patience sans limite. Je tiens également à souligner le travail précieux de Ai-Mai Trieu tout au long de l'été 1997 et l'aide de Isabelle Virard lors de son initiation à la recherche. Mes remerciements à Pierre-Alexandre Landry et Sophie Roy, le clan du F-180, qui ont su me changer les idées et égayer mes longues journées en solitaire au labo.

Je remercie mes parents et ma famille pour leur soutien moral tout au long de mes études.

Enfin, je remercie le Fonds de Bourse en Sciences Biologiques pour la bourse qu'ils m'ont octroyée pour l'année 1997-1998.

# 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 Introduction

La majorité des études effectuées sur les systèmes moteurs des mammifères ont été réalisées en utilisant des espèces placentaires. En ce qui concerne leur développement, on peut classer les mammifères placentaires en deux groupes: les précoces et les non-précoces (Fox, 1964). Les premiers peuvent dès la naissance supporter leur poids et marcher très tôt (ex: les ongulés), les seconds en sont incapables (ex: les carnivores et les rongeurs). En raison de leur immaturité à la naissance, il est possible d'observer postnatalement chez les non-précoces une partie du développement des comportements moteurs (Fox, 1964). Toutefois, si l'on considère les résultats des divers travaux effectués sur les centres nerveux qui contrôlent les actes moteurs (qu'il serait trop long d'énumérer ici), on constate que la plupart des centres sont déjà relativement bien formés dès la naissance, même chez les mammifères non-précoces, rendant l'étude de leur développement difficile.

Pour circonvenir ce problème d'accessibilité aux stades précoces, nous utilisons dans notre laboratoire une espèce marsupiale comme modèle expérimental: l'opossum brésilien *Monodelphis domestica*. L'opossum naît à un stade de développement très immature, 14-15 jours après la conception (Fadem et al., 1982). Nous verrons qu'il a été possible d'étudier, chez cette espèce, le développement de la motricité des membres, ainsi que de la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs, et le tronc ou la tête dans une série de réflexes sensorimoteurs simples et plus complexes de même que dans la locomotion (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). De plus, d'autres études ont permis de démontrer qu'un grand nombre de voies centrales impliquées dans le contrôle moteur se développent partiellement ou entièrement suite à la naissance chez *M. domestica*:

les longues voies propriospinales (Cassidy and Cabana, 1993), les voies spino-encéphaliques (Desrosiers et al., 1993, Qin et al., 1993), les voies bulbo-spinales (Wang et al., 1992; Pflieger et Cabana, 1996), les afférences vestibulaires primaires (Pflieger et Cabana, 1996) et les voies corticofuges (Cabana et al., 1992).

Toutefois, en comparant le décours temporel de la formation des voies motrices centrales à celui de l'apparition et de la maturation des comportements moteurs, on constate un retard significatif de l'apparition des fonctions sur la formation des substrats nerveux. Ce délai peut s'expliquer par le fait que l'apparition des fonctions motrices ne dépend pas seulement de la formation des voies qui les contrôlent, i.e. la croissance axonale, mais également de l'établissement de connexions fonctionnelles entre elles (synaptogenèse) ainsi que du développement de la myéline autour des fibres nerveuses (myélinogenèse).

Ce projet de maîtrise porte sur le premier des deux événements mentionnés, soit la synaptogenèse. Celle-ci est définie comme étant l'étape du développement nerveux durant laquelle les cônes de croissance se transforment en éléments présynaptiques et où les éléments pré- et postsynaptiques se différencient progressivement pour former une synapse mature (voir ci-bas). La synaptogenèse est donc un événement clé dans la formation des différentes voies nerveuses, car c'est à ce moment que se forment les connexions fonctionnelles. La présente étude de la synaptogenèse aux niveaux des renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière pourrait expliquer plusieurs aspects du développement des comportements moteurs de l'opossum.

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

### 1.2.1 Développement somatique

À la naissance, l'opossum mesure environ 10 mm de longueur et pèse approximativement 100 mg (Cassidy et al., 1994). Ses membres antérieurs (MA) sont juste suffisamment développés pour exécuter des mouvements alternés et rythmiques lui permettant de grimper sur le ventre de la mère et d'atteindre une tétine. Cette ascension s'effectue contre la gravité, la mère étant généralement assise sur son arrière-train à la parturition. Une fois la tétine atteinte, le nouveau-né s'y attache (fusion des épithélia de la bouche et de la tétine) et y demeure fixé environ trois semaines, après quoi il s'allaitte encore, mais n'est plus fusionné à la mère; il peut donc s'en détacher librement. Les membres postérieurs (MP) du nouveau-né, quant à eux, sont à peine plus développés que des bourgeons embryonnaires et sont incapables de bouger indépendamment du tronc.

Les épaules, les coudes et les poignets du nouveau-né sont visibles, bien qu'ils ne soient pas flexibles; seuls les doigts le sont. Ces derniers sont séparés les uns des autres et se terminent par de fines griffes. Par contre, les MP n'étant qu'à l'état de bourgeons, leurs articulations ne sont pas encore formés, mais les orteils sont discernables quoique non individualisés. C'est l'articulation de la hanche qui apparaît en premier (jour postnatal (P) 2-3), suivie de celle du genou (P4-5) et enfin de la cheville (~P9). Ce n'est que vers la fin de la deuxième semaine postnatale (P13) que les orteils sont complètement séparés les uns des autres. Les premiers mouvements autonomes des MP apparaissent vers P9. Le développement des articulations des MP se déroule donc selon un gradient proximo-distal (Cassidy et al., 1994), ce qui n'est pas évident pour les MA, et semble même être le contraire.

## 1.2.2 Développement des comportements moteurs

### 1.2.2.1 Réflexes sensorimoteurs-simples

Un réflexe simple est le résultat d'une stimulation sensorielle spécifique caractérisé par une réponse motrice spontanée et involontaire. Les réflexes des membres peuvent être de contrôle purement spinal ou modifiés par les centres supérieurs et incorporés dans des comportements plus complexes.

Tous les réflexes des membres étudiés par Cassidy et al. (1994) semblent apparaître et se développer postnatalement, et ceux des MA avant ceux des MP, en correspondance avec le développement rostro-caudal des membres et de la moelle épinière (voir ci-bas: 1.2.3.1). Les réflexes des MA apparaissent et atteignent leur maturité entre P12 et P39 et ceux des MP entre P17 et P49. Les réflexes simples apparaissent avant les réflexes plus complexes: le réflexe de l'empoignement ("grasp"; MA ~P15 et MP ~P19) et celui de retrait (MA ~P12 et MP ~P17), par exemple, apparaissent bien avant celui du redressement aérien (air righting; ~P33) qui nécessite l'intervention du système vestibulaire. On constate également que les réflexes simples des MP semblent obéir à un gradient proximo-distal. Par exemple, le réflexe de retrait, qui n'implique qu'une flexion au niveau du genou, apparaît et se développe avant l'empoignement qui est une flexion impliquant tous les orteils et le pied. Il semble que ce soit le gradient contraire pour les réflexes des MA. Enfin, les réflexes n'impliquant qu'une seule ceinture apparaissent avant ceux qui impliquent les deux: l'extension croisée des MA apparaît avant la longue extension croisée impliquant en plus les MP.

#### 1.2.2.2 Locomotion spontanée

On a vu que l'opossum nouveau-né effectue des mouvements rythmiques et alternés à l'aide de ses MA lui permettant de grimper sur le ventre de la mère et d'atteindre une tétine. Ces mouvements persistent pendant les trois premières semaines postnatales. Si l'on détache l'animal de la mère et qu'on le dépose sur un substrat rugueux au cours des deux premières semaines, ses membres ne peuvent supporter son poids et il tombe sur le côté ou sur le dos. Par contre, si on le détache au cours de la troisième semaine, ses MA peuvent supporter le poids du corps, mais pas encore les MP. On constate alors que l'arrière-train de l'animal lui sert de pivot autour duquel se déplacent les MA; c'est le pivotement (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). Ce n'est qu'au cours de la quatrième semaine, lorsque l'animal se détache naturellement de la mère, que les MP supportent le poids du corps, que le pivotement disparaît et que la locomotion linéaire apparaît. Cependant, les MP ne supportent pas encore parfaitement le poids du corps et sont positionnés latéralement par rapport à son axe. De plus, ils ne sont pas encore parfaitement coordonnés avec les MA. C'est au cours de la septième semaine que les mouvements de locomotion spontanée sont comparables à ceux observés chez l'adulte, sauf que le jeune a tendance à marcher très rapidement, pour ne pas dire courir (Pflieger et al., 1996). On constate que la locomotion se manifeste bien après les réflexes simples et complexes des membres et nécessite une coordination non seulement entre les membres d'une même ceinture, mais aussi entre les deux ceintures et entre les membres et la tête, sans parler d'ajustements posturaux.

#### 1.2.3. Développement des centres nerveux moteurs

Dans les sections suivantes, nous allons voir que les centres moteurs sont très peu développés à la naissance chez l'opossum *M. domestica*. On peut déjà le constater par des

observations macroscopiques et microscopiques simples (comme des coupes de Nissl) et particulièrement en faisant des expériences de traçage neuronal qui permettent de mettre en évidence les voies nerveuses motrices en croissance. Des études plus récentes sur la myélinogenèse (voir ci-bas) et celles-ci sur la synaptogenèse permettent de corroborer cette assertion.

La locomotion dans sa forme la plus simple est un mécanisme intraspinal. Elle est induite par un groupe de cellules appelé générateur de patrons centraux (central pattern generator ou CPG); ces cellules de la moelle épinière sont possiblement localisées, chez les quadrupèdes, au niveau des deux renflements dans chaque moitié de la moelle épinière. Pour que la locomotion soit adaptée à l'environnement immédiat de l'animal, elle doit être modulée par des afférences primaires ainsi que par des centres encéphaliques (Grillner, 1975). Les principaux centres qui agissent directement sur la moelle épinière des mammifères sont la formation réticulée, le complexe vestibulaire, le noyau rouge et le cortex sensorimoteur. D'autres, notamment le cervelet, agissent surtout ou seulement indirectement sur la moelle et ne seront pas pris en considération dans ce texte.

Ainsi nous allons résumer tour à tour les études qui ont été faites sur le développement des centres de contrôle moteur chez l'opossum, commençant par la moelle épinière et poursuivant avec les principales connexions qu'elle établit avec l'encéphale par le biais des voies descendantes et ascendantes.

#### 1.2.3.1 Moelle épinière et voies propriospinales

La moelle épinière de l'opossum nouveau-né, prélevée de la colonne vertébrale, mesure environ 0,85 cm de longueur (9 cm en moyenne chez le mâle adulte) et son diamètre est de 0,65 mm au niveau du renflement brachial (BR; 3,3 mm chez l'adulte) et

0,50 mm au niveau du renflement lombosacré (LS; 3,2 mm chez l'adulte; observations personnelles).

Même si la moelle épinière se développe plus tôt et plus rapidement que l'encéphale, elle est d'apparence très immature chez l'opossum nouveau-né. On y retrouve sur toute sa longueur un gros canal épendymaire allongé dorso-ventralement et tapissé d'une épaisse zone germinale dans laquelle on peut voir quelques figures mitotiques, surtout dans le LS. La zone germinale est entourée d'une épaisse zone intermédiaire (matière grise présomptive), elle-même entourée d'une mince zone marginale (matière blanche présomptive). Le développement de la moelle épinière est caractérisé par deux gradients généraux: rostro-caudal et ventro-dorsal, c'est-à-dire que le BR commence à se développer avant le LS et que dans un même renflement la plaque basale commence à se développer avant la plaque alaire. Il est intéressant de noter qu'à la naissance, on observe sur des coupes de Nissl les noyaux somatomoteurs au niveau du BR (mains, bras et avant-bras sont mobiles) tandis que leurs pendants sont difficilement identifiables dans le LS (MP: bourgeons immobiles).

Chez les mammifères, les longues voies propriospinales descendantes (LDPP), qui prennent origine dans les segments cervicaux et qui se terminent dans les segments lombosacrés (et plus caudaux), sont responsables de la coordination de la tête et des membres. Elles connectent les CPG des deux renflements et assurent la coordination entre les deux ceintures au cours de la locomotion (Miller, 1970; Grillner, 1975). De plus, certains neurones des segments C3 et C4, qui reçoivent d'importantes projections des centres moteurs encéphaliques, seraient probablement impliqués dans la synchronisation des CPG (Alstermark et al., 1987a, b; Illert et al., 1978).

Comme les MP ne démontrent pas de mouvement autonome avant la deuxième semaine et que la coordination entre eux et les MA n'apparaît que bien plus tard, il est tout à fait légitime de supposer que les LDPP ne sont pas encore formées à la naissance chez l'opossum, mais se développent plutôt postnatalement. Cette hypothèse a été confirmée par Cassidy et Cabana (1993) qui ont montré que les seules LDPP présentes dans le LS au P1 proviennent de quelques neurones des laminae présomptives VII et VIII du BR, soit les laminae à l'origine de la majorité des LDPP chez les mammifères adultes. La majorité de la croissance des LDPP dans LS s'effectue au cours des deux semaines postnatales suivantes; on y retrouve alors des projections en provenance des laminae VII et VIII de segments plus rostraux au BR, ainsi que des projections des laminae IV-VI et IX-X du BR. Suivent ensuite les projections provenant des segments cervicaux plus rostraux. La formation des LDPP vers le LS s'effectue donc selon un gradient général proximo-distal. Le patron adulte des LDPP vers le LS quant à la localisation de leurs neurones d'origine, sinon quant à leur nombre, est acquis vers P17.

#### 1.2.3.2 Système vestibulaire

Le système vestibulaire contrôle la position (orientation) de la tête, de même que la posture et l'équilibre du corps au repos et durant les mouvements (ex: locomotion). Il est composé du labyrinthe vestibulaire de l'oreille interne et du complexe vestibulaire dans le tronc cérébral. Le labyrinthe vestibulaire est composé de l'utricule et du saccule, percevant l'accélération linéaire, de même que des canaux semicirculaires, percevant l'accélération angulaire. Ces structures sont composées d'un épithélium simple cylindrique cilié et de concrétions calcaires appelées otolithes qui stimulent les cellules ciliées selon les mouvements de l'animal. Dans le complexe vestibulaire on retrouve quatre noyaux: le supérieur, le médian, le latéral et l'inférieur. Les quatre noyaux sont reliés au système visuel, mais seuls les trois derniers projettent leurs axones vers la moelle épinière. Leurs

influences sur la moelle épinière sont directes et rapides (Wilson et Melvill-Jones, 1979; Lacour et Borel, 1993).

Le labyrinthe vestibulaire de l'opossum nouveau-né est très immature, mais ses principales composantes peuvent être identifiées en microscopie photonique. Seul l'utricle semble posséder une macula composée de cellules ciliées présomptives et une membrane otolithique. Les afférences primaires du labyrinthe vestibulaire qui pénètrent dans le tronc cérébral se divisent en deux branches, ascendante et descendante, qui se distribuent vers les quatre noyaux vestibulaires (Pflieger et Cabana, 1996). Cependant, le complexe vestibulaire est lui aussi très peu différencié à la naissance: seul le noyau latéral est facilement identifiable, sur coupes de Nissl, au site où le nerf vestibulaire pénètre dans le tronc cérébral. Les trois autres noyaux du complexe ne sont pas encore très distincts; leurs cellules sont petites et indifférenciées (Pflieger et Cabana, 1996).

La présence des afférences primaires dans les quatre noyaux dès la naissance chez l'opossum peut sembler surprenante si l'on se réfère à l'immaturité de toutes ces structures. Toutefois, cela n'implique pas nécessairement que toutes les structures du labyrinthe soient reliées de façon fonctionnelle aux noyaux vestibulaires ou que ces derniers le soient à la moelle épinière. Quoi qu'il en soit, le système vestibulaire (système direct) est certainement mieux développé à la naissance que ne l'est le système olfactif (système indirect; Brunjes et al., 1992) pour intervenir dans le contrôle de l'ascention de l'opossum nouveau-né vers une tétine (Pflieger et Cabana, 1996). L'étude de la synaptogenèse dans ces régions pourra éventuellement permettre de savoir ce qu'il en est de l'état fonctionnel de ces systèmes de projections chez l'opossum nouveau-né.

### 1.2.3.3 Voies descendantes

Comme les projections propriospinales de la moelle épinière se forment en grande partie postnatalement et compte tenu que l'encéphale se développe plus tardivement que la moelle épinière, on s'attend à ce que les voies nerveuses encore plus longues, celles reliant l'encéphale à la moelle (dans les deux directions), se forment elles aussi postnatalement, et même plus tard que les premières.

Une portion des projections en provenance du complexe vestibulaire vers les régions de la moelle qui contrôlent les mouvements de la tête et du cou semble établie à la naissance: la voie vestibulospinale latérale prenant origine dans le noyau vestibulaire latéral et se terminant dans les segments cervicaux. Celles-ci sont suivies par celles provenant du noyau inférieur et enfin par celles du noyau médian (Pflieger et Cabana, 1996). Ces résultats confirment ceux des recherches effectuées à l'aide de traçeurs neuronaux par Desrosiers (1995), selon lesquels les corps cellulaires à l'origine des voies descendantes sont marqués dans le noyau raphé, la formation réticulée médullaire et dans le noyau vestibulaire latéral chez l'opossum nouveau-né. Ces observations s'accordent avec l'hypothèse qui stipulait qu'au moins une partie des afférences du complexe vestibulaire pourraient être impliquées dans le contrôle locomoteur du nouveau-né.

Wang et al. (1992) ont démontré que l'innervation de la moelle par les voies en provenance du tronc cérébral est caractérisée, quant à l'origine de ces dernières, par un gradient général proximo-distal chez *M. domestica*. Ainsi, la formation des voies d'origine médullaire précède celle des voies d'origine pontique, qui elles se forment avant celles d'origine mésencéphalique. Il est important de noter que les axones qui composent chacune de ces voies continuent d'augmenter en nombre durant les semaines suivant la naissance. L'étude de la synaptogenèse nous permettra de déterminer le moment

approximatif où ces différentes voies en provenance du tronc cérébral établissent leurs connexions dans la moelle épinière.

Comme le cortex cérébral des mammifères se développe tardivement, on s'attend à ce que la formation des voies corticofuges se produise aussi tardivement en comparaison aux systèmes précédents. Puisque, chez l'opossum adulte, les axones corticaux ne se projettent pas plus caudalement que le premier segment cervical et ne pénètrent pas la matière grise de la moelle épinière (Cabana et al., 1992), ils n'exercent pas un contrôle direct sur la moelle épinière. Nos études sur la synaptogenèse dans la moelle épinière ne peuvent donc pas nous renseigner directement sur le développement du contrôle cortical des mouvements. Mentionnons toutefois que l'innervation des cibles sous-corticales par les axones du cortex sensorimoteur s'effectue selon un gradient rostro-caudal (Cabana et al., 1992).

#### 1.2.3.4 Voies ascendantes

Nous avons vu précédemment que la locomotion est contrôlée par la moelle épinière et qu'elle est modulée par les centres moteurs de l'encéphale. Pour que ces centres contrôlent la moelle de la façon la plus appropriée qui soit, ils doivent recevoir de l'information sur son activité et sur la périphérie. Cette information est acheminée par l'intermédiaire des cordons dorsaux (funicules gracilis et cuneatus) et ventrolatéraux (voies spino-olivaires, spinoréticulaires, spinothalamiques et spinocérébelleuses). Chez l'opossum nouveau-né, il a été possible de démontrer, à l'aide de traceurs neuronaux (Desrosiers, 1995), que des axones en provenance du LS étaient présents (marqués) dans les funicules ventrolatéraux présomptifs dans la moelle épinière, ainsi qu'à la jonction spinomédullaire présomptive.

Comme nous n'étudions pas la synaptogenèse au niveau encéphalique, mentionnons simplement que les différentes études de traçage effectuées dans notre laboratoire permettent de croire que la croissance des axones BR dans l'encéphale commence prénatalement et se poursuit postnatalement, mais aucune étude n'a adressé directement cette question jusqu'à présent. De plus, la croissance des axones du LS dans les cibles encéphaliques s'effectue postnatalement chez *M. domestica*. Le tout (BR et LS) se réalisant selon un gradient général caudo-rostral.

La majorité des voies descendantes et ascendantes responsables des comportements moteurs se forment donc postnatalement chez *M. domestica*, reflétant une fois de plus l'immaturation des voies motrices chez l'opossum nouveau-né.

#### 1.2.3.5 Myélinogenèse

Comme nous l'avons mentionné plus-haut, un délai significatif s'observe entre l'apparition et la maturation des comportements moteurs et la formation des voies motrices centrales, délai imputé à la synaptogenèse et à la myélinogenèse. Croyant que la myélinogenèse, plutôt que la synaptogenèse, expliquerait d'avantage ce retard, les études du laboratoire ont initialement porté sur cette étape du développement et sont d'ailleurs encore en cours.

