

Université de Montréal

Myélogenèse dans la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*

par

Stéphanie Lamoureux

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

Décembre 2001



© Stéphanie Lamoureux, 2001

QH

302

U54

2002

v.007

U

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Myélogénèse dans la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*

présenté par:

Stéphanie Lamoureux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

M Georg Baron
président-rapporteur

Mme Thérèse Cabana
directeur de recherche

M Michel Anctil
membre du jury

Résumé français

Dans le cadre d'une étude sur l'ontogénèse des systèmes moteurs mammaliens, nous avons étudié le développement de la myéline dans les renflements brachial (RB) et lombosacré (LS) de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*, un marsupial qui naît très immature. Les protéines de la myéline MBP et PLP ont été mises en évidence par immunohistochimie en microscopie photonique sur coupes de moelle d'opossums de jour postnatal (P)1 à P113 et d'adultes. L'immunomarquage apparaît dans les funicules ventraux et ventrolatéraux du