La couche de myéline qui recouvre les fibres nerveuses peut augmenter jusqu'à 100 fois la vitesse de la conduction nerveuse (Bischoff and Thomas, 1984) et ainsi contribuer à l'expression et, surtout, à la maturation des mouvements. Les travaux réalisés par Leblond et Cabana (1996 et 1997) sur la myélinisation des racines C8 et L4 de la moelle épinière de l'opossum ont permis de démontrer qu'elle se déroule complètement postnatalement et selon deux principaux gradients: rostro-caudal et ventro-dorsal. Le

premier correspond au gradient du développement de la moelle épinière et des membres et le second au gradient intrasegmentaire de la moelle épinière et des réflexes (voir Altman et Bayer, 1984, pour le rat). Chez *M. domestica*, le nombre de fibres myélinisées semble augmenter de la troisième semaine jusqu'à la septième semaine postnatale, où il dépasse alors celui retrouvé chez l'adulte. Il diminue ensuite graduellement jusqu'à l'âge de trois mois pour atteindre le complément adulte. Le diamètre des fibres continue à augmenter tout au long de ces trois mois. Chez *M. domestica*, la myélinogenèse peut être scindée en trois phases distinctes. La première, caractérisée par une augmentation du nombre de fibres myélinisées et de leur diamètre, correspond à la période d'apparition et de maturation des réflexes sensorimoteurs ainsi qu'au moment où la locomotion s'amorce (quatrième semaine postnatale). La deuxième, où l'on assiste à une période de surproduction de fibres myélinisées, correspond à la période de maturation de la locomotion. La dernière, la phase d'élimination des fibres en excès (présument des collatérales), correspond à peu près au moment où le patron adulte de locomotion est acquis (septième semaine postnatale) bien que, tel que déjà mentionné, la vitesse de l'enjambée soit plus rapide que celle observée à l'âge adulte. Cependant, ce qui est frappant est que seulement une proportion relativement faible de fibres myélinisées semble être nécessaire à l'expression des comportements moteurs et même à leur maturation, du moins en ce qui concerne la myélinogenèse périphérique.

Mentionnons brièvement que des études préliminaires en cours dans le laboratoire, effectuées par immunohistochimie contre une protéine de la myéline et par des observations simples en microscopie électronique, indiquent que la myélinogenèse dans la moelle de l'opossum s'effectue elle aussi postnatalement, particulièrement dans le LS, mais commence néanmoins plus tôt que dans la périphérie (observations personnelles).

### 1.3. Synaptogenèse

On réalise, suite aux observations qui viennent d'être résumées, que la myélinogenèse, du moins périphérique, n'explique que partiellement le délai entre l'apparition des comportements et la formation des voies motrices. On n'en conclut que l'étude de la synaptogenèse dans la moelle épinière s'impose. Dans cette section, nous allons décrire la synapse en détail en soulignant les protéines synaptiques qui nous permettent, dans ce travail, de démontrer la présence de synapses dans la moelle épinière de l'opossum en développement.

#### 1.3.1 Synapse et protéines synaptiques

Le terme synapse a été défini pour la première fois en 1897 par le physiologiste anglais Sherrington. Il la décrit comme étant une caractéristique particulière de la zone de jonction entre deux neurones ou entre un neurone et une cellule effectrice.

Le neurone typique (Fig. 1) est composé d'un corps cellulaire, de multiples dendrites et d'un axone qui se termine par de nombreux embranchements, se terminant eux-même par des renflements appelés boutons (décrits par Auerbach et Held en 1897). Chaque bouton constitue la composante présynaptique d'une synapse. Son pendant postsynaptique, dans le cas de jonctions neuro-neurales, consiste généralement en une portion de dendrite qui fait saillie, l'épine; il s'agit alors d'une synapse de type axo-dendritique. Il existe d'autres types de synapses neuro-neurales telles que les axo-axoniques (axone-axone, généralement sur le bouton synaptique) et les axo-somatiques (axone-corps cellulaire). Il existe également des synapses avec des cellules musculaires, appelées jonctions neuromusculaires ou plaques neuromotrices.

Ce n'est environ que 50 ans après Sherrington que les premières descriptions de synapses en microscopie électronique furent effectuées. Ces travaux, réalisés par Palade et Palay (1956), De Robertis et Bennett (1955) et Robertson (1956) dans plusieurs régions du système nerveux dont le cortex cérébral, les ganglions du système sympathique et la plaque motrice, ont permis de démontrer la présence d'un espace entre les composantes pré- et postsynaptiques, la fente synaptique, qu'ils ont alors évalué à 50 nm. De plus, les membranes des composantes pré- et postsynaptiques sont caractérisées par des épaissements nommés respectivement densités pré- et postsynaptiques (Fig. 2). Ces chercheurs ont également noté, dans la terminaison synaptique, la présence de vésicules dont le diamètre varie entre 30 et 50 nm, les vésicules synaptiques (VS). On y retrouve également une grande quantité d'éléments du cytosquelette (surtout des filaments d'actine), de mitochondries et d'autres vésicules. Par la suite, on a vu que certaines VS sont liées au cytosquelette et que d'autres sont accolées à la membrane présynaptique, concentrées sur des zones dites actives séparées les unes des autres par des régions plus ou moins grandes sans vésicule (Couteaux, 1961; Couteaux et Pécot-Dechavassine, 1970 et 1974). Dans les VS de la terminaison synaptique sont emmagasinés les neurotransmetteurs. Dans une terminaison donnée, on peut retrouver plus d'un neurotransmetteur, mais une vésicule donnée n'en contient habituellement qu'un seul (Gonzalez-Aguilar, 1993).

#### 1.3.1.1 Libération du neurotransmetteur par exocytose

Lorsqu'un neurone est stimulé, sa membrane est dépolarisée, dépolarisation qui se transmet le long de l'axone jusqu'à la terminaison synaptique. La dépolarisation de la membrane synaptique entraîne, à proximité des zones actives, l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, provoquant une entrée de calcium ( $Ca^{+2}$ ) extracellulaire dans la cellule. Cet influx de  $Ca^{+2}$  occasionne la fusion des VS des zones actives à la

membrane présynaptique et leur ouverture vers la fente synaptique (maintenant mesurée à 20-30 nm de largeur; Llinas et al., 1981) par la formation d'un pore de fusion, résultant en la libération du neurotransmetteur (del Castillo et Katz, 1955; Katz, 1966), un mécanisme appelé exocytose (review: Zucker, 1996) d'une durée de l'ordre de 200  $\mu$ s suite à l'entrée du  $\text{Ca}^{+2}$  dans la cellule (Llinas et al., 1981; Burgoyne et Morgan, 1995; Calakos et Scheller, 1996). Au niveau de l'élément postsynaptique on retrouve les récepteurs associés aux neurotransmetteurs libérés par les VS.

L'exocytose (Fig. 3) du neurotransmetteur se déroule en trois étapes: 1) le transport des VS liées au cytosquelette vers la membrane présynaptique, 2) leur arrimage à la membrane et 3) leur fusion à celle-ci qui résulte en la libération du neurotransmetteur. (Südhof et Jahn, 1991; Söllner et al., 1993; Bark et Wilson, 1994; O'Connor et al., 1994; Burns et al., 1995; Zucker, 1996)

La dépolarisation de la membrane présynaptique entraîne l'activation de protéines kinases situées sur la membrane des VS, les protéines kinases II  $\text{Ca}^{+2}$ /calmoduline-dépendantes (CAMKII). Ces kinases phosphorylent une protéine associée à la membrane des VS, la synapsine I, qui possède un site pour l'actine et un autre pour la VS (Südhof et al. 1989; Jessell et Kandel, 1993), entraînant sa dissociation du cytosquelette (Fig. 5; Trifaro et Vitale, 1993; Burgoyne et Morgan, 1995; Calakos et Scheller, 1996; Morgan et Burgoyne, 1997). Les VS dissociées sont amenées vers la membrane synaptique (Fig. 4A) par des molécules de transport comme les synapsines (Ia, Ib, IIa et IIb) et d'autres protéines vésiculaires, dont les principales sont les "GTP-binding proteins" (Hess et al. 1993, Ngsee et al. 1990), les plus importantes étant les rabphilines-3a et 3b (Rab3a, Rab3b; Bourne, 1988; Fischer von Mollard et al., 1990; Morgan et Burgoyne, 1997).

Liés au GTP, les Rab ne peuvent arrimer les VS à la membrane présynaptique. L'activation d'une GTPase à proximité de la membrane présynaptique entraîne la déphosphorylation du GTP en GDP, et par le fait même sa dissociation des Rab (Fig. 4B). Les Rab forment alors un complexe de "préfusion" avec la membrane présynaptique (Bourne, 1998). Ensuite, des protéines cytoplasmiques appelées NSF (N-ethyl-maleimide sensitive fusion proteins) et SNAP (soluble NSF attachment proteins) viennent consolider ce complexe en s'associant avec des protéines vésiculaires VAMP (vesicle-associated membrane proteins, telles la synaptobrévine, la synaptophysine, la synaptotagmine et la synaptoporine) ainsi que membranaires (telles la SNAP-25, les syntaxines et les neurexines; Fig. 4). Ce complexe, nommé SNARE (Fig. 5), assure l'arrimage solide des VS à la membrane présynaptique (Augustine et al. 1987; Söllner et al. 1993, O'Connor et al., 1994; Burns et al. 1995; DeBello et al. 1995; Calakos et Scheller, 1996).

Par un mécanisme encore incompris, les protéines vésiculaires et membranaires s'alignent parfaitement de sorte à créer une ouverture par laquelle le neurotransmetteur est libéré; cette ouverture se nomme pore de fusion. La synaptophysine ou la synaptoporine semblent être des candidates protéiques appropriées pour la composante vésiculaire du pore de fusion, tandis que la physophiline serait leur homologue membranaire (Jessell et Kandel, 1993). Lors de l'exocytose, la VS peut être plus ou moins complètement fusionnée à la membrane présynaptique.

On réalise que l'exocytose du neurotransmetteur nécessite la participation d'un grand nombre de protéines vésiculaires, cytoplasmiques et membranaires. Il est même possible qu'une protéine synaptique donnée soit impliquée dans plus d'une étape de l'exocytose. Ces protéines, tout comme les neurotransmetteurs protéiques, sont synthétisées dans le corps cellulaire et acheminées par transport axonal vers la terminaison synaptique (Schwartz, 1979). Certaines passeraient directement de l'appareil de Golgi du

corps cellulaire vers une vésicule de transport pour être acheminées antérogradement vers la terminaison synaptique où elles seront assignées à leur substrat, selon leur nature (Mundigl et De Camilli, 1994). D'autres seraient transférées du Golgi vers une vésicule intermédiaire nommée endosome, puis dans une vésicule de transport (Kiene et Stadler, 1987; Regnier-Vigouroux et al., 1991; Li et al., 1992; Mundigl et De Camilli, 1994; Li et al., 1996). Il s'agit du transport axonal direct et indirect, respectivement.

#### 1.3.1.2 Recyclage des vésicules et protéines synaptiques

Selon le degré de fusion des VS avec la membrane présynaptique, celles-ci seront réincorporées différemment à l'élément présynaptique (von Gersdorff et Matthews, 1994; Koenig et Ikeda, 1996). Le pore de fusion peut se refermer immédiatement et la VS vide se détache de la membrane pour se lier au le cytosquelette (filaments d'actine) de la terminaison synaptique (Ceccarelli et al., 1973 et 1979; von Wedel et al., 1981; Valtora et al., 1988; Torri-Tarelli et al., 1990; Valtora et al., 1990; Fesce et al., 1994). Moins fréquemment, les VS s'incorporent complètement à la membrane synaptique lors de l'exocytose. Les composantes vésiculaires se déplacent alors latéralement dans la membrane présynaptique et des vésicules sont formées par endocytose, via des protéines que l'on nomme clathrines (Heuser et Reese, 1973; von Wedel et al., 1981; Valtora et al., 1988; Heuser, 1989; Torri-Tarelli et al., 1990; Mundigl et De Camilli, 1994), à ces sites latéraux.

Les neurotransmetteurs sont introduits dans ces nouvelles vésicules par un gradient électrochimique transmembranaire de protons qui permet le transfert des neurotransmetteurs du cytoplasme vers l'intérieur de la VS par le biais d'un transporteur protéique. Ce gradient est généré par une pompe à protons située dans la membrane de la VS (Stone et al., 1989).

Pour étudier la synaptogenèse dans la moelle épinière de l'opossum, nous avons détecté la présence de trois de ces protéines importantes dans la transmission synaptique: la synaptophysine, la synaptotagmine-I et la SNAP-25. Non seulement plusieurs recherches sur ces protéines ont-elles été effectuées au cours des dernières années (voir plus bas), mais elles ont été purifiées et des anticorps monoclonaux contre ces protéines sont disponibles commercialement. Le fait d'identifier plus d'une protéine et de choisir à la fois des protéines vésiculaires (synaptophysine et synaptotagmine-I) et membranaire (SNAP-25) nous donne une meilleure assurance de déceler la synaptogenèse quand elle se produit. Les descriptions qui suivent aideront à mieux comprendre leurs rôles et leur importance.

#### 1.3.1.3 Synaptotagmine-I

La synaptotagmine-I est une protéine de 65 kDa retrouvée en abondance dans la membrane des VS (Perin et al., 1990 et 1991; Südhof et Jahn, 1991; Brose et al., 1992; Elferink et al., 1993; Swanson et al., 1996). Elle est constituée d'un petit domaine N-terminal intravésiculaire glycosylé, d'une région transmembranaire unique et d'une longue terminaison cytoplasmique carboxylée composée de deux domaines (C2-domains) sensibles au calcium (Südhof et al. 1987; Südhof et Jahn, 1991; Südhof et Rizo, 1996). Ces domaines calciques réagissent de façon calcium-dépendante avec des molécules cibles responsables de la fusion des VS aux pores de fusion et possiblement lors de l'endocytose des VS (Brose et al., 1992; Damer et Creutz, 1996; Südhof et Rizo, 1996). Cette protéine transmembranaire pourrait agir comme récepteur calcique lors de la libération des neurotransmetteurs (DeBello et al., 1993). Des études effectuées sur des souris mutantes ayant subi une délétion du gène codant pour la synaptotagmine-I ont démontré qu'elle est essentielle à la transmission synaptique (Geppert et al., 1994).

#### 1.3.1.4 Synaptophysine

La synaptophysine, une protéine de 38 kDa, est également retrouvée en grand nombre dans la membrane des VS (Jahn et al., 1985; Südhof et Jahn, 1991; Voigt et al., 1993). Elle est composée de quatre segments transmembranaires et d'une terminaison carboxylée cytoplasmique (Südhof et al. 1987; Südhof et Jahn, 1991) et semble impliquée dans la fusion de la VS à la membrane synaptique. La synaptophysine a maintes fois été utilisée comme marqueur de synapses différenciées mais plusieurs recherches ont démontré que l'expression de cette protéine est corrélée avec la synaptogenèse (Knaus et al., 1986, Devoto et Barnstable, 1989; Osen-Sand et al., 1993; Swanson et al., 1996). De plus, certaines recherches démontrent qu'elle serait également présente dans les cônes de croissance avant même la synaptogenèse (Bergmann et al., 1991; Leclerc et al., 1989; Dai et Peng., 1996; West Greenlee et al., 1996).

#### 1.3.1.5 SNAP-25

La SNAP-25 (synaptosomal-associated protein) est une protéine de 25 kDa associée à la membrane présynaptique (Bark et Wilson, 1994) et qui fait partie du complexe SNARE (Oyler et al., 1989) impliqué dans l'arrimage des VS à la membrane synaptique (Osen-Sand et al., 1993). Elle peut être présente dans le cône de croissance avant que la synapse ne soit formée (Oyler et al., 1991; Osen-Sand et al., 1993) et semblerait également jouer un rôle dans l'élongation de l'axone en croissance en permettant l'insertion de nouvelle membrane. Certains chercheurs ont également démontré qu'un niveau élevé d'expression de cette protéine dans différentes régions du SNC adulte (plus particulièrement dans le cerveau) serait relié à la plasticité synaptique des terminaisons nerveuses (Osen-Sand et al., 1993).

### 1.3.2 Croissance axonale et formation de la synapse

Suite aux étapes de neurulation (formation du tube neural et de la crête neurale), de prolifération cellulaire et de migration qui amène les neuroblastes postmitotiques dans la zone intermédiaire du tube neural (matière grise présumptive), commence l'étape du développement du système nerveux appelée cytodifférenciation (Cowan, 1978). Celle-ci voit la formation d'abord des axones et ensuite des dendrites des neurones (un certain chevauchement s'observe).

Dans leurs études de plusieurs vertébrés, vers la fin des années 1800, tant van Lenhossek que van Gehuchten, van der Stricht, P. Ramon, Sclavunos, Athias, Retzius ou von Kölliker ne réussirent pas à observer l'extrémité du "cylindre-axe" du neuroblaste que Ramon y Cajal fut le premier à décrire (Ramon y Cajal, 1890). L'extrémité de l'axone en croissance se termine par un épaississement conique nommé cône de croissance (Fig. 6). Ses contours, plus ou moins lisses en début de croissance axonale, deviennent très rugueux (Ramon y Cajal, 1911). Ces irrégularités sont les filipodes et les lamellipodes qui, par leurs mouvements amiboïdes, permettent au cône de croissance de s'étendre sur un substrat jusqu'à sa cible.

Une fois la cible atteinte, le cône de croissance entreprend les transformations qui le rendent apte à établir des connexions avec celle-ci. Ces connexions sont les synapses et cette étape du développement se nomme synaptogenèse. Suite au contact de la cible le contenu en glycogène diminue dans l'élément présynaptique présumptif et des VS commencent à apparaître. On assiste ensuite à l'épaississement de la membrane de l'élément postsynaptique au site de contact puis, graduellement, la surface de la jonction synaptique augmente et se complexifie. Les zones actives apparaissent au fur et à mesure que des VS s'accrochent à la membrane présynaptique (Purves et Lichtman, 1984). Il mesure que le nombre de vésicules synaptiques dans l'élément présynaptique augmente,

les récepteurs sont incorporés dans la membrane postsynaptique (Devoto, 1990). Les éléments pré- et postsynaptiques établissent des jonctions intercellulaires entre-eux via des molécules de surface, tel la N-CAM et l'agrine (Chow, 1990; Magill-Solc et McMahan, 1990).

#### 1.4 Problématique

Nous avons vu que la presque totalité des comportements moteurs apparaissent postnatalement et se développent pendant une longue période de temps chez *M. domestica*. Nous avons également vu qu'il existe un délai considérable entre l'apparition et la maturation d'un grand nombre de comportements moteurs et la formation des différentes voies motrices. Nous tentons ici de mieux comprendre ce délai en étudiant la synaptogenèse dans le renflement brachial (BR) et lombosacré (LS) de la moelle épinière innervant respectivement les membres antérieurs et postérieurs. Pour ce faire, nous avons tenté de déterminer le début de la formation des synapses et de corrélérer ces résultats avec ceux obtenus antérieurement lors des études de la formation de voies nerveuses afin de vérifier si ces derniers étaient mieux corrélés à la synaptogenèse plutôt qu'à l'apparition et la maturation des comportements moteurs. Nous avons procédé à l'aide d'une technique d'immunohistochimie qui nous a permis de déterminer la distribution spatiale de trois protéines présynaptiques (la synaptophysine, la synaptotagmine-I et la SNAP-25) au cours du développement postnatal de *Monodelphis domestica*.

#### 1.5 Méthodologie

##### 1.5.1 Immunohistochimie

Un total de 76 opossums âgés de jour 1 (jour postnatal: P1) à P64 ainsi que 4 adultes ont été utilisés (Tableau 1). Les jeunes (P1 à P64) ont été anesthésiés au Metofane,

tandis que les adultes l'ont été par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (Somnotol). Après avoir dégagé le dorsum des vertèbres, la moelle épinière des animaux de P1 à P18 a été fixée par immersion complète (48 h) dans la solution de Zamboni (2% paraformaldéhyde/12% acide picrique/0.1 M tampon Sorenson, pH 7,3), tandis que la moelle épinière des autres a été entièrement prélevée de la colonne vertébrale une fois le tissu fixé par perfusion cardiaque à l'aide du même fixateur suivie d'une postfixation (48 h) par immersion complète dans le même fixateur. Tous les tissus ont été cryoprotégés (sucrose 30%), les renflements BR et LS ont été sectionnés du reste de la moelle épinière, embloqués individuellement, congelés et conservés dans un congélateur à -80 C. Les renflements ont été tranchés en coupes sérielles (30 µm) au cryostat, coupes qui ont été montées sur lame de verre préalablement enduite de poly-L-lysine, puis réfrigérées (4 C) jusqu'à traitement immunohistochimique (Swanson et al. 1996) pour révéler la présence des trois protéines présynaptiques mentionnées (voir annexes).

### 1.5.2 Microscopie électronique

Au total, 10 opossums ont été utilisés pour la microscopie électronique. Les opossums ont été anesthésiés par une surdose de Metofane, le dorsum des vertèbres a été enlevé et ils ont été fixés par immersion complète (2h) dans une solution de 2,5% glutaraldéhyde/ tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4; 4 C). La moelle épinière a été prélevée de la colonne vertébrale et rincée toute la nuit dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4), puis postfixée 2 h dans une solution de 2% OsO<sub>4</sub>/tampon cacodylate 0.1 M (pH 7,4; 4 C). Les renflements BR et LS ont été prélevés et rincés 45 min dans l'eau distillée puis immergés dans une solution de 1% d'acétate d'uranium pendant une heure. Ensuite, ils ont été déshydratés dans une série de bains de concentration croissante d'éthanol (10 min/bain 30% à 95% et 2 x 10 min dans 100%). Le tissu a été infiltré avec un solvant de transition (oxyde de propylène; 1 x 10 min) puis avec différents mélanges: 1:1 oxyde de

propylène + Épon (4h); 1:3 oxyde de propylène + Épon (toute la nuit); 3 x Épon pur (deux heures), puis avec de l'Épon pur toute la nuit (sous vide). (tiré et modifié de Balslev et al. 1992)

Les renflements ont été enrobés dans de l'Épon extemporané et polymérisés 24 h à 60 C. Des coupes semi-fines (0,5 µm) et ultra-fines (100 nm) ont été effectuées à l'ultramicrotome, ces dernières ont été contrastées à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb et montées sur des grilles de cuivre (300 mèches) pour les observer et les photographier au microscope électronique à transmission (JEOL JEM 100S).

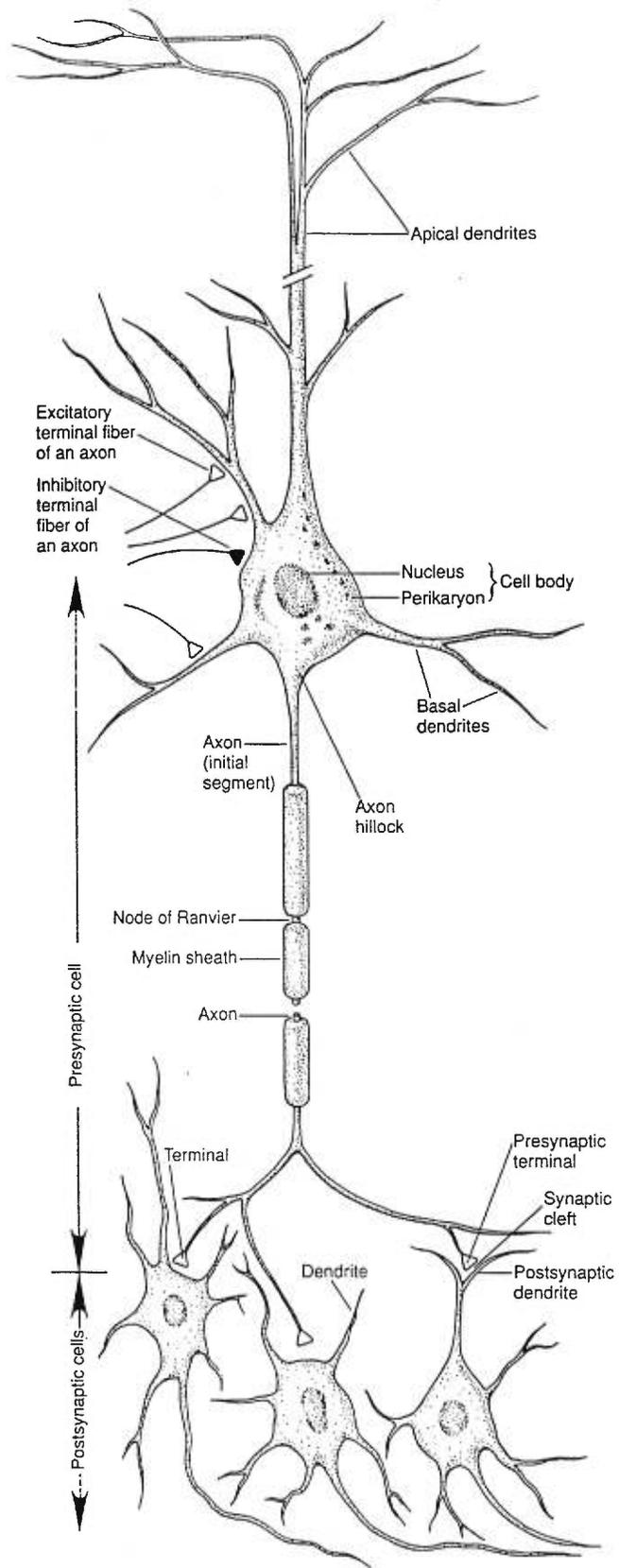
### 1.5.3 Analyse des résultats

La présence des protéines révélées à l'aide des différents anticorps monoclonaux a été observée en microscopie photonique. Des photographies prises aux différents âges ont été analysées et comparées. Nous nous sommes concentrées sur la distribution spatio-temporelle de ces protéines, pour tenter d'élucider la synaptogenèse dans la moelle épinière chez *M. domestica*.

## Figure 1

### Schéma des composantes d'un neurone.

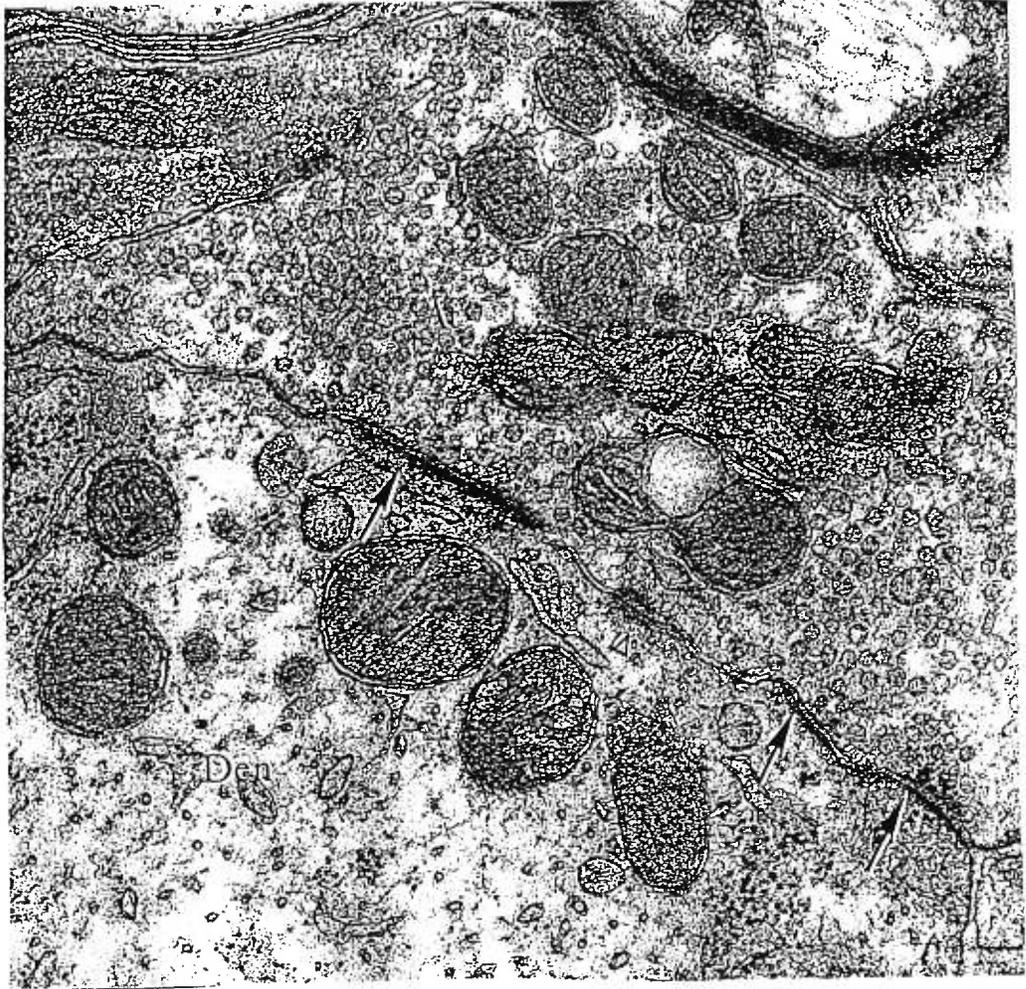
Représentation d'un neurone et de ses composantes typique des vertébrés. On remarque le corps cellulaire entouré de ses nombreux dendrites et de son unique axone myélinisé. L'axone se termine par de nombreuses arborisations, se terminant eux-même par des renflements appelés boutons. Chaque bouton constitue la composante présynaptique d'une synapse tandis que la cellule voisine correspond à la composante post-synaptique. (tiré de Kandel et al., 1991)



## Figure 2

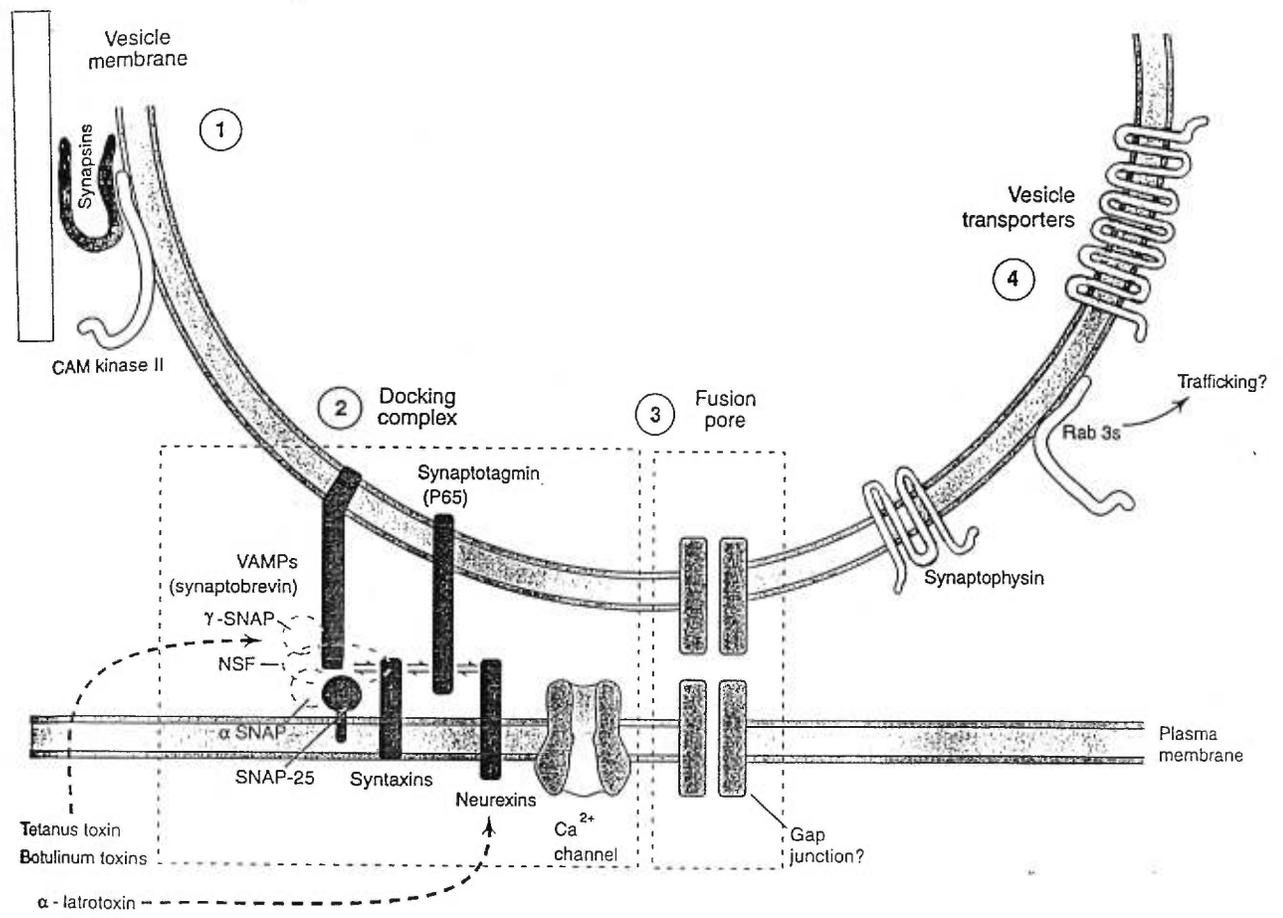
Photomicrographie d'une synapse axo-dendritique.

La composante présynaptique est la terminaison axonique (At) tandis que la composante postsynaptique est le dendrite (Den); il s'agit d'une synapse de type axo-dendritique. Les vésicules synaptiques (petits cercles vides) sont regroupées à proximité des densités synaptiques (→) délimitant les zones actives. On peut remarquer la très grande quantité de mitochondries (grosses masses circulaires très denses). Le petit triangle vide représente une jonction d'adhérence nommée *punctum adhaerens*. (tiré et modifié de Peters et al., 1976)



### Figure 3

Schéma des principales protéines présynaptiques impliquées lors de l'exocytose. Les chiffres de 1 à 4 représentent respectivement les principales protéines présynaptiques impliquées lors des 4 étapes amenant à l'exocytose du neurotransmetteur. 1) Association des vésicules synaptiques au cytosquelette. 2) Arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique. 3) Établissement d'un pore de fusion pour permettre la libération du neurotransmetteur. 4) Transport des vésicules. (tiré et modifié de Kandel et al., 1995)

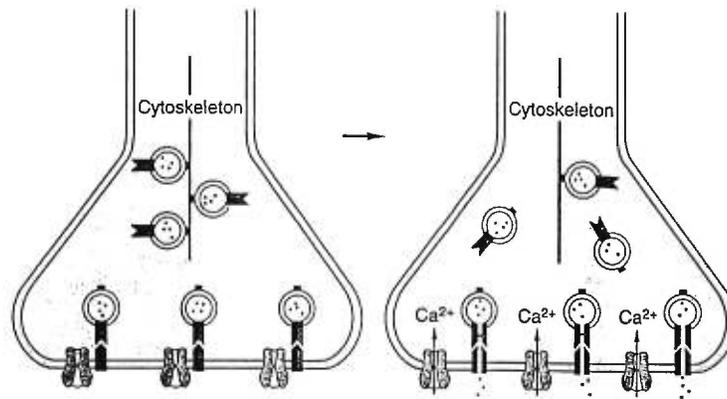


#### Figure 4

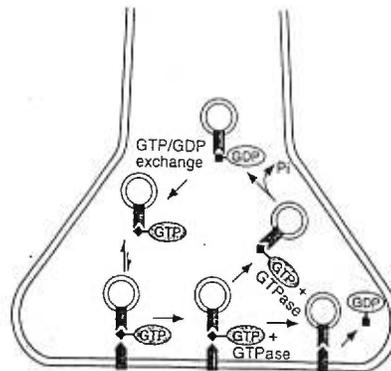
Schémas du (A) rôle du calcium et des synapsines lors de la dissociation des vésicules synaptiques du cytosquelette et (B) du rôle des protéines Rab lors de l'arrimage de ces dernières

A) Suite à une entrée de calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ) dans la terminaison synaptique on assiste à une dissociation des vésicules synaptiques qui étaient associées au cytosquelette par l'intermédiaire des synapsines (■). B) L'activation d'une GTPase à proximité de la membrane présynaptique entraîne la déphosphorylation du GTP en GDP, et par le fait même sa dissociation des Rab, elles forment alors un complexe de "préfusion" avec la membrane présynaptique. (tiré et modifié de Jessel et Kandel, 1993)

(A) rôle du calcium et des synapsines



(B) rôle des protéines Rab



## Figure 5

### Schéma du complexe SNARE.

Le complexe SNARE est impliqué lors de l'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique. Il est composé de protéines vésiculaires, cytoplasmiques et membranaires. (tiré de Kandel et al., 1995)

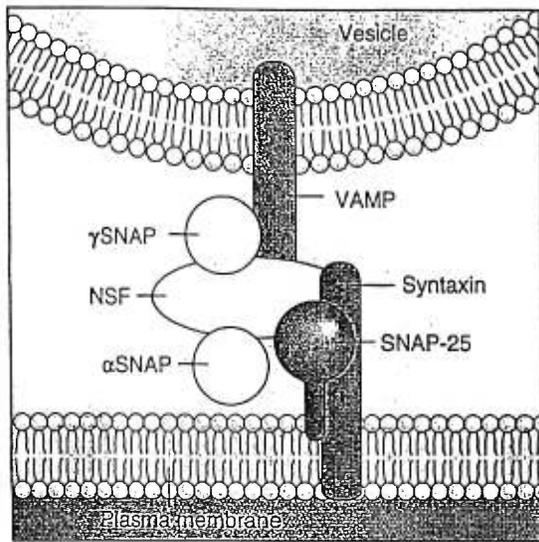


Figure 6

Photographie d'un cône de croissance.

Cône de croissance d'un neurone isolé d'*Aplysia californica*. On remarque les nombreux filipodes et lamellipodes qui l'entourent.(barre de mesure = 5  $\mu\text{m}$ ) (tiré de Forscher et Smith, 1988)

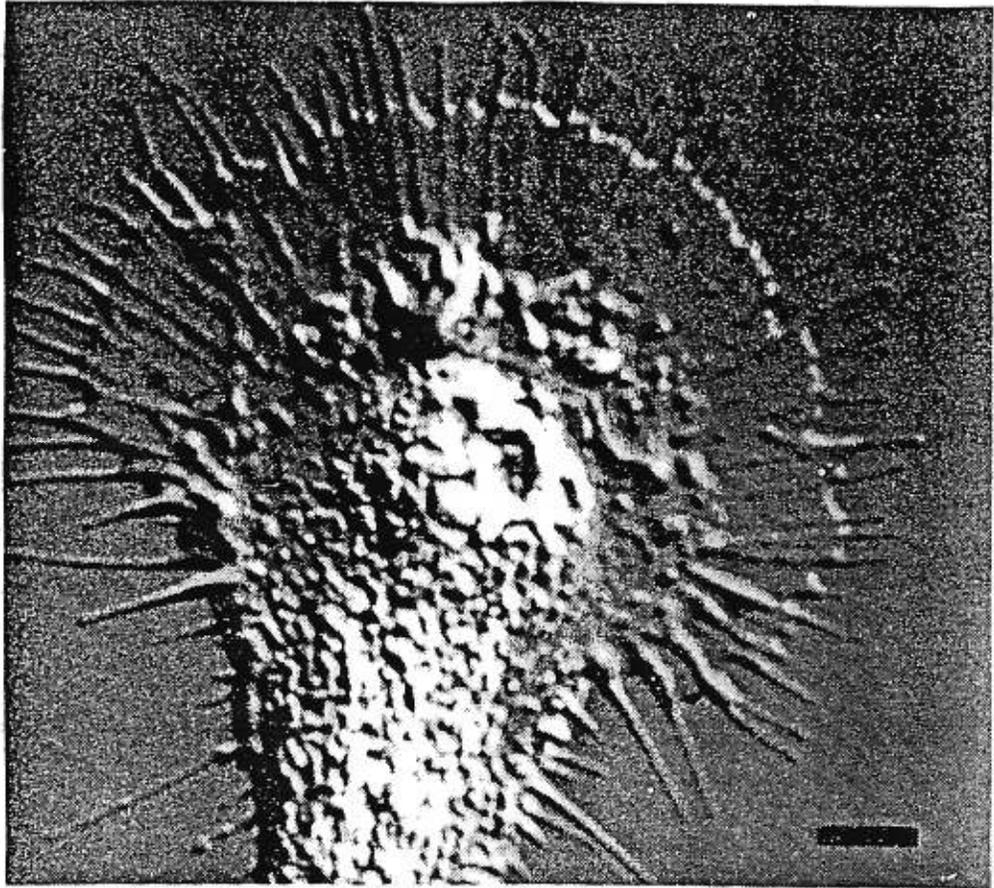


Tableau 1

Nombre d'opossums *Monodelphis domestica* utilisés en immunohistochimie pour les trois marqueurs synaptiques et pour la microscopie électronique simple.

(S: synapto, P: jour postnatal.)

Age (jour postnatal)	S-physine	S-tagmine-I	SNAP-25	microscopie électronique
P1	8	5	4	2
P3	3	3	3	2
P5	3	3	5	2
P7	3	3	3	0
P10	5	3	4	1
P15	4	3	3	1
P18	3	3	3	1
P25	0	0	0	1
P21	3	3	3	0
P28	3	3	3	0
P35	3	3	4	0
P42	3	3	3	0
P49	3	2	3	0
P64	3	2	3	0
Adulte	4	3	4	0

## Tableau 2

Différences et similitudes entre la synaptophysine, la synaptotagmine-I et la SNAP-25 dans les renflements BR et LS de la moelle épinière chez *Monodelphis domestica*.

(BR: renflement brachial, LS: renflement lombosacré, P: jour postnatal).

	SYNAPTOPHYSINE		SYNAPTOTAGMINE-I		SNAP-25	
	BR	LS	BR	LS	BR	LS
Marquage dans tous les régions de la matière blanche	<P1 DORSAL	P3 ventral	<P1 dorsal	<P1 VENTRAL	<P1 dorsal	P3 VENTRAL
Marquage dans la région ventro-latérale de la matière grise	<P1	<P1	<P1	<P1	<P1	<P1
Marquage dans le gris intermédiaire de la matière grise	P3	P5	P3	P5	P3	P5
Marquage dans la corne dorsale de la matière grise	P5	P10	P7	P10	P7	P10
Varicosités sur les motoneurones (présomés) de la matière grise	P15	P18	P15	P18	P15	P18
Marquage dans toutes les régions de la matière grise	P18	P20	P15	P18	P15	P18
Réduction du marquage dans la matière blanche	P15	P20	P20	P28	P28	P35
Disparition du marquage dans la matière blanche (patron adulte)	P28	P35	P28	P35	P35	P42

## 2. ARTICLES SCIENTIFIQUES PRODUITS LORS DE CE TRAVAIL

- 2.1 Article 1: Gingras, J., Cabana, T. (1998) The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 106: 211-216.

The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement  
of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*

by

Jacinthe Gingras and Thérèse Cabana

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

11 typed pages; 2 figures

Corresponding author:

Thérèse Cabana

Département de sciences biologiques

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-ville

Montréal, QC, Canada H3C 3J7

Tel: (514) 343-7564

Fax: (514) 343-2293

Internet: [cabanat@ere.umontreal.ca](mailto:cabanat@ere.umontreal.ca)

## ABSTRACT

The presence of synaptophysin in the lumbosacral enlargement of developing opossums, *Monodelphis domestica*, was studied immunohistochemically at the light microscopic level. In newborn, synaptophysin-labeling was observed in the presumptive white matter, presumably in growing axons, and was scant in the ventrolateral gray matter. Over the next three weeks the labeling filled the gray matter following a general ventrodorsal gradient. Labeling was found in the white matter until the fifth week. Synaptogenesis in the lumbosacral enlargement of the opossum thus occurs mostly postnatally, when many descending axons have already reached that level. It is particularly intense in the ventral horn when the hindlimbs begin to move, and in the dorsal horn when sensorimotor reflexes can be elicited.

Theme A: Development and regeneration

Topic: Motor systems

Key words: Synaptogenesis; Motor systems; Ontogenesis

The opossum *Monodelphis domestica*, a marsupial species, is born very immature compared to placental mammals. The hindlimbs of the newborn are little more differentiated than embryonic buds (Fig. 1, arrow); the articulations of the hip, the knee, the ankle and the foot are not visible or flexible. At birth, the opossum crawls on the belly of the mother with its forelimbs and finds a nipple where it attaches for several weeks. The hindlimbs start moving at about one week, and simple sensorimotor reflexes can first be elicited in the following one to two weeks (Cassidy et al., 1994). If detached from the mother during the first week and a half, the animal is unable to support its weight and falls on its side; if detached during the following week and a half, the forelimbs, but not the hindlimbs, can support weight and the animal turns around itself with the hindquarter serving as a pivot (Pflieger et al. 1996). When it naturally begins to detach from the nipple at around three weeks, its hindlimbs are able to support weight and the animal begins to locomote on all four limbs.

The great immaturity of the hindlimbs at birth and the fact that they only begin to move about one week later and are not coordinated with the forelimbs until another three to four weeks suggest that the lumbosacral enlargement (LS) of the spinal cord of the newborn may be little, if at all, connected with higher levels of the neuraxis. Axonal tracing experiments have shown that axons from the LS only reach the brain postnatally (Desrosiers, 1994; Desrosiers et al., 1993; Qin et al., 1993), and that axons which originate within the cervical cord (Cassidy and Cabana, 1993) and brainstem (Pflieger and Cabana, 1996; Wang et al. 1992) grow into the LS mostly postnatally. Furthermore, myelinogenesis of the ventral and dorsal roots at LS levels is entirely postnatal (Leblond and Cabana, 1997). We are thus taking advantage of these observations on the LS of the developing opossum to investigate synaptogenesis therein by looking at the expression of synaptophysin, a 38 kDa integral membrane protein of synaptic vesicles (Jahn et al., 1985; Südhof and Jahn, 1991; Voigt et al., 1993). Part of this work has been presented in abstract form (Gingras and Cabana, 1997).

Synaptophysin was localized on sections of the LS at the light microscopic level by using immunohistochemistry. Opossums at postnatal day (P) 1, P3, P5, P7, P10, P15, P18, P21, P25, P28, P35, P42, P49 and P64, as well as adults, were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital and were perfused intracardially with phosphate buffered saline followed by Zamboni's fixative (2% paraformaldehyde/12% picric acid/0.1M Sorensen buffer, pH 7.3) at room temperature, except for the youngest animals which were euthanized by Metofane inhalation and whose LS was dissected out and fixed by immersion. A minimum of three animals from three different litters were used at each age, except for P25 where only two specimens (from different litters) were available. The blocks of tissue containing the LS were bathed overnight in 30% sucrose/Sorensen buffer at 4° C, frozen in 2-methyl-butane cooled with dry ice and ethanol, and stored at -80° C until sectioning at 30  $\mu$ m on a cryostat. The sections were mounted onto poly-L-lysine coated slides and dried at 4° C until processing (Swanson et al., 1996). They were rinsed in PBS, incubated in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol/PBS to eliminate endogenous peroxidase activity, and exposed to a 2% normal horse serum/PBS blocking agent, these two steps for 30 min each and at room temperature. The following steps were then conducted in the dark. The sections were incubated with the anti-synaptophysin monoclonal antibody (1:500; Boehringer-Mannheim) for 20 h, rinsed in PBS and incubated with the biotinylated horse anti-mouse IgG secondary antibody (Vector; 1:600) for 2 h. They were rinsed, reacted with the avidin-biotin complex (Vector Elite Kit; 1:200) for 1 h, rinsed and stained with 2.5% nickel sulfate/0.04% DAB (3,3'-diamino benidine tetrahydrochloride)/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1M sodium acetate for 4-8 min, depending on the age of the animal. The slides were rinsed with saline, dried overnight, rinsed in water to remove the salt, dehydrated in graded ethanol, cleared in toluene and coverslipped with Micro Kit. They were observed with a Leitz Diaplan microscope to detect the presence of the brownish reaction product, and selected sections were photographed with a Wild Leitz Photoautomat. To serve as control, one out of four sections was treated as described

except that either the primary or the secondary antibody was omitted. No absorption controls were carried out because purified synaptophysin is not available commercially.

In the LS of newborn (P1) opossums immunoreactivity for synaptophysin was observed almost exclusively in ventral and lateral parts of the marginal zone (Fig. 2A). The dorsal part of the cord is poorly differentiated at that age as evidenced by a thin roof plate (Fig. 2E). The LS of the P1 opossum is very immature: the ventricular zone is thick, the intermediate zone contains small and undifferentiated cells and the marginal zone is very thin (Fig. 2E). Note that the central canal has collapsed in the section shown in Fig. 2A. At P1 the presumptive gray matter was virtually devoid of immunostaining, except for the ventrolateralmost part of the ventral horn where it was very faint (arrowheads in Fig. 2A).

By P3 faint immunostaining was also found in the dorsal marginal zone which has begun to differentiate (empty arrow in Fig. 2B for a P7 animal). Thus, by P3 immunostaining is present in all regions of the presumptive white matter as well as in the ventral part of the ventral horn. There was no difference in the pattern of immunostaining in P5 or P7 animals, except for its greater intensity and somewhat wider extent in the ventral horn and, definitely by P7, in the intermediate gray (arrowheads in Fig. 2B). Both the presumptive gray matter and white matter were better differentiated at P7 (Fig. 2F). By P10 immunostaining was found almost throughout the gray matter, except for the superficial dorsal horn and the area surrounding the central canal which were still devoid of immunostaining.

At about P15 a decrease in the intensity of immunostaining was observed within the white matter (Fig. 2C for a P18 specimen). From then on, immunostaining gradually decreased in the white matter to totally disappear therein by P35 (Fig. 2D), except for that obviously apposed to dendrites of neurons extending in the white matter (Fig. 2C, G). At P18 distinct spherical varicosities were detected apposed to cell bodies and proximal dendrites of presumed motoneurons in lamina IX. At that age, the LS has a more mature

appearance and immunostaining occurred in the entire gray matter, although it was still light around the central canal (Fig. 2C). Immunostaining throughout the gray matter increased in density and intensity until about P35 (Fig. 2D), after which it gradually decreased to the adult level (not shown) in accordance with the growth of the tissue, notably the neuropil.

Immunostaining was not seen in any of the sections processed without either the primary or the secondary antibody. Such a control case is shown in Fig. 2H for a P35 opossum, the age when the labeling is restricted to the gray matter as in the adult.

Already in the P1 opossum, synaptophysin-like immunolabeling is present in the LS, where it occurs mainly in the ventral and lateral marginal zone. The presence of immunostaining in the presumptive white matter and its quasi-absence within the presumptive gray matter at P1 suggest that synaptophysin is present in growing axons before they make synaptic contacts with their targets. The demonstration of synaptophysin in growing axons has been made in the spinal cord (Bergmann et al., 1991) and cerebellum (Leclerc et al., 1989) of the rat. Since the majority of the long descending pathways (originating from the cervical cord and brain) grow largely postnatally in the LS (see above), it is likely that most of the immunostained axons in the LS marginal zone at P1 are either short propriospinal axons or axons of LS (and caudal) neurons which project rostrally. Even though the ascending axons from the LS do not reach the rostral cord until after birth in the opossum, a majority of them have nonetheless started their growth prenatally and are thus present in the LS lateral funiculi in the newborn (Desrosiers, 1994; Desrosiers et al., 1993). Some of the immunostained axons in the marginal zone could also originate from the rostral cord, the medullary reticular formation or the lateral vestibular nucleus, since at least some axons from these areas are present in the LS at birth in the opossum (Cassidy and Cabana, 1993; Desrosiers, 1994; Pflieger and Cabana, 1996). Immunostaining in the white matter becomes particularly intense in the second week, when the major descending systems project massively to the LS (Cassidy and

Cabana, 1993; Desrosiers, 1994; Pflieger and Cabana, 1996; Wang et al., 1992). The fact that immunostaining is observed later in the presumptive dorsal funiculi than in the presumptive ventral or lateral funiculi indicates that axons of lumbosacral (and caudal) dorsal root ganglia and of dorsal horn neurons grow rostrally later than axons which originate within the gray matter at the same levels and which ascend the other funiculi. The gradual disappearance of immunostaining in the white matter between P15 and P35 would suggest that axons of major projection systems have completed growth and synaptogenesis.

From what can be judged with the technique used here, immunostaining for synaptophysin is scant in the presumptive gray matter of the P1 opossum. Its gradual increase in the gray matter during the following weeks, its parallel disappearance from the white matter and the total absence of immunostaining in control material all support the conclusion that our results are not due to technical artifact. It would appear, therefore, that synaptic contacts are scant in the LS of the P1 opossum. These synapses are probably very immature and in the process of formation. This remains to be confirmed with electron microscopy. The first labeling in the presumptive gray matter is found in the ventrolateralmost part of the ventral horn, presumably in the area of motoneurons innervating the distal musculature of the hindlimbs. These synapses could be those made by long propriospinal or supraspinal axons on LS neurons, or those of intrasegmental and short propriospinal axons. The first immunostaining found in the intermediate gray (P7) is probably associated with intrasegmental axons, since it appears like an island without obvious continuity with the labeled fibers of the presumptive white matter. Regardless of the origin of the contacts, the pattern of labeling observed in the LS gray matter in opossums of increasing ages indicates that synaptogenesis occurs according to a general ventrodorsal gradient.

The hindlimbs of the opossum are not motile during the first postnatal week which, based on our evidence, corresponds to a period when only few synapses are

present in the gray matter. Synaptogenesis is particularly evident in the ventral horn when the hindlimbs begin to move autonomously during the second week, and in the dorsal horn when simple sensorimotor reflexes can be elicited in the following weeks (Cassidy et al., 1994). However, the adult pattern of synaptophysin distribution in the LS is obtained (P35) before most reflexes are mature (Cassidy et al., 1994) and before the hindlimbs are coordinated with the forelimbs in quadrupedal locomotion (Pflieger et al., 1996). The maturation of these behaviors is more correlated with myelinogenesis (Leblond and Cabana, 1997) and maturation of the skeletomuscular system (Pflieger et al., 1996).

In conclusion, our results suggest that synaptogenesis in the LS takes place mainly after birth in the opossum *Monodelphis domestica*, that it occurs according to a general ventrodorsal gradient, and that the development of synaptophysin-like immunoreactivity corresponds well with the growth of the major descending pathways into the LS and the expression of simple sensorimotor behaviors. Results from preliminary experiments using antibodies against two other synaptic proteins, SNAP-25 and synaptotagmin-I, confirm the present findings.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This project was performed by J.G. in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree and was supported by grant OGP0003595 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to T.C. We thank G. Cassidy, L. Pelletier, A. Trieu, J.L. Verville and I. Virard for technical and photographic assistance.

## REFERENCES

1. M. Bergmann, G. Lahr, A. Mayerhofer, M. Gratzl, Expression of synaptophysin during the prenatal development of the rat spinal cord: correlation with basic differentiation processes of neurons, *Neuroscience*, 42 (1991) 569-582.
2. G. Cassidy, D. Boudrias, J.F. Pflieger, T. Cabana, The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*, *Brain, Behav. Evol.*, 43 (1994) 244-253.
3. G. Cassidy, T. Cabana, The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*, *Devel. Brain Res.*, 72 (1993) 291-299.
4. C. Desrosiers, Ontogenèse des projections spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum *Monodelphis domestica*, Master's thesis, Université de Montréal, 1994.
5. C. Desrosiers, G. Cassidy, T. Cabana, Ontogenesis of the ascending spinal pathways from the lumbosacral enlargement in the opossum, *Monodelphis domestica*, *Soc. Neurosci. Abst.*, 225.20, 19 (1993) 542.
6. J. Gingras, T. Cabana, Synaptogenesis in the spinal cord enlargements of the opossum, *Monodelphis domestica*, *Soc. Neurosci. Abst.*, 254.5 23 (1997) 634.
7. R. Jahn, W. Schielbler, C. Ouimet, P. Greengard, A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 4137-4141.
8. H. Leblond, T. Cabana, Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of development in the gray opossum, *Monodelphis domestica*, *J. Comp. Neurol.*, 386 (1997) 203-216.
9. N. Leclerc, P.W. Beesley, I. Brown, M. Colonnier, J.W. Gurd, T. Paladino, R. Hawkes, Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex, *J. Comp. Neurol.* 280 (1989) 197-212.

10. J.F. Pflieger, T. Cabana, The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*, *Anat. Embryol.*, 194 (1996) 75-88.
11. J.F. Pflieger, G. Cassidy, T. Cabana, Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*, *Behav. Brain Res.*, 80 (1996) 137-143.
12. Y.Q. Qin, X.M. Wang, G.F. Martin, The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*, *Devel. Brain Res.*, 75 (1993) 75-90.
13. T.C. Südhof, R. Jahn, Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling (review), *Neuron*, 6 (1991) 665-677.
14. J.J. Swanson, M.C. Kuehl-Kovarik, M.C. Wilson, J.K. Elmquist, C.D. Jacobson, Characterization and ontogeny of synapse-associated proteins in the developing facial and hypoglossal motor nuclei of the Brazilian opossum, *J. Comp. Neurol.*, 368 (1996) 270-284.
15. T. Voigt, D.D. Lima, M. Beckmann, Synaptophysin immunoreactivity reveals inside-out pattern of early synaptogenesis in ferret cerebral cortex, *J. Comp. Neurol.*, 330 (1993) 48-64.
16. X.M. Wang, X.M. Xu, Y.Q. Qin, G.F. Martin, The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*, *Devel. Brain Res.*, 68 (1992) 203-216.

Figure 1:

Photograph of an opossum, *Monodelphis domestica*, on the day of birth.

The arrow points to the hindlimb. The scale bar equals 1 mm.

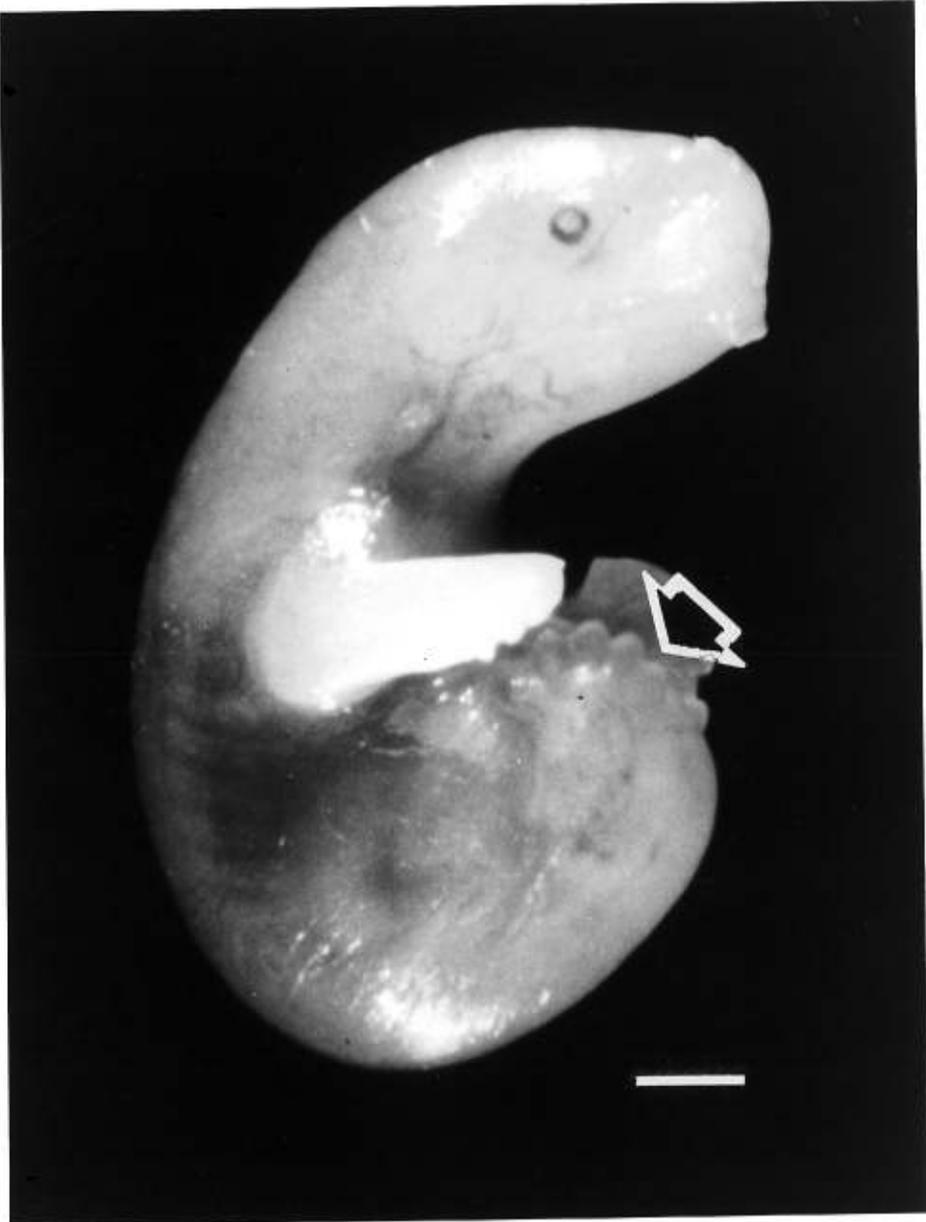
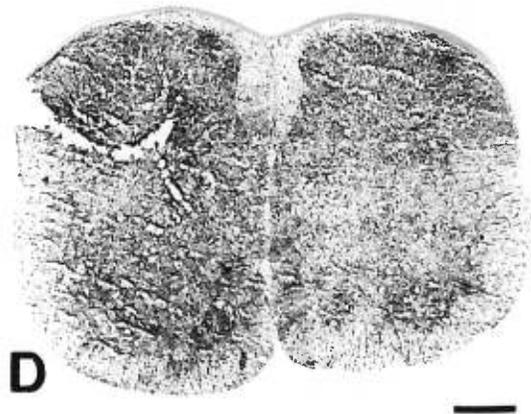
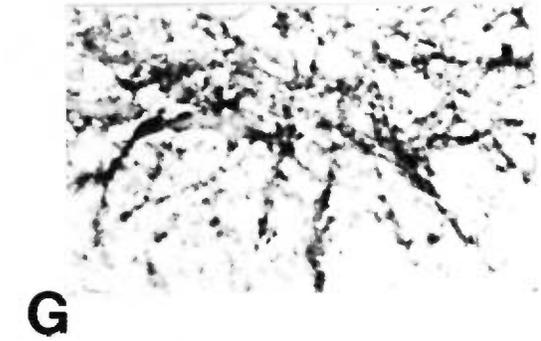
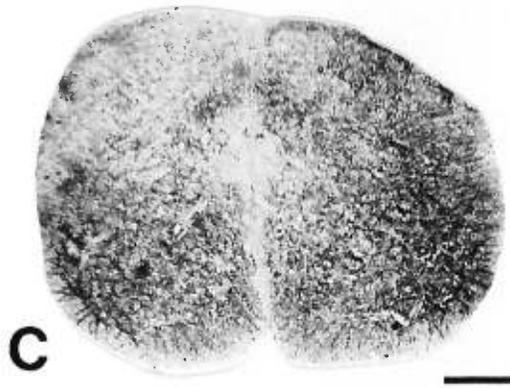
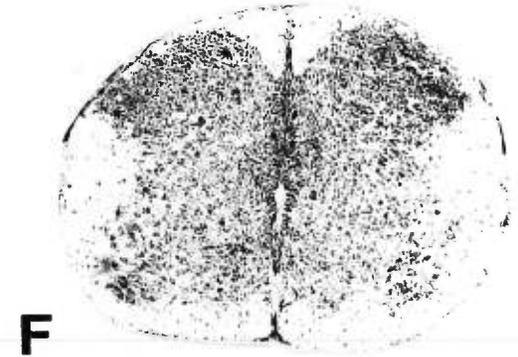
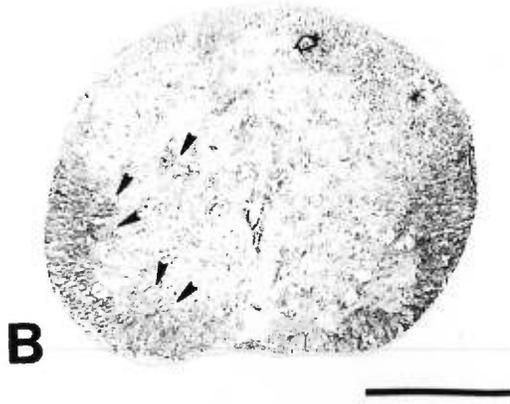
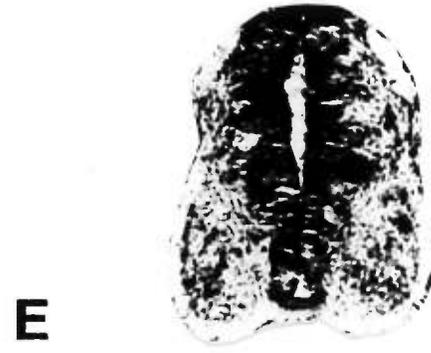
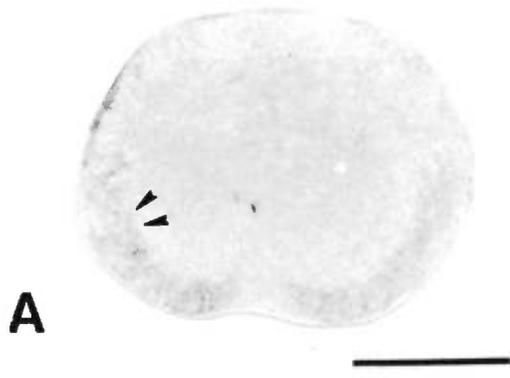


Figure 2:

**A-D**: Photomicrographs of transverse sections through the lumbosacral enlargement showing the synaptophysin-like immunolabeling in P1, P7, P18 and P35 opossums, respectively. The arrowheads in **A** indicate the faint labeling in the ventrolateral part of the ventral horn. The empty arrow in **B** points to labeling in the right dorsal funiculus, and the arrowheads to labeling in the ventral and ventrolateral regions of the ventral horn as well as in the intermediate gray. **E-F**: Nissl-stained sections from P1 and P7 opossums, respectively; **E** is from a littermate of the specimen shown in **A** cut at a slightly different angle, and **F** is from a section adjacent to **B**. **G**: Higher magnification (X10) of the framed portion of the left ventrolateral horn and white matter of the section shown in **C** showing immunostaining along dendrites of presumed motoneurons. **H**: Section adjacent to **D** showing a control in which the primary antibody (anti-synaptophysin) was omitted. Scale bars equal 200  $\mu$ m.



2.2 Article 2: Gingras, J., Cabana, T. (199X) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*.

En préparation, à soumettre à Journal of Neuroscience

Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the  
postnatal opossum, *Monodelphis domestica*.

by

Jacinthe Gingras and Thérèse Cabana\*

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

running title: Opossum's spinal enlargements synaptogenesis

29 pages, 4 figures

\*to whom correspondence should be addressed:

Département de sciences biologiques  
Université de Montréal,  
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,  
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7  
Tel: (514) 343-6878  
Fax: (514) 343-2293  
e-mail: cabanat@ere.umontreal.ca

## **Abstract**

Synaptic proteins indicative of the presence of synapses were localized in light microscopy on sections of the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*, to determine if their expression parallels the development of major motor pathways and simple motor behaviors. The tissues were fixed, cryoprotected, frozen and cut in 30  $\mu\text{m}$  transverse sections, which were processed immunohistochemically using antibodies directed against synaptophysin, synaptotagmin-I or SNAP-25. Immunolabeling was observed in the presumptive white matter before the presumptive gray matter, suggesting that the proteins are detected in growing axons before the onset of synaptogenesis, and in presumed propriospinal axons before those of the presumed descending pathways of supraspinal origin. In the newborn opossum, the immunolabeling was very scant in the gray matter, an observation confirmed in electron microscopy, being limited to the periphery of the ventral horn, but it gradually increased in intensity and spread throughout the gray matter over the next five to seven weeks, when it was no longer found in the white matter and resembled the adult pattern of labeling. Considering the location and relative intensity of the immunolabeling for the three proteins over time in the two enlargements, synaptogenesis occurs according to three main gradients: rostrocaudal, ventrodorsal and lateromedial. These gradients match those of spinal cord and limb development, and of the growth of descending axons into the cord. Synaptogenesis is most intense when the simple and complex spinal reflexes are expressed.

**Key words:** Synaptogenesis, Synaptophysin, Synaptotagmin-I, SNAP-25, Motor systems, *Monodelphis domestica*.

Mammalian motor system development has mostly been studied using placentals. However, even in nonprecocial placentals like carnivores or rodents (Fox, 1964), the nerve centers that control motricity are relatively well developed at birth. The considerable immaturity of the newborn Brazilian opossum *Monodelphis domestica*, a marsupial, having a 14 - 15 day gestation (Fadem et al., 1982; Harder et al., 1993), allows access postnatally to early stages of neural development. The newborn opossum (Fig. 1) measures about 10 mm snout-rump and weighs approximately 100 mg. Its forelimbs are sufficiently developed to crawl by rhythmic, alternate movements from the mother's vagina to a nipple where it attaches, but its hindlimbs are little more than immobile buds. Track-tracing studies have shown that pathways involved in motor control develop largely postnatally in *M. domestica*: the long propriospinal projections coordinating the neck, forelimbs and hindlimbs (Cassidy and Cabana 1993), the spino-encephalic (ascending) projections (Desrosiers et al., 1993; Qin et al., 1993), the brainstem-spinal (descending) projections (Pflieger and Cabana, 1996; Wang et al., 1992), and the primary vestibular afferents (Pflieger and Cabana, 1996). Furthermore, sensorimotor reflexes (Cassidy et al., 1994) and spontaneous locomotion (Pflieger et al., 1996) appear and mature postnatally, and later than the above nerve pathways. This delay of behavioral development over neural development may be explained by the fact that motor behavior expression does not depend solely on the formation of nerve pathways, but on the establishment of functional connections between motor centers and the myelination of the nerve fibers. However, Leblond and Cabana (1997) have shown that only a small proportion of dorsal and ventral root fibers innervating the limbs are myelinated when the simple or complex spinal reflexes are expressed in *M. domestica*. Moreover, myelination within the spinal cord occurs relatively late postnatally (preliminary observations). These findings suggest that the expression of motor behaviors may be better correlated to synaptogenesis than myelinogenesis.

We report herein on the first of these developmental events, synaptogenesis, the step when axonal growth cones transform into nerve terminals upon reaching their targets and the pre- and postsynaptic specializations differentiate. In the terminal, neurotransmitters are stored in synaptic vesicles and released by a calcium-dependent exocytotic mechanism (Katz, 1966) involving specific proteins. Synaptophysin is the most abundant integral membrane protein of synaptic vesicles (Jahn et al., 1985; Voigt et al., 1993); it contains four transmembrane regions, a cytoplasmic carboxyl terminus and is a candidate for the exocytotic pore complex (Südhof and Jahn, 1991). Its expression during mouse brain development is correlated with synaptogenesis (Devoto and Barnstable, 1989; Knaus et al., 1986). Another abundant integral membrane protein of synaptic vesicles (Perin et al., 1991; Südhof and Jahn, 1991), synaptotagmin-I contains a small amino-terminal glycosylated intravesicular domain, a single transmembrane region, and a large carboxy-terminal cytoplasmic sequence composed of two copies of a calcium regulatory domain: the C2-domains (Südhof and Rizo, 1996). The latter mediate  $Ca^{2+}$ -dependent and -independent interactions with target molecules that may regulate membrane fusion and budding reactions resulting in neurotransmitter release (Brose et al., 1992; Damer and Creutz, 1996). Synaptotagmin-I may function as well during vesicle endocytosis (Zhang et al., 1994). SNAP-25 is a SNAP (synaptosomal-associated protein) receptor protein of the presynaptic plasma membrane (Bark and Wilson, 1994) required at some stages of vesicle docking and fusion (Banerjee et al., 1996, West Greenlee et al., 1996). Its expression increases during synaptogenesis (Osen-Sand et al., 1993; Oyler et al., 1991).

Using immunohistochemistry in light microscopy, we have looked for the presence of these three synaptic markers in the spinal cord enlargements, innervating the limbs, in age-graded opossums. Tissue not processed for immunohistochemistry was observed in

transmission electron microscopy. Preliminary reports have been presented (Gingras and Cabana, 1997, 1998a, b).

## **Materials and Methods**

*Animals.* Opossums, *Monodelphis domestica*, were obtained from a colony kept in the vivarium of the Université de Montréal and maintained according to Fadem et al. (1982) and Kraus and Fadem (1987). For further details see Cassidy et al. (1994). A total of 76 animals of both sexes ranging from postnatal day (P) 1 to P64 (P1: n=12, P3: n=6, P5: n=7, P7: n=5, P10: n=6, P15: n=6, P18: n=3, P21: n=8, P28: n=3, P35: n=5, P42: n=5, P49: n=5, P64: n=5) as well as 4 adults were used for immunohistochemistry. For each of the three synaptic proteins at each of the ages studied, animals were obtained from at least three different litters. A total of 10 opossums were used for electron microscopy (P1: n=2; P3: n=2; P5: n=2; P10: n=1; P15: n=1; P18: n=1 et P25: n=1). The research reported herein was performed under the guidelines of the *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH Publication No. 85-23, revised 1985) and the Canadian Council on Animal Care (1994).

*Immunohistochemistry.* Opossums ranging from P1 to P18 were anaesthetized by Metofane inhalation, the dorsum of the vertebrae was removed under the surgical microscope and their whole body was fixed by immersion in Zamboni fixative (2% paraformaldehyde and 12% picric acid in 0.1 M Sorensen buffer at pH 7.3) for 48 h at room temperature. P21 to P64 opossums were also anaesthetized with Metofane, and the adults by an overdose of sodium pentobarbital injected intraperitoneally, and these animals were perfused intracardially through the left ventricle with phosphate buffered saline followed by the same fixative for 15 to 30 min according to their age. Their entire spinal cord was removed from the vertebral column and post-fixed in Zamboni fixative for 48 h at room temperature. All specimens were cryoprotected in a 30% sucrose solution in

Sorensen buffer (pH 7.3) at 4 C for 24 h. Blocks of spinal cord comprising the brachial or lumbosacral enlargements, either kept in the vertebral column (P1 to P18) or dissected out (other ages), were frozen using 2-methyl-butane cooled with dry ice and ethanol, and stored at -80 C. The enlargements were cut into 30  $\mu$ m transverse sections on a cryostat, mounted onto poly-L-lysine coated slides and stored at 4 C if processed within four days or at -20 C if processed later. Three additional P1 opossums were sacrificed as above, but their body devoid of the skin and major viscera was cut sagittally. The slides were rinsed in PBS, incubated for 30 min at room temperature in a solution of 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol/PBS to eliminate endogenous peroxidase activity and exposed for 30 min at room temperature to a 2% normal horse serum/PBS blocking agent. They were then incubated with one of the three primary monoclonal antibodies, either anti-synaptophysin (1:500; Boehringer-Mannheim), anti-synaptotagmin-I (1:1000; Synaptic Systems GmbH) or anti-SNAP-25 (1:1000; Transduction Laboratories), for 20 h in the dark, at room temperature for the anti-synaptophysin and at 4 C for the other two. For most of the ages studied, the three primary antibodies were applied on adjacent sections for a given animal. The sections were then rinsed in PBS and incubated in biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector; 1:600) as a secondary antibody at room temperature for 2 h in the dark, after which they were rinsed again and reacted in the dark with the avidin-biotin complex (Vector Elite Kit; 1:200) at room temperature for an additional 1 h. The sections were rinsed in PBS, stained with 2.5% nickel sulfate/0.04% 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB)/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M sodium acetate for 4-8 min, depending on the age of the specimen, rinsed with saline and dried overnight. The sections were finally rinsed with water to remove the salt, dehydrated in graded ethanol, cleared in toluene and coverslipped with Micro Kit. For each animal, as a control, one out of every four sections was processed as above, except that either the primary (anti-synaptophysin, anti-synaptotagmin-I, anti-SNAP-25) or the secondary (horse anti-mouse IgG) antibody was omitted. These procedures were based on the protocols of Swanson et al. (1996) for

the same species. The sections were observed with a Leitz Diaplan microscope to detect the location and density of the brownish, punctate reaction product. Black and white microphotographs of selected sections were taken with a Wild Leitz Photoautomat or a Wild M-400 Photomicroscope.

*Electron microscopy.* The opossums were anaesthetized by Metofane inhalation and the dorsum of the vertebrae was removed under the surgical microscope. They were fixed as above, according to their age, but using 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4 at 4 C as a fixative. The spinal cord was then removed from the vertebral column, rinsed overnight in 0.1M cacodylate buffer at pH 7.4, and postfixed in 2% OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer 0.1M pH 7.4 at 4 C. The brachial and lumbosacral enlargements were then removed from the vertebral column, rinsed in distilled water for 45 min, immersed in a solution of 1% uranyl acetate for 1 h, dehydrated in graded ethanols, bathed in a mixture of ethanol - Epon, then Epon alone, 30 min each bath, and they were finally embedded in pure Epon. Sections of approximately 100 to 120nm were cut on an ultramicrotome, mounted on copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. These procedures were based on the protocols of Balslev et al. (1992) for the same species. The sections were observed and photographed on a JEOL JEM 100S transmission electron microscope.

## **Results**

The spinal cord of the newborn opossum (P1) *Monodelphis domestica* dissected from the vertebral column and stretched out on a ruler is 0.85 cm long (9 cm in average in the adult male) and has a diameter of about 0.65 mm at the brachial enlargement (3.3 mm in the adult) and of about 0.50 mm at the lumbosacral enlargement (3.2 mm in the adult). In Nissl stained sections it has a very immature appearance, particularly at caudal levels. At both enlargements, the large central canal is elongated dorsoventrally, and the

ventricular zone around it is very thick (Figs. 2; 3) and comprises mitotic figures. The large intermediate zone (the presumptive gray matter) is composed of undifferentiated cells, many of them apparently in the process of migration, and is surrounded by a thin marginal zone (the presumptive white matter) virtually devoid of myelinated fibers (preliminary results from immunohistochemical experiments). In the following weeks, the central canal decreases in size and becomes circular, the ventricular zone becomes thinner, the intermediate zone thickens, presumably by the addition of postmitotic neuroblasts and their differentiation, and the marginal zone also increases (Figs. 2; 3). The development of the lumbosacral enlargement lags by a few days that of the brachial enlargement. It is at around P20 that the ventricular zone in the latter is reduced to a one cell thick ependymal epithelium.

In the newborn opossum, immunolabeling for all three proteins was observed in all areas of the presumptive white matter, except the floor plate, at both enlargements, but synaptophysin and SNAP-25 immunoreactivity was not found dorsally at the lumbosacral enlargements (Figs. 2; 3). Immunolabeling was darker around the presumptive gray matter than near the pial surface (Fig. 4A, B). In the brachial enlargement, the immunostaining for SNAP-25 and synaptotagmin-I was darker ventrally than dorsally, but the opposite gradient was observed for synaptophysin-like immunolabeling (Fig. 2), differences not as clear in the lumbosacral enlargement. In the presumptive gray matter, immunostaining was present in the ventrolateral part of the ventral horn (Figs. 2; 3), but it was very faint and difficult to detect. Whether in the white or in the gray matter, the labeling was not as dark and dense at lumbosacral levels than at brachial levels (compare Figs. 2 and 3), which can be better appreciated on a sagittal section of the cord (Fig. 4A). At P3, the immunolabeling for all three proteins had increased in the presumptive white matter, still being more abundant in the brachial than in the lumbosacral enlargement, and synaptophysin as well as SNAP-25 immunolabeling was found dorsally at lumbosacral

level as well. Again, the labeling was darker in the inner white matter than in its periphery. In the presumptive gray matter, the immunostaining for all three proteins was found in the ventral part of the ventral horn in both enlargements, being darker and denser at brachial levels. Labeling was observed in the center of the intermediate gray at P5 in the brachial enlargement and P7 in the lumbosacral enlargement. Starting at around P10, the relative intensity of labeling within the ventral and lateral funiculi of the presumptive white matter changes, particularly that for synaptophysin and synaptotagmin-I, and is darker in the periphery than in the inner white matter. At that age, immunostaining for all three proteins was found throughout the gray matter except in its dorsalmost portion and around the central canal, again being darker and denser at brachial levels, and is darker ventrally than dorsally. At P15, immunoreactivity for all three proteins was found in the areas of the gray matter where it was absent at P10, and was again more abundant at the brachial enlargement than at the lumbosacral enlargement. Punctate varicosities were clearly distinguished abutting cell bodies and proximal dendrites of presumed motoneurons within presumptive lamina IX at P15 in the brachial enlargement (Fig. 4D) and P18 in the lumbosacral enlargement. Starting at P21, immunolabeling for synaptophysin and, to a lesser extent, synaptotagmin-I was reduced in the white matter, especially ventrally and dorsally, and was no longer detected therein at P28 in the brachial enlargement and P35 in the lumbosacral enlargement (Figs. 2; 3). The decrease of labeling for SNAP-25 and its eventual disappearance from the white matter lagged by about one week. From then on, immunostaining for all three proteins was restricted to the gray matter, as in the adult animals. However, in older opossums, dendrites of gray matter neurons extend in the white matter and such dendrites receive labeled terminals; this is the case of the section presented in the figure 4D. At the two developmental ages examined (P49 and P64), it was noticed that the density of labeling in the gray matter had started to decrease presumably due to the differentiation and growth of the tissue, but possibly also to the elimination of synapses during normal development.

Only slight differences in labeling were observed between specimens of a given age, and these differences pertain to the intensity of the labeling for a given protein, but not to its location within the white or the gray matter. Such interindividual variation could be explained by the fact that opossums may not all be at the exact same stage of development at birth (gestation is 14 to 15 days) and that their subsequent growth rate may differ, especially between litters of different sizes. Furthermore, for same-aged specimens which were processed in different batches, slight technical variations such as in the temperature of the different baths may account for minor differences in the labeling.

At all ages and for all three proteins studied, immunostaining was not seen on any of the control sections processed without either the primary or the secondary antibody. An example is illustrated for a cervical section from a P15 opossum in figure 4C.

In electron microscopy, synaptic profiles were not numerous at P1 particularly in the lumbosacral enlargement, and they were located mostly in the ventrolateral region of the presumptive gray matter, where immunolabeling was observed at that age. Synapses were also observed in the intermediate gray in the newborn opossum, where immunolabeling was only detected at P3 in our experimental material. The synapses in the ventrolateral gray matter were found on dendrites of what seemed to be motoneurons, but non-motoneurons (intraspinal or spino-encephalic neurons) cannot be excluded. Most synapses at P1, but even in somewhat older opossums, had a very immature appearance, with few, scattered synaptic vesicles, and little pre- and postsynaptic densities, such a synapse is shown in figure 4E. In older opossums, synapses gradually increased in number and location within the gray matter, the dorsalmost portion of it being the last where they were found, and they gradually acquired a more mature appearance, notably

by the addition of synaptic vesicles and the thickening of the pre- and postsynaptic densities.

## **Discussion**

By using immunohistochemistry in light microscopy to evidence three synaptic proteins, it has been possible to infer the time of onset and the course of synaptogenesis in the spinal cord enlargements of the opossum *Monodelphis domestica*. In both enlargements, immunoreactivity was first observed in the presumptive white matter as early as P1, where it had completely disappeared five to seven weeks later. The presence of immunolabeling in the presumptive white matter and its virtual absence in the presumptive gray matter in the newborn opossum suggests that all three proteins are detected in growing axons before the latter make synaptic contacts with their targets. Bergmann et al. (1991) also reported the presence of synaptophysin in the presumptive white matter before the presumptive gray matter in the thoracic cord of the embryonic rat, and Leclerc et al. (1989) in the cerebellar cortex of the postnatal rat. Osen-Sand et al. (1993) made a similar observation for SNAP-25 in the rat visual cortex. Dai and Peng (1996) identified synaptotagmin in the axonal shaft of growing spinal neurons in culture, and Kraszewski et al. (1995) in cultured hippocampal neurons. The proteins could be labeled as they are transported along growing axons towards their growth cones. Osen-Sand et al. (1993) demonstrated that SNAP-25 also plays a role in the insertion of new membrane along the growing axons by mediating the fusion of vesicles with the plasmalemmal membrane. In electron microscopy no synapses were found in the presumptive white matter of the young postnatal opossum, but only on neurons in the presumptive gray matter, suggesting that the immunolabeling was of proteins within the shafts of growing axons or their growth cones.

In which nerve fibers are the labeled synaptic proteins evidenced during the opossum's development? By comparing the location and relative density of the immunolabeling with what is known of the development of the ascending and descending pathways from axonal tracing experiments in the developing opossum, the following interpretations can be made. The immunolabeling in the inner part of the presumptive white matter is likely that of propriospinal axons, these projections forming mostly during the first two and a half postnatal weeks (Cassidy and Cabana, 1993). The immunolabeling in the ventral area of the presumptive white matter could be that of the vestibular complex, notably the lateral nucleus which is the earliest to project to the cord (Pflieger and Cabana, 1996; Wang et al., 1992). The immunolabeling in the peripheral part of the lateral and ventrolateral white matter is likely that of ascending spinal fibers (spinothalamic, spinothalamic, spinocerebellar), which have at least in part grown to the spinomedullary junction at birth (Desrosiers, 1995; see also Qin et al., 1993), and of the descending axons originating from the medullary reticular formation, which have grown spinally at the early postnatal ages (Pflieger and Cabana, 1996; Wang et al., 1992). Immunolabeling in the dorsal cord is mostly that of the ascending processes of dorsal root ganglia, and also of some ascending spinal axons (Desrosiers, 1995; Qin et al. 1993). The fact that two of the three synaptic proteins are evidenced in the dorsal presumptive white matter of the cervical before the lumbosacral enlargement and that the labeling therein is less intense at lumbosacral levels in the young postnatal opossums indicates that the primary afferents from the rostral dorsal root ganglia are formed earlier than those from the more caudal ones. The growth of the long ascending and descending pathways along the spinal cord progresses over a few weeks, notably by the addition of longer axons (e.g. the descending axons from the pontine and mesencephalic reticular formation, the red nucleus), a period which corresponds to the increase of immunolabeling in the presumptive white matter and the increase in the size of the latter. The fact that labeling was initially darker in the inner than the peripheral portion of the white matter further

supports that propriospinal projections develop before most of the long encephalospinal ones.

Labeling in the gray matter was very scant in the newborn and restricted to its ventrolateral portion. It increased gradually in the ventral, intermediate and dorsal horn to fill entirely the gray matter at around P15 at the brachial and P18 at lumbosacral levels. The immunostaining in the ventrolateral gray of the newborn could be of synapses made by intrasegmental and short propriospinal axons, and possibly by the long propriospinal and supraspinal descending axons mentioned above. The increase of white matter labeling, presumably by the addition of descending fibers, parallels the gradual spread and increase in density of immunolabeling in the gray matter. Within each enlargement, general ventrodorsal and lateromedial gradients in gray matter labeling can be described, gradients which match those of the growth of the major descending systems into the spinal gray. For example, the vestibulospinal axons, presumably among the earliest ones labeled, as explained above, innervate mostly the ventral horn, whereas the territory of innervation of rubrospinal axons, presumably labeled later, is mostly the intermediate and dorsal gray. In the North American opossum *Didelphis virginiana*, anterograde tracing of rubrospinal axons revealed that they penetrate the gray matter lateromedially (Cabana and Martin, 1985). A similar observation was made for the growth of raphe and reticular serotonergic fibers into the cord (Humbertson et al., 1982). The decrease and eventual disappearance of white matter labeling correspond to the time when these projection systems reach their spinal targets, stop their growth and establish synaptic contacts. Kraszewski et al. (1995) have shown in cultured hippocampal neurons of the rat that synaptogenesis sees the immobilization of synaptic vesicles at the contact sites, resulting in less proteins in the axonal shaft, to the point of not being detectable in mature animals.

With immunohistochemistry in light microscopy we cannot be certain of identifying all synapses from their onset, however electron microscopic observations of non-experimental P1 opossums indicate that synapses are not numerous and are apparently, in the process of formation. These findings suggest that synaptogenesis in the spinal cord enlargements of *M. domestica* does not start much earlier than indicated by our experimental material, and would occur mostly postnatally, particularly at lumbosacral levels, and according to the general rostrocaudal, ventrodorsal and lateromedial gradients described.

Although the pattern of immunoreactivity was similar for the three proteins, differences were seen between proteins. A vesicular protein, synaptotagmin-I was the only one detected in the dorsal presumptive white matter of the lumbosacral enlargement in the newborn. It is probably also present earlier than the other two at cervical levels, but this occurs prenatally. Synaptophysin, also a vesicular protein, disappears from the white matter slightly earlier than synaptotagmin-I, and the presynaptic membrane protein SNAP-25 disappears last. This is the same sequence reported by West Greenlee et al. (1996) in the opossum's retina. We do not know what is the significance of this difference in the appearance or disappearance of these proteins.

Can a correlation between these results on synaptogenesis in the spinal cord of the opossum and behavioral development be made? Our results indicate that the earliest synapses are more numerous in the brachial than in the lumbosacral enlargement and are on ventrolateral neurons, related to the distal musculature, and in the intermediate gray, possibly in the region of the central pattern generator (CPG). Pflieger and Cabana (1996) have argued that the first movements of the opossum, the alternate and rhythmic movements of the forelimbs and grasp of the fingers to crawl on the mother's belly, are very likely the expression of the CPG, but their direction is controlled by the vestibular

system. The general lateromedial gradient of immunolabeling of the synaptic proteins would indicate that the different systems mentioned would make synaptic contacts on neurons subserving distal muscles earlier, or at least in greater numbers, than on neurons subserving proximal muscles. Such a distoproximal gradient in limb formation and motility in the postnatal opossum is more evident for the forelimbs than the hindlimbs. The hindlimbs of the opossum are not motile during the first postnatal week, and their motor development (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996) just as their myelination (Leblond and Cabana, 1997) lag those of the forelimbs by about one week. The present study also shows that synaptogenesis in the lumbosacral enlargement lags that in the brachial enlargement by a few days. The gradual disappearance of labeling in the white matter during the fifth to seventh week in parallel with the complete and dense labeling of the gray matter correspond with the maturation of most reflexes (Cassidy et al., 1994) and the expression of more complex motor behaviors such as quadrupedal locomotion (Pflieger et al., 1996), and is correlated with the stop of the growth of the nerve pathways as said above. This period matches the occurrence of myelinogenesis in the spinal enlargements (personal observations). Thus, synaptogenesis would be better correlated with the appearance of motor behaviors and myelinogenesis with their maturation.

### **Acknowledgements**

This work was performed by J.G. in partial fulfillment of the requirement for the M.Sc. degree at the Université de Montréal and was supported by a NSERC grant to T.C. (OGP0003595). The authors wish to thank G. Cassidy, A. Trieu and I. Virard for technical assistance as well as L. Pelletier for help with electron microscopy and J.-L. Verville for help with photography.

## References

- Balslev, Y., Saunders, N.R., and Møllgård, K. (1992) Onset of the neocortical synaptogenesis in *Monodelphis domestica* (South American grey short-tailed opossum). *Synapse*, 10: 267-270.
- Banerjee, A., Kowalchuk, J.A., DasGupta, B.R., and Martins, T.F.J. (1996) SNAP-25 is required for late postdocking step in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 271(34): 20227-20230.
- Bark, C., and Wilson, M.C. (1994) Regulated vesicular fusion in neurons: Snapping together the details. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4621-4624.
- Bergmann, M., Lahr G., Mayerhofer, A., and Gratzl, M. (1991) Expression of synaptophysin during the prenatal development of the rat spinal cord: correlation with basic differentiation processes of neurons. *Neuroscience*, 42: 569-582.
- Brose, N., Petrenko, G.A., Südhof, T.C., and Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 256: 1021-1025.
- Canadian Council on Animal Care (1994) Guide to care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa.
- Cassidy, G., and Cabana, T. (1993) The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain. Res.*, 72: 291-299.

- Cassidy, G., Boudrias, D., Pflieger, J.-F., Cabana T. (1994) The development of sensorimotor reflexes in the brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behav. Evol.*, 43: 244-253.
- Dai, Z., et Peng, B. (1996) Dynamics of synaptic vesicles in cultured spinal cord neurons in relationship to synaptogenesis. *Mol. Cell Neurosci.*, 7: 443-452.
- Damer, C.K., and Creutz, C.E. (1996) Calcium-dependant self-association of synaptotagmin I. *J. Neurochem.*, 67(4): 1661-1668.
- Desrosiers, C. (1995) Ontogénèse des voies spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.
- Desrosiers, C., Cassidy, G., and Cabana, T. (1993) Ontogenesis of the ascending spinal pathways from the lumbosacral enlargement in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 225.20.
- Devoto, S.H., and Barnstable, C.J. (1989) Expression of the growth cone specific epitope CDA1 and the synaptic vesicle protein SVP 38 in the developing mammalian cerebral cortex. *J. Comp. Neuro.*, 290: 154-168.
- Fadem, B.H., Trupin, G.L., Maliniak, E., Vanderberg, J.L., and Hayssen, V. (1982) Care and breeding of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab. Ani. Sci.*, 32: 405-409.

- Fox, M.W. (1964) A phylogenetic analysis of behavioral neuro-ontogeny in precocial and non-precocial mammals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 175: 207-232.
- Gingras, J., and Cabana, T. (1997) Synaptogenesis in the spinal cord enlargements of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 254.5 23, 634.
- Gingras, J., and Cabana, T. (1998a) The postnatal distribution of three synaptic markers in the spinal cord enlargements of the opossum *Monodelphis domestica*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 122.23.
- Gingras, J., and Cabana, T. (1998b) The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain. Res.*, 106: 211-216.
- Harder, J.D., Stonebrook, M.J., and Pondy, J. (1993) Gestation and placentation in two New World opossums: *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *J. Exp. Zool.*, 266: 463-479.
- Jahn, R., Schielbler, W., Ouimet, C., and Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4137-4141.
- Katz, B., (1966) *Nerve, muscle and synapse*. New York; NY: McGraw-Hill.
- Knaus, P., Betz, H., and Rehm, H. (1986) Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J. Neurochem.*, 47: 1302-1304.

- Kraus, D. B., and Fadem, B. H. (1987) Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab. Anim. Sci.*, 37: 478-482.
- Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M., and De Camilli, P. (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.*, 15: 4328-4342.
- Leclerc, N., Beesley, P. W., Brown, I., Colonnier, M., Gurd, J. W., Paladino, T., and Hawkes, R. (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, 280: 197-212.
- Leblond, H., and Cabana, T. (1997) Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of the development in the gray opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Comp. Neurol.* 386: 203-216.
- Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., GrenninglohG., Catsicas, S. (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature*, 364: 445-448.
- Oyler, G.A., Polli, J.W., Wilson, M.C., and Billingsley, M.L. (1991) Developmental expression of the 25-kDA synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5247-5251.
- Perin, M.S., Brose, N., Jahn, R., and Südhof, T.C. (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.*, 266: 623-629.

- Pflieger, J.-F., and Cabana T. (1996) The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat. Emb.*, 194: 75-88.
- Pflieger, J.-F., Cassidy ,G., Cabana, T. (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behav. Brain Res.*, 80: 137-143.
- Qin, Y.Q., Wang, X.M., and Martin, G.F. (1992) The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brain stem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 75: 75-90.
- Südhof, T.C., and Jahn, R. (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling (review). *Neuron*, 6: 665-677.
- Südhof, T.C., and Rizo, J. (1996) Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron*, 17: 379-388.
- Swanson, J.J., Kuehl-Kovarik, M.C., Wilson, M.C., Elmquist, J.K., and Jacobson, C.D. (1996) Characterization and ontogeny of synapse-associated proteins in the developing facial and hypoglossal motor nuclei of the brazilian opossum. *J. Comp. Neurol.*, 368: 270-284.

- Voigt, T., Lima, D.D., and Beckmann, M. (1993) Synaptophysin immunoreactivity reveals inside-out pattern of early synaptogenesis in ferret cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 330: 48-64.
- Wang, X.M., Xu, X.M., Qin, Y.Q., and Martin, G.F. (1992) The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 68: 203-216.
- West Greenlee, M.H., Swanson, J.J., Simon, J.J., Elmquist, J.K., Jacobson, C.D., and Sakaguchi, D.S. (1996) Postnatal development and the differential expression of presynaptic terminal-associated proteins in the developing retina of the Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 96: 159-172.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Südhof, T.C., and Anderson, R.G.W. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP2: implications for membrane recycling. *Cell*, 78: 751-760.

Figure 1

Photograph of an opossum, *Monodelphis domestica*, on the day of birth.

(scale bar equals 1mm)

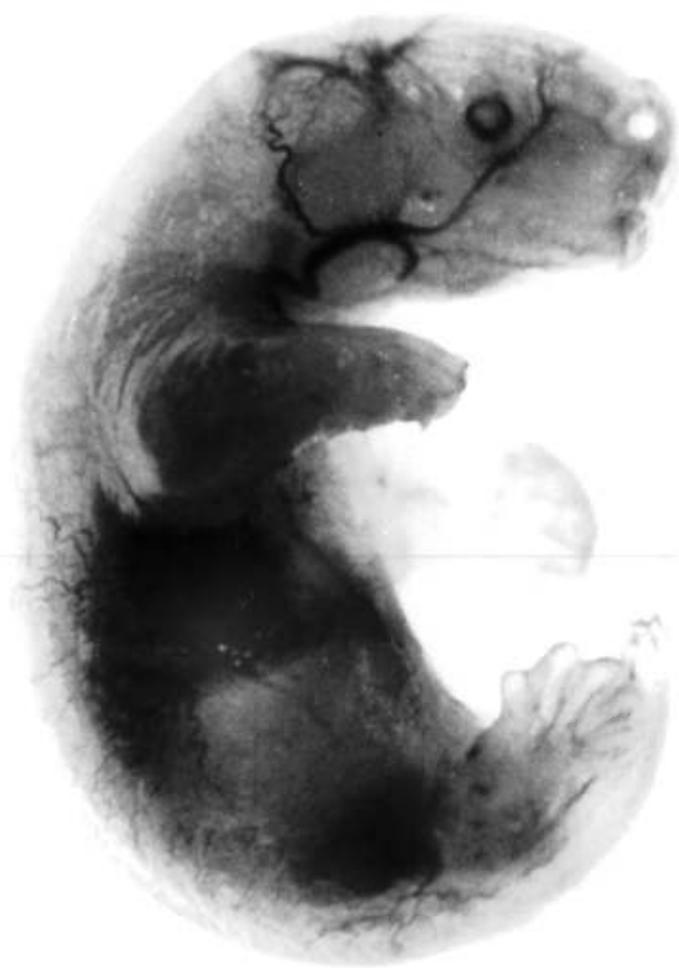
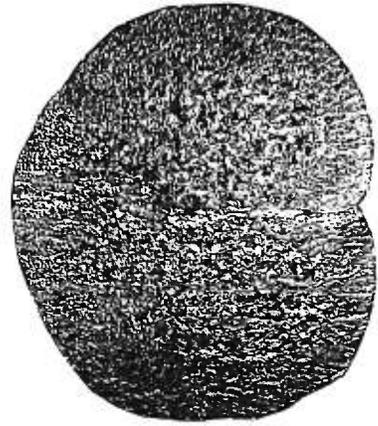
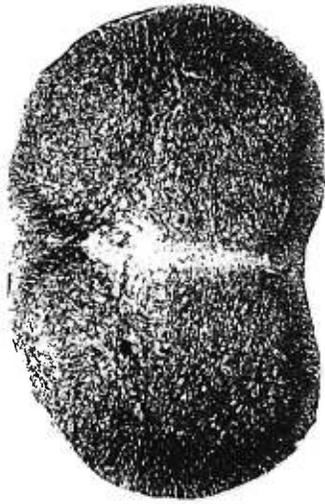


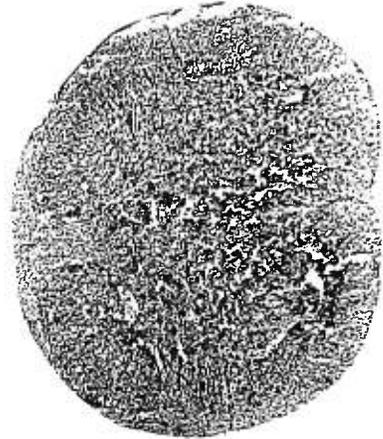
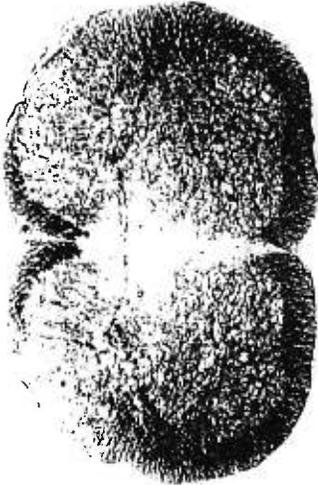
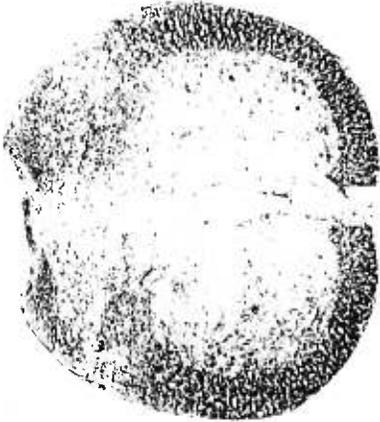
Figure 2

Synaptophysin, synaptotagmin-I and SNAP-25 immunolabeling in the brachial enlargement in P1, P10 and P28 opossum and corresponding Nissl-stained. (scale bars equal 200  $\mu\text{m}$ ).

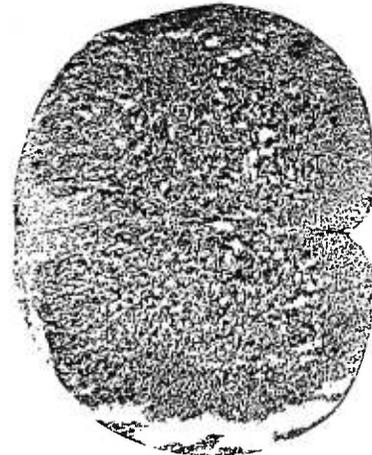
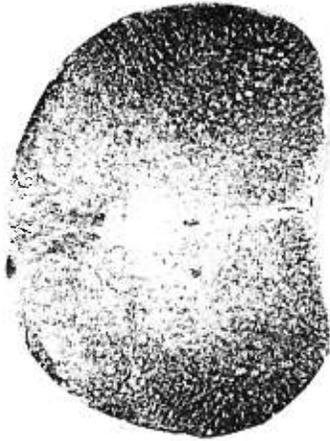
SNAP-25



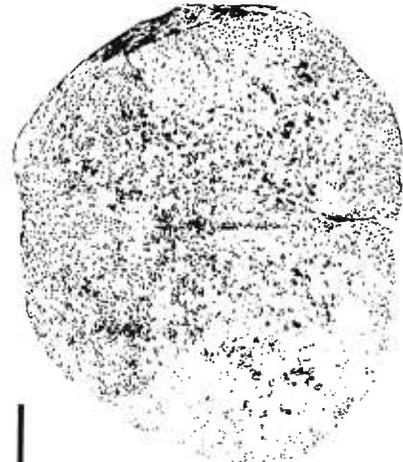
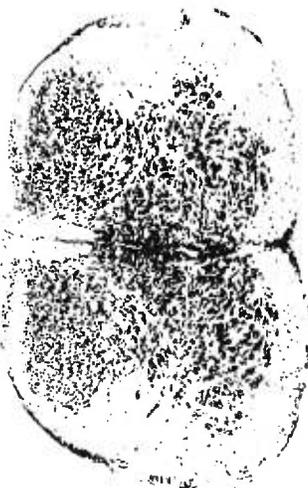
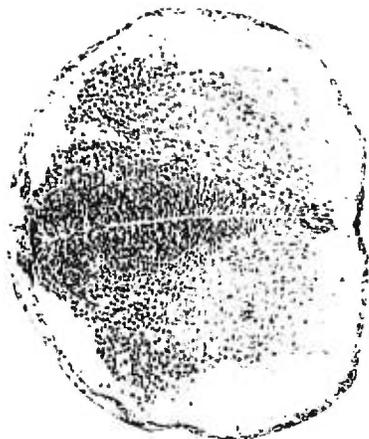
Synaptotagmin-I



Synaptophysin



Nissl



1

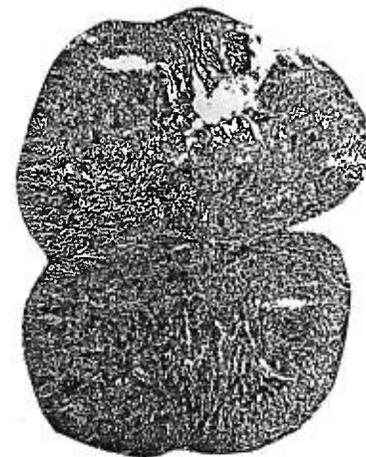
10

28

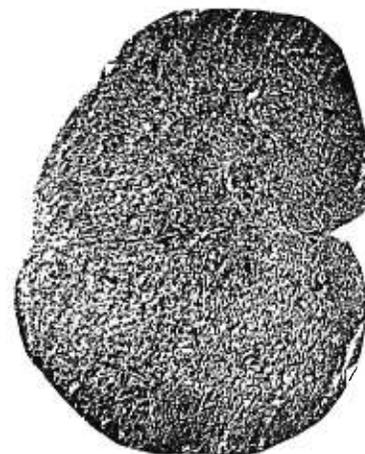
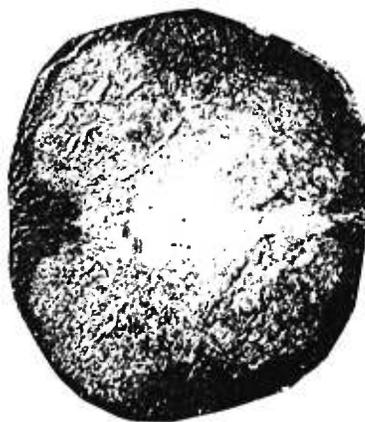
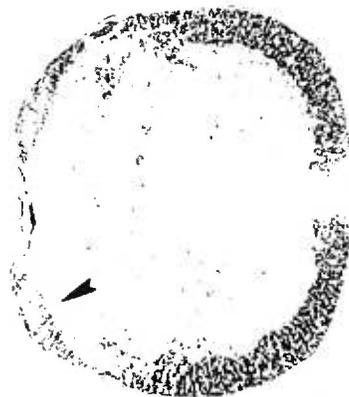
Figure 3

Synaptophysin, synaptotagmin-I and SNAP-25 immunolabeling in the lumbosacral enlargement in P1, P10 and P28 opossum and corresponding Nissl-stained. The arrow head in the synaptotagmin-I section at P1 points to the dorsal region of the presumptive white matter. (scale bars equal 200  $\mu\text{m}$ ).

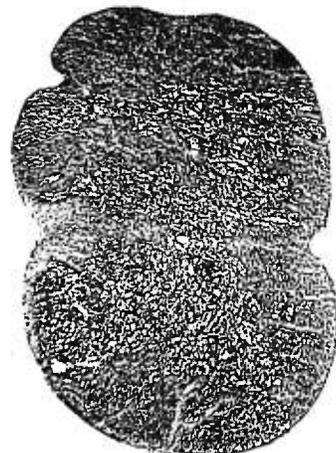
SNAP-25



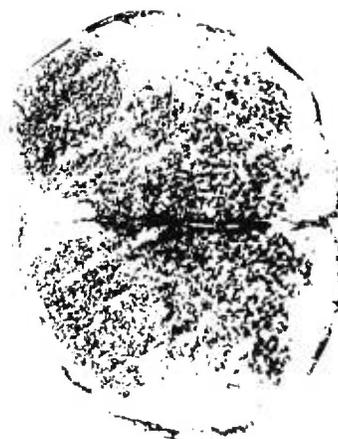
Synaptotagmin-I



Synaptophysin



Nissl



P1

P10

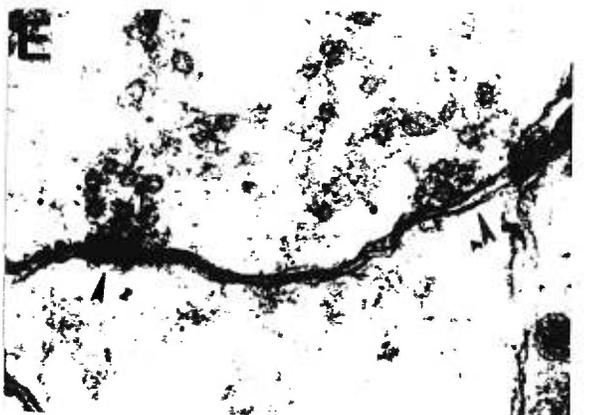
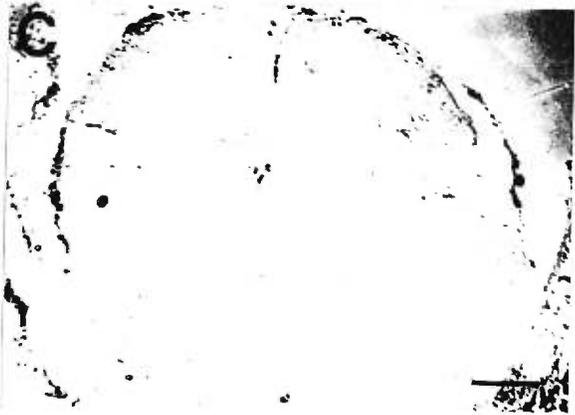
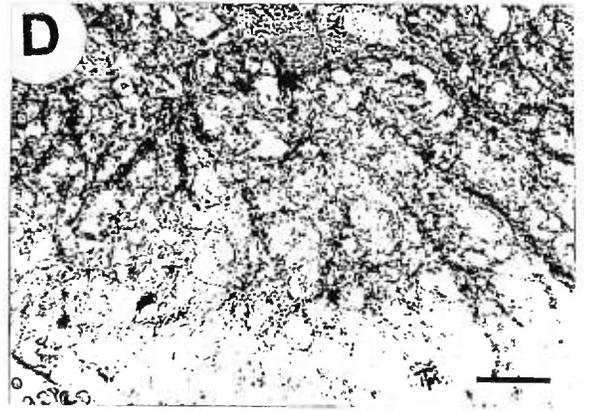
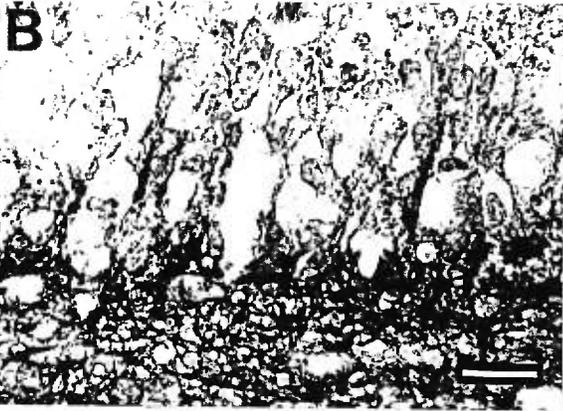
P28



#### Figure 4

**A:** Synaptophysin-like immunolabeled sagittal section of the brain and spinal cord of a newborn opossum (scale bar 1 mm). The area indicated by the arrow is shown at a higher magnification in **B**. **B:** Border of the presumptive white matter and marginal zone in the brachial enlargement in P1 opossum showing that the immunolabeling is darker in the inner portion of the marginal zone bordering the ventral horn than more peripherally (scale bar = 31.5  $\mu$ m). **C:** Control section from the brachial enlargement of a P15 opossum processed without the anti-synaptotagmin-I antibody. **D:** Synaptophysin-like immunolabeling of varicosities on dendrites of ventral horn neurons extending into the white matter seen on a cross section from the brachial enlargement of a P15 opossum (scale bar = 20  $\mu$ m). **E:** Electron photomicrograph of a nerve terminal making two synaptic contacts with a neuron in the ventrolateral gray matter of the brachial enlargement of a P1 opossum (60 000 X).

**A**



### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces études sur la synaptogenèse dans les renflements de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica* ont été réalisées dans le but de voir s'il existe une meilleure corrélation entre l'apparition et la maturation des comportements moteurs et la synaptogenèse qu'entre ces premiers et la formation des différentes voies motrices ou la myélinogenèse des fibres périphériques innervant les membres.

La technique d'immunohistochimie utilisée dans le cadre de ce projet ne permet peut-être pas d'identifier toutes les synapses, surtout lors des étapes précoces de leur formation. C'est pourquoi nous avons combiné à cette étude expérimentale basée sur un très grand nombre d'animaux des observations anatomiques en microscopie électronique effectuées sur quelques animaux d'âge croissant. Les synapses apparentes au microscope électronique sont peu nombreuses et d'apparence immature dans les renflements spinaux des jeunes opossums, et ce, particulièrement dans le renflement lombosacré (LS). Ces synapses sont surtout observées dans la région ventrolatérale de la matière grise, correspondant à la région marquée immunohistochimiquement. Donc, il est fort possible que la synaptogenèse dans les renflements de la moelle épinière ne débute pas beaucoup plus tôt que ce qui est indiqué par l'immunohistochimie en microscopie photonique, et qu'elle se déroule surtout postnatalement, particulièrement dans le renflement LS.

Certaines différences de marquage immunohistochimique ont été observées entre des spécimens du même âge. Toutefois, ces différences étaient reliées au niveau d'intensité du marquage immunohistochimique et non à sa localisation dans la matière blanche ou dans la matière grise. Cette variation interindividuelle a principalement été détectée chez les spécimens les plus jeunes. En effet, il est possible que les opossums naissants ne soient pas tous exactement au même stade de développement (la gestation est

de 14 à 15 jours) et que leur développement subséquent s'effectue à des rythmes quelque peu différents. Ceci est d'autant plus vrai lorsque les portées sont de tailles différentes. Les variations d'intensité de marquage observées entre les spécimens de même âge n'ayant pas été révélés ensemble peuvent être causées par des variations techniques mineures comme la température des bains par exemple. Indépendamment des différences d'intensité observées entre les animaux de même âge, pour chacun des spécimens l'intensité du marquage était plus forte dans le renflement brachial (BR) que dans le LS aux âges où le marquage augmente en intensité.

Bien que le patron de marquage de la synaptophysine, de la synaptotagmine-I et de la SNAP-25 soient similaires en de nombreux points, quelques différences ont été néanmoins observées. La synaptotagmine-I a été détectée dans la région dorsale du renflement LS plus précocement que les deux autres, dès la naissance. Ceci suggère que cette protéine vésiculaire serait présente dans les axones en croissance avant les autres protéines synaptiques étudiées. La synaptophysine, une autre protéine vésiculaire, disparaît de la matière blanche avant la synaptotagmine-I. Par contre, la SNAP-25, une protéine présynaptique membranaire, disparaît la dernière de la matière blanche. Une séquence similaire dans la disparition de ces trois protéines a été observée par West Greenlee et al. (1996) dans certaines couches de la rétine de *M. domestica* où on les retrouve de façon transitoire. En effet, ces résultats peuvent suggérer que les différentes protéines ne sont pas intégrées et/ou transportées dans les vésicules au même moment. Nous marquons peut-être, dans les axones en croissance, des vésicules immatures, leur manquant certaines protéines synaptiques à un certain moment. Ces observations sont très intéressantes puisque le modèle vésiculaire pour expliquer qu'une synapse fonctionnelle requière la présence concomitante des trois protéines étudiées ici. Des recherches plus poussées sur le rôle de ces trois protéines pourraient nous aider à mieux comprendre la

signification d'une telle séquence d'apparition et de disparition du marquage immunohistochimique dans les axones en croissance.

### 3.1 Gradients de formation

Si l'on compare la distribution et l'intensité relative du marquage immunohistochimique des trois protéines synaptiques dans la matière blanche et dans la matière grise des deux renflements, ainsi qu'à l'intérieur de chacun, nous pouvons remarquer que la synaptogenèse se déroule selon trois gradients généraux chez l'opossum *M. domestica*: rostrocaudal, ventrodorsal et latéromédian. Ces observations sont en corrélation avec les gradients observés sur des coupes de Nissl dans le développement général de la moelle épinière de l'opossum (Cabana, 1996), avec ceux de l'innervation de la moelle épinière par les voies supraspinales (Wang et al., 1992, Pflieger et Cabana, 1996) ainsi qu'avec les gradients de la formation des membres antérieurs et postérieurs (Cassidy et al, 1994), incluant la myélinogenèse des racines ventrales et dorsales les innervant (Leblond et Cabana, 1997). Des gradients ventrodorsal et latéromédian sont également présents dans le développement de l'immunoréactivité de la synaptophysine dans la moelle épinière thoracique du rat prénatal (Bergmann et al., 1991).

La présence initiale de marquage dans la matière blanche présomptive de la moelle épinière de l'opossum nouveau-né et son absence quasi-totale dans la matière grise présomptive suggèrent que les trois protéines présynaptiques sont vraisemblablement présentes dans les axones des neurones en croissance avant que ces derniers n'établissent de contacts synaptiques avec leur cible. Ces observations corroborent les travaux de Bergmann et al. (1991) qui ont observé la présence de la synaptophysine dans la matière blanche présomptive avant la matière grise présomptive dans la moelle thoracique du rat embryonnaire, de Leclerc et al. (1989) qui l'ont également montré dans le cortex

cérébelleux du rat postnatal, et par Osen-Sand et al. (1993) pour la SNAP-25 dans le cortex visuel. Certains auteurs ont identifié la synaptotagmine dans les axones de neurones spinaux en croissance en culture (Dai et Peng, 1996), ainsi que dans des cultures de neurones de l'hippocampe (Kraszewski et al., 1995). Ces trois protéines synaptiques pourraient être marquées immunohistochimiquement alors qu'elles sont transportées le long de l'axone vers le cône de croissance. Les travaux d'Osen-Sand et al. (1993) sur des cultures de neurones corticaux ont également démontré que la SNAP-25 joue un rôle important dans la croissance axonale en permettant l'ajout de nouvelle membrane par fusion de vésicules (cytoplasmiques) avec la membrane plasmique de l'axone du neurone. Les observations en microscopie électronique des renflements de la moelle épinière de jeunes opossums révèlent la présence de synapses sur des neurones dans la matière grise présomptive, mais aucune dans la matière blanche présomptive. Ces observations suggèrent que les protéines marquées en immunohistochimie dans la matière blanche présomptive sont dans les axones en croissance ou dans les cônes de croissance. En effet, des observations effectuées de coupes sagittales de la moelle épinière aux jeunes âges montrent que la matière blanche présomptive est marquée sur toute sa longueur, avec le gradient rostrocaudal d'intensité observé sur coupes transversales.

Dans quelles fibres nerveuses les protéines synaptiques sont-elles marquées lors du développement de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*? En comparant la localisation et l'intensité du marquage immunohistochimique des protéines synaptiques avec ce qui est maintenant connu du développement des voies ascendantes et descendantes tel que par traçage neuronal, les interprétations suivantes peuvent être suggérées. Le marquage immunohistochimique précoce dans la région la plus interne de la matière blanche présomptive est vraisemblablement celui des axones propriospinaux. En effet, ces derniers se développent en majeure partie au cours des 20 premiers jours postnataux (Cassidy et Cabana, 1993). Le marquage précoce dans la région ventrale de la

matière blanche serait celui des projections du complexe vestibulaire, en particulier celles en provenance du noyau latéral qui est le premier à envoyer ses axones vers la moelle épinière (Pflieger et Cabana, 1996; Wang et al. 1992). Le marquage initial dans les régions périphériques latérales et ventrolatérales de la matière blanche serait vraisemblablement celui des axones spinaux ascendants (spinoréticulaires, spinothalamiques, spinocérébelleux) qui ont déjà atteint la jonction spinomédullaire à la naissance (Desrosiers et al., 1993; Desrosiers, 1995; Qin et al., 1993), mais aussi des axones descendants qui proviennent de la formation réticulée médullaire et qui sont présents dans la moelle épinière du jeune opossum (Pflieger et Cabana, 1996; Wang et al. 1992). Le marquage dans les régions dorsales de la moelle épinière est majoritairement celui de projections ascendantes de la racine dorsale des ganglions, mais également celui de certains axones spinaux ascendants (Desrosiers, 1995; Qin et al., 1993). Dans la matière grise, le marquage immunohistochimique initial observé ventrolatéralement peut être celui de synapses à l'origine des connexions intrasegmentaires et propriospinales courtes, et possiblement d'axones propriospinaux longs et supraspinaux descendants. La croissance des longs systèmes ascendants et descendants le long de la moelle épinière se poursuit pendant quelques semaines, notamment par l'ajout d'axones encore plus longs (ex: les axones descendants en provenance de la formation réticulée pontique et mésencéphalique, du noyau rouge, etc.). Cette période correspond au moment où l'on assiste à une augmentation de l'intensité du marquage dans la matière blanche ainsi qu'à son augmentation volumétrique. Ceci correspond également à l'augmentation du marquage immunohistochimique dans la matière grise jusqu'à ce qu'elle soit complètement marquée, lors de la troisième semaine postnatale. Les gradients généraux ventrodorsal et latéromédian du marquage immunohistochimique dans la matière grise correspondent à ceux des principaux systèmes descendants. Par exemple, les axones vestibulospinaux sont présumément parmi les premiers marqués et leur territoire d'innervation est principalement la corne ventrale. Quant aux axones rubrospinaux, ils sont présumément marqués un peu

plus tard et leur principal territoire d'innervation est le gris intermédiaire et dorsal. Chez l'opossum *Didelphis virginiana*, le traçage antérograde des axones rubrospinaux a révélé que ces axones pénètrent la matière grise selon un gradient latéromédian (Cabana et Martin, 1985). La diminution et finalement la disparition du marquage dans la matière blanche, au cours de la cinquième à la septième semaine postnatale, correspond au moment où ces systèmes de projection ont atteint leur cibles et terminé leur croissance et établissent des connexions synaptiques avec elles. Kraszewski et al. (1995) ont démontré chez le rat que la synaptogenèse voit l'immobilisation des vésicules synaptiques au site de contact; ceci suppose que moins de protéines sont marquées dans l'axone, jusqu'à ce qu'elles ne soient plus détectables dans les axones de l'animal mature.

Le fait que deux des trois protéines synaptiques étudiés aient été observées dans les régions dorsales de la matière blanche présomptive plus tardivement dans le renflement LS que dans le renflement BR, et que le marquage immunohistochimique est généralement moins intense dans le renflement LS que dans le renflement BR chez les jeunes opossums indique que les afférences primaires des ganglions rostraux se forment plus tôt que celles des ganglions caudaux. Ce gradient rostrocaudal de la formation des funicules dorsaux est identique aux gradients des autres aspects du développement de la moelle épinière mentionnés précédemment.

### 3.2 Synaptogenèse et comportements moteurs

Il la naissance, l'opossum effectue avec ses membres antérieurs des mouvements rythmiques et alternés, et ses doigts empoignent la fourrure du ventre de la mère pour y grimper et atteindre une tétine. Ces mouvements sont exprimés au cours des quelques semaines où l'opossum est fixé à une mamelle (Pflieger et al., 1996). Il est particulièrement intéressant de noter que le marquage initial observé dans la matière grise

se retrouve dans la région des motoneurones qui innervent la musculature distale. En microscopie électronique, les synapses observées dans la région ventrolatérale de la matière grise semblent situées sur les dendrites de motoneurones, mais aussi d'autres neurones (intra-segmentaires, spinoencéphaliques). Toutefois, nous ne savons pas si ces synapses sont stables ou transitoires, car il est fréquent de constater dans plusieurs systèmes que le nombre initial de synapses formées est supérieur au nombre observées à l'état adulte, possiblement afin de garantir une innervation appropriée, et que des synapses sont ensuite éliminées (Kandel et al., 1995). Il est intéressant de noter qu'à partir de P49 la densité du marquage commence à diminuer dans la matière grise et ce jusqu'à l'obtention du patron d'intensité observé à l'âge adulte. Cette baisse d'intensité du marquage peut être dû, par exemple, à la différenciation et à la croissance du tissu, ainsi qu'à une diminution sélective du nombre de synapses au cours du développement.

Cassidy et al. (1994) n'ont pas pu établir si le mouvement d'empoignement était bel et bien un réflexe chez les très jeunes opossums, c'est-à-dire en réponse à un stimulus sensoriel. En effet, les petits détachés de leur mère continuent à exécuter ces mouvements même en l'absence d'un substrat à empoigner. Nos résultats, indiquant que la synaptogenèse s'effectue tout d'abord dans la région des motoneurones innervant la région distale des membres, et ce sans connections apparentes avec les afférences primaires, appuient l'idée que la composante motrice du réflexe d'empoignement est en place avant la composante sensorielle. Ce mouvement serait donc l'expression du générateur de patron central ("central pattern generator"). Ce n'est qu'au cours du début de la troisième semaine postnatale, lorsque le marquage immunohistochimique est abondant dans la corne dorsale et le gris intermédiaire, en plus de la corne ventrale, que Cassidy et al. (1994) avaient la certitude que l'empoignement était bel et bien effectué de façon réflexe chez *M. domestica*. Vers la fin de troisième semaine postnatale, le marquage immunohistochimique est présent dans la totalité de la matière grise et cette période

correspond au moment où les réflexes sensorimoteurs simples sont exprimés. Le gradient général latéromédian du marquage immunohistochimique des trois protéines synaptiques semble indiquer que les neurones qui innervent la musculature distale recevraient des contacts synaptiques des différents systèmes mentionnés ci-haut avant ceux qui innervent la musculature proximale. Toutefois, un tel gradient latéromédian dans le développement de la mobilité des membres est plus évident pour les membres antérieurs que pour les membres postérieurs (Pflieger et al., 1996; voir aussi Cassidy et al., 1994).

Au cours de la première semaine postnatale, les membres postérieurs de l'opossum sont immobiles et leur développement moteur suit d'environ une semaine celui des membres antérieurs. Les réflexes impliquant plusieurs segments d'un membre (ex: le réflexe de retrait) apparaissent après ceux qui n'impliquent qu'un segment (ex: le réflexe d'empoignement). La période où le marquage est le plus dense dans la matière grise et où il a complètement disparu de la matière blanche, entre la quatrième et la septième semaine, correspond à la période de maturation de la plupart des réflexes (Cassidy et al., 1994) et à l'expression de comportements moteurs plus complexes comme la locomotion spontanée (Pflieger et al., 1996). La disparition du marquage dans la matière blanche est corrélée avec l'arrêt de la croissance des voies nerveuses centrales et avec le début de la myélinogenèse de ces mêmes voies (observations personnelles) ainsi que dans les racines ventrales et dorsales des deux renflements (Leblond et Cabana, 1997). La synaptogenèse serait donc mieux corrélée à l'apparition des comportements moteurs et la myélinogenèse à leur maturation.

### 3.3 Perspective

Ce projet de recherche ne s'est pas déroulé sans embûches. Comme tout projet nécessitant l'utilisation de plusieurs animaux d'âge croissant, les périodes d'attente pour

l'obtention d'un âge particulier pouvaient facilement s'étendre sur plusieurs mois. En effet, les accouplements en captivité ne sont pas toujours fructueux. L'élaboration de trois protocoles immunohistochimiques propres à *Monodelphis domestica* a également été long et ardu. De plus, l'immaturation du tissu nerveux des jeunes opossums nécessitait une très grande précision lors des chirurgies et des manipulations immunohistochimiques subséquentes.

L'ajout d'observations immunohistochimiques en microscopie électronique pour les trois protéines synaptiques étudiées serait un atout considérable à mon projet. De plus, une quantification du marquage immunohistochimique, tant en microscopie photonique qu'électronique, pourrait compléter les résultats. Bien que très intéressantes, ces manipulations supplémentaires dépasseraient le cadre d'un projet de maîtrise.

Il serait éventuellement intéressant de combiner à cette étude de la synaptogenèse dans les renflements de la moelle épinière, en plus des travaux en cours sur la myélinogenèse des voies centrales, la synaptogenèse dans le cerveau ainsi que des travaux immunohistochimiques sur les neurotransmetteurs et les récepteurs postsynaptiques présents à ces niveaux. Bien que le laboratoire ne soit pas équipé pour ce type de recherche, des études électrophysiologiques ajouteraient aux données actuelles sur les réflexes sensorimoteurs.

#### 4. BIBLIOGRAPHIE

- Alunan, J., et Bayer, S.A. (1984) The development of the rat spinal cord. Adv. Anat. Emb. Cell Biol., Vol 85, Springer, New York.
- Alstermark, B., Kümmel, H., Pinter, M.J., et Tantisira, B. (1987a) Branching and terminaison of C3-C4 propriospinal neurons in the cervical spinal cord of the cat. Neurosci. Lett., 74: 291-296.
- Alstermark, B., Lundberg, A., Pinter, M., et Sasaki, S. (1987b) Long C3-C4 propriospinal neurones in the cat. Brain Res., 404: 382-388.
- Augustine, G.J., Charlton, M.P., et Smith, S.J. (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. Annu. Rev. Neurosci., 10: 633-693.
- Balslev, Y., Saunders, N.R., et Mollgard, K. (1992) Onset on neocortical synaptogenesis in the neonatal *Monodelphis domestica* (South American grey short-tailed opossum). Synapse, 10: 267-270.
- Bark, I.C., et Wilson, M.C. (1994) Regulated vesicular fusion in neurons: snapping together the details. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4621- 4624.
- Bergmann, M., Schuster, Th., Grabs, D., Marquèze-Pouey, B., Betz, H., Taurig, H., Mayerhofer, A., et Gratzl, M. (1991) Synaptophysin and synaptoporin expression in the developing rat olfactory system. Devel. Brain Res., 74: 235-244.

- Bischoff, A., et Thomas, P.K. (1984) Microscopic anatomy of myelinated nerve fibers. Dans: Peripheral Neuropathy, vol.1, pp. 104-130. Ed.: P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert et R. Bunge, W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- Bourne, H.R. (1988) Do GTPase direct membrane traffic in secretion? Cell, 53: 669-671.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., et Jahn, R. (1992) A calcium sensor on the synaptic vesicle surface. Science, 256: 1021-1025.
- Brunjes, P.C., Jazaeri, A., et Sutherland, M.J. (1992) Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (the grey short-tailed opossum). J. Comp. Neurol. 320: 544-554.
- Burns, M.E., Beushausen, S.A., Chin, G.J., Tang, D., DeBello, W.M., Dresbach, T., O'Connor, V., Schweizer, F.E., Wang, S.S., Whiteheart, S.W., Hawkey, L.A., et Augustine, G.J. (1995) Proteins involved in synaptic vesicle docking and fusion. Cold Spring Harbor Quant. Biol., 60: 337-348.
- Burgoyne, R.D., et Morgan, A. (1995) Ca<sup>2+</sup> and secretory vesicle dynamics. Trends Neurosci., 18: 191-196.
- Cabana, T. (1996) Ontogenesis of motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. Animals in their Environnement. ORBIS Publishing, Frelighsburg, Québec, Chap 10:161-185.

- Cabana, T., Desrosiers, C., et Nadeau, A. (1992) The ontogenesis of the corticobulbar projections and the virtual absence of corticospinal connections in the opossum, *Monodelphis domestica*. Soc. Neurosci. Abst., 17: 440.8.
- Cabana, T., and Martin, G.F. (1985) Corticospinal development in the North American opossum: evidence for a sequence in the growth of cortical axons in the spinal cord and for transient projections. Devel. Brain Res., 23: 69-80.
- Calakos, N., et Scheller, R.H. (1996) Synaptic vesicles biogenesis, docking and fusion: a molecular description. Physiol. Rev., 76: 1-29.
- Cassidy, G., et Cabana, T. (1993) The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. Devel. Brain. Res., 72: 291-299.
- Cassidy, G., Boudrias, D., Pflieger, J.-F., et Cabana, T. (1994) The development of sensorimotor reflexes in the opossum, *Monodelphis domestica*. Brain Behav. Evol., 43: 244-253.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P., et Mauro, A. (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicle at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol., 57: 499-524.
- Ceccarelli, B., Grohovaz, F., et Hurlbut, W.P. (1979) Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. I. Effects of black widow spider venom and Ca<sup>2+</sup>-free solutions on the structure of the active zone. II. Effects of electrical stimulations and high potassium. J. Cell. Biol., 81: 163-192.

- Chow, I. (1990) Cell-cell interaction during synaptogenesis. *J. Physiol. (Paris)*, 84: 121-127.
- Couteaux, R. (1961) Principaux critères morphologiques et cytochimiques utilisables aujourd'hui pour définir les divers types de synapses. *Actualités neurophysiol.*, 3: 145-173.
- Couteaux, R., et Pécot-Dechavassine, M. (1970) Vésicules synaptiques et poches au niveau des "zones actives" de la jonction neuromusculaire. *C. R. Acad. Sci. Paris* 271 (Série D): 2346-2349.
- Couteaux, R., et Pécot-Dechavassine, M. (1974) Les zones spécialisées des membranes présynaptiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 278 (Série D): 291-293.
- Cowan, W.M (1978) Aspect of neural development. *Int. Review Physiol. Neurophysiology* III, 17: 149-191.
- Dai, Z., et Peng, B. (1996) Dynamics of synaptic vesicles in cultured spinal cord neurons in relationship to synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.*, 7: 443-452.
- Damer, C.K., et Creutz, C.E. (1996) Calcium-dependent self-association of synaptotagmin-I. *J. Neurochem.*, 67(4): 1661-1668.
- DeBello, W.M., Betz, H., et Augustine, G.J. (1993) Synaptotagmin and neurotransmitter release. *Cell*, 74: 947-950.

- DeBello, W.M., O'Connor, V., Dresbach, T., Whiteheart, S.W., Wang, S.S.-H., Betz, H., Rothman, J.E., et Augustine, G.J. (1995) SNAP-mediate protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature*, 373: 626.
- del Castillo, J., et Katz, B. (1955) La base "quantale" de la transmission neuromusculaire. Dans *Microphysiologie comparée des éléments excitables*. Centre National de la Recherche Scientifique Colloques Internationaux. Vol 67, Paris, 245-258.
- De Robertis, E., et Bennett, H.S. (1955) Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 47-58.
- Desrosiers, C., Cassidy, G., et Cabana, T. (1993) Ontogenesis of the ascending spinal pathways from the lumbosacral enlargement in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18: 225.20.
- Desrosiers, C. (1995) Ontogenèse des voies spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.
- Devoto, S.H., et Barnstable, C.J. (1989) Expression of the growth cone specific epitope CDA 1 and synaptic vesicle protein SVP38 in the developing mammalian cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 290: 154-168.
- Devoto, S.H. (1990) Neuronal growth cone migration. *Experientia*, 46: 916-922.

- Elferink, L.A., Peterson, M.R., et Scheller, R.H. (1993) A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis. *Cell*, 72: 153-159.
- Fadem, B.H., Trupin, G.L., Maliniak, E., Vanderberg, J.L., et Hayssen, V. (1982) Care and breeding of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab. Ani. Sci.*, 32: 405-409.
- Fesce, R., Grohsvaz, F., Valtora, F., et Meldosi, J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or "kiss and run"? *Trends Cell Biol.*, 4: 1-4.
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G.A., Baumert, M., Perin, M.S., Hanson, T.N., Burger, P.M., Jahn, R., et Südhof, T.C. (1990) Rab3a is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 87: 1988.
- Forscher, P., et Smith, S.J. (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in neuronal growth cone. *J. Cell Biol.*, 107: 1505-1516.
- Fox, M.W. (1964) A phylogenetic analysis of behavioral neuro-ontogeny in precocial and non-precocial mammals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 28: 197-202.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., et Südhof, T.C. (1994) Synaptotagmin I: a major  $Ca^{2+}$  sensor for transmitter release at the central synapse. *Cell*, 79: 717-727.

- Gingras, J., et Cabana, T. (1998) The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain res.*, 106: 211-216.
- Gonzalez-Aguilar, F. (1993) What do synaptic vesicles contain? *Neurosci.*, 56(1): 247-261.
- Grillner, S. (1975) Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol. Rev.*, 55: 247-304.
- Hess, S.D., Doroshenko, P.A., et Augustine, G.J. (1993) A functional role for GTP-binding proteins in synaptic vesicle cycling. *Science*, 259: 1169.
- Heuser, J.E. (1989) The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. *Cell Biol. Int. Rep.* 13: 1063-1076.
- Heuser, J.E., et Reese, T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.*, 57: 315-344.
- Illert, M., Lundberg, A., Padel, Y., et Tanaka, R. (1978) Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 5. Properties of monosynaptic excitatory convergence on C3-C4 propriospinal neurones. *Exp. Brain Res.*, 33: 101-130.

- Jahn, R., Schielbier, W., Ouimet, C, et Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4137-4141.
- Jessell, T.M. et Kandel, E.R. (1993) Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell*, 72- Neuron 10 (Supl.); 1-30.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., et Jessell, T.M. (1995) *Essential of Neural Science and Behavior*. Appleton & Lange, USA.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., et Jessell, T.M. (1991) *Principles of Neural Science*. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, third edition.
- Katz, B., (1966) *Nerve, muscle and synapse*. New York; NY: McGraw-Hill.
- Kiene, M.-L., et Stadler, H.(1987) Synaptic vesicles in electromotoneurons: I. Axonal transport site of transmitter uptake and processing of core proteinoglycan during maturation. *EMBO J.*, 6: 2209-2215.
- Knaus, P., Betz, H., et Rehm, H. (1986) Expression of syaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J. Neurochem.*, 47: 1302- 1304.
- Koenig, J.H., et Ikeda, K. (1996) Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J. Cell Biol.*, 135(3): 797-808.
- Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M., and De Camilli, P. (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons

visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* 15: 4328-4342.

Lacour, M., et Borel, L. (1993) Vestibular control of posture and gait. *Arch. Ital. Biol.*, 131: 81-104.

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

Leblond, H., et Cabana, T. (1997) Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of the development in the gray opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Comp. Neurol.*, 386: 203-216.

Leclerc, N.P., Beesley, W., Brown, I., Colonnier, M., Gurd, J. W., Paladino, T., et Hawkes, R. (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, 280: 197-212.

Li, J.-H., Kling-Peterson, A., et Dahlström, A. (1992) Influence of spinal cord transection on the presence and axonal transport of CGRP-chromogranin A-VIP -synapsin-I and -synaptotagmin-like immunoreactivities in rat motoneuron. *J. Neurobiol.*, 23: 1094-1110.

Li, J.-H., Lambert, E., Jahn, R., et Dalhström, A. (1996) Axonal transport and distribution of synaptobrevin I and II in the rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.*, 16: 137-147.

- Llinas, R., Steinberg, Z., et Walton, K. (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys. J.*, 33: 323-332.
- Miller, S. (1970) Excitatory and inhibitory propriospinal pathways from lumbosacral to cervical segments in the cat. *Acta Physiol. Scand.*, 80: 25A- 26A.
- Magill-Solc, C., et McMahan, U. (1990) Agrin-like molecules in motor neurons. *J. Physiol. (Paris)*, 84: 78-81.
- Mundigl, O., et De Camilli, P. (1994) Formation of synaptic vesicles. *Curr. Opin Cell Biol.*, 6: 566-567.
- Morgan, A., et Burgoyne, R.D. (1997) Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Cell Devel. Biol.*, 8: 141-149.
- Ngsee, J.K., Miller, K., Wendland, B., et Scheller, R.H. (1990) Multiple GTP-binding proteins from cholinergic synaptic vesicles. *J. Neurosci.*, 10: 317.
- O'Connor, V., Augustine, G.J., et Betz, H. (1994) Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. *Cell*, 76: 785-787.
- Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Greeingloh, G., et Casticas, S. (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotide in vitro and in vivo. *Nature*, 364: 445-448.
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E., et Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated

protein SNAP-25 differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell. Biol.*, 109: 3039-3052.

Oyler, G.A., Polli, J.W., Wilson, M.C., et Billingley, M.L. (1991) Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5247-5251.

Palade, G.E., et Palay, S.L. (1956) Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.* 118: 335-336.

Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, G.A., et Südhof, T.C. (1990) Phospholipid binding by synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, 345: 260-263.

Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R., et Südhof, T.C. (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.*, 266(1): 623-629.

Peters, A., Palay, S., Webster, H., et Saunders W.B. (1976) *Fine Structure of the Nervous System: The Neuron and Supporting Cells* Compagny, USA.

Pflieger, J.-F., et Cabana, T. (1996). The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica* . *Anat. Embryol.*, 194: 75-88.

Pflieger, J.-F., Cassidy, G., et Cabana, T. (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behav. Brain Res.*, 80: 137-143.

- Purves, D., et Lichtman, J.W. (1984) Principles of neural development. Sinauer Associates INC., Massachusetts, 433 pages.
- Qin, Y.Q., Wang, X.M., et Martin, G.F. (1993) The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 75: 75-90.
- Ramon y Cajal, S. (1890) A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet? *Anat. Anz.*, 5: 609-613.
- Ramon y Cajal, S. (1911) Histologie de l'Homme et des Vertébrés. Vol. 1, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (C.S.I.C.), Madrid, 986 pages.
- Regnier-Vigouroux, A., Tooze, S.A., et Huttner, W.B. (1991) Newly synthesized Synaptophysin is transported to synaptic-like microvesicles via constitutive secretory vesicles and plasma membrane. *EMBO J.*, 10: 3589-3601.
- Robertson, J.D. (1956) The ultrastructure of a reptilian myoneural junction. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: 381-394.
- Schwartz, J.H. (1979) Axonal Transport: components, mechanisms, and specificity. *Ann. Rev. Neurosci.*, 2: 467-504.

- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., et Rothman, J.E. (1993) SNAP receptor implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362: 318-324.
- Stone, D.K., Crider, B.P., Südhof, T.C., et Xie, X.S. (1989) Vacuolar proton pumps. *J. Bioenerget. Biomembr.*, 21: 605-620.
- Südhof, T.C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., et Jahn, R. (1987) A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*, 238: 1142-1144.
- Südhof, T.C., Czernick, A.J., Kao, H., Takei, K., Jonhston, P.A., Horiuchi, A., Wagner, M., Kanazir, S.D., Perin, M.S., De Camilli, P., et Greengard, P. (1989) Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science*, 245: 1474-1480.
- Südhof, T.C., Jahn, R. (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, 6: 665-667.
- Südhof, T.C., et Rizo, J. (1996) Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron*, 17: 379-388.
- Swanson, J.J., Kuehl-Kovarik, M.C., Wilson, M.C., Elmquist, J.E., et Jacobson, C.D. (1996). Characterization and ontogeny of synapse-associated proteins in the developing facial and hypoglossal motor nuclei of the brazilian opossum. *J. Comp. Neurol.*, 368: 270-284.

- Torri-Tarelli, F., Villa, A., Valtora, F., De Camilli, P., Greengard, P., et Ceccarelli, B. (1990) Redistribution of synaptophysin and synapsin I during a-latrotoxin-induced release of neurotransmitter at neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 110:449-459.
- Trifaro, J.-M., et Vitale, M.L. (1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, 16: 466-472.
- Valtora, F., Jahn, R., Fesce, R., Greengard, P. et Ceccarelli, B. (1988) Synaptophysin (p38) at the frog neuromuscular junction: its incorporation into the axolemma and recycling after intense quantal secretion. *J. Cell Biol.*, 107: 2719-2730.
- Valtora, F., Fesce, R., Grohovaz, F., Haimann, C., Hurlbut, W.P., Iezzi, N., Torri-Tarelli, F., Villa, A., et Ceccarelli, B. (1990) Neurotransmitter release and synaptic vesicle recycling. *Neuroscience*, 351: 477-489.
- Voigt, T., De Lima, A.D., et Beckmann, M. (1993) Synaptophysin immunohistochemistry reveals inside-out pattern of early synaptogenesis in ferret cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 330: 48-61.
- von Gersdorff, H., et Matthews, G. (1994) Dynamics of synaptic vesicles fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature*, 367: 735-739.
- von Wedel, R.J., Carlson, S.S., et Kelly, R.B. (1981) Transfer of synaptic vesicle antigens to the presynaptic plasma membrane during exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1014-1018.

- West Greenlee, M. H., Swanson, J.J., Simon, J.J., Elmquist, J.K., Jacobson, C.D., et Sakagushi, D.S. (1996) Postnatal development and the differential expression of presynaptic terminal-associated proteins in the developing retina of the Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 96: 159-172.
- Wang, X.M., Xu, X.M., Qin, Y.Q., et Martin, G.F. (1992) The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Devel. Brain Res.*, 68: 203-216.
- Wilson, V.J., et Melvill-Jones, G. (1979) *Mammalian vestibular Physiology*, Plenum Press, London.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Südhof, T.C., et Anderson, R.G.W. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell*, 78: 751-760.
- Zucker, R.S. (1996) Exocytosis- A molecular and physiological perspective. *Neuron*, 17(6): 1049-1055.

Annexe 1:

Protocole immunohistochimique contre la synaptophysine

## Protocole immunohistochimique contre la synaptophysine:

1)

- ) 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10% méthanol/ PBS, température de la pièce,
- ) 2 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 2% NHS (Natural Horse Serum)/ PBS,
- ) 10 minutes PBS,

### 2) Anticorps 1

- ) Anti-synaptophysine/2% NHS/ PBS, température pièce, **noirceur** (20 heures),  
\_\_\_\_\_ ( 1:500 )
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température pièce,

### 3) Anticorps 2

- ) Biotinylated horse anti-mouse IgG/ 2% NHS/ PBS, température pièce, **noirceur**,  
(2 heures) (1:600)  
\*(préparer l'ABC avant le premier rinçage)
- ) 3 fois 10 minutes PBS/ température pièce,

### 4) ABC

- ) ABC Elite kit/ PBS, température de la pièce, **noirceur**,  
(1:200) (1heure) \*  
\* Préparer la solution 30 minutes à l'avance
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,

### 5) DAB

- ) 2,5% nickel sulfate/ 0,04% DAB / 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Trp Acétate 0.1M,  
(8 minutes -----> adultes + PND 40 à 70)  
(6 minutes -----> PND 20 à 39)  
(4 minutes -----> PND 1 à 19)

6)

- ) rincer 0,9% saline,
- ) air dried overnight,

- 
- ) rincer à l'eau 1 fois pour enlever les résidus de sel
  - ) éthanol 80-90-100-100% (2 minutes),
  - ) 2 fois toluène (2 minutes),
  - ) monter à l'aide du microkit.

Annexe 2:  
Protocole immunohistochimique contre la synaptotagmine-I

## Protocole immunohistochimique contre la synaptotagmine-I:

1)

- ) 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10% méthanol/ PBS, température de la pièce,
- ) 2 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 2% NHS (Natural Horse Serum)/ PBS,
- ) 10 minutes PBS,

2) **Anticorps 1**

- ) Anti-Synaptotagmine/ 2% NHS/ PBS, **4°C, noirceur** (20 heures),  
\_\_\_\_\_ (1:1000)
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température pièce,

3) **Anticorps 2**

- ) Biotinylated horse anti-mouse IgG/2% NHS/ PBS, température pièce, **noirceur**,  
(2 heures) (1:600)  
\*(préparer l'ABC avant le premier rinçage)
- ) 3 fois 10 minutes PBS/ température pièce,

4) **ABC**

- ) ABC Elite kit/ PBS, température de la pièce, **noirceur**,  
(1:200) (1heure) \*  
\* Préparer la solution 30 minutes à l'avance
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,

5) **DAB**

- ) 2,5% nickel sulfate/ 0,04% DAB / 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tp Acétate 0.1M,  
(8 minutes -----> adultes + PND 40 à 70)  
(6 minutes -----> PND 20 à 39)  
(4 minutes -----> PND 1 à 19)

6)

- ) rincer 0,9% saline,
  - ) air dried overnight,
- 

- ) rincer à l'eau 1 fois pour enlever les résidus de sel
- ) éthanol 80-90-100-100% (2 minutes),
- ) 2 fois toluène (2 minutes),
- ) monter à l'aide du microkit.

Annexe 3:  
Protocole immunohistochimique contre la SNAP-25

## Protocole immunohistochimique contre la SNAP-25:

1)

- ) 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10% méthanol/ PBS, température de la pièce,
- ) 2 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,
- ) 30 minutes 2% NHS (Natural Horse Serum)/ PBS,
- ) 10 minutes PBS,

2) **Anticorps 1**

- ) Anti-SNAP-25/ 2% NHS/ PBS, **4°C, noirceur** (20 heures),  
\_\_\_\_\_ (1:1000)
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température pièce,

3) **Anticorps 2**

- ) Biotinylated horse anti-mouse IgG/2% NHS/ PBS, température pièce, **noirceur**,  
(2 heures) (1:600)  
\*(préparer l'ABC avant le premier rinçage)
- ) 3 fois 10 minutes PBS/ température pièce,

4) **ABC**

- ) ABC Elite kit/ PBS, température de la pièce, **noirceur**,  
(1:200) (1heure) \*  
\* Préparer la solution 30 minutes à l'avance
- ) 3 fois 10 minutes PBS, température de la pièce,

5) **DAB**

- ) 2,5% nickel sulfate/ 0,04% DAB / 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tp Acétate 0.1M,  
(8 minutes -----> adultes + PND 40 à 70)  
(6 minutes -----> PND 20 à 39)  
(4 minutes -----> PND 1 à 19)

6)

- ) rincer 0,9% saline,
- ) air dried overnight,

- 
- ) BIEN rincer à l'eau plusieurs fois pour enlever les résidus de sel
  - ) éthanol 80-90-100-100% (2 minutes),
  - ) 2 fois toluène (2 minutes),
  - ) monter à l'aide du microkit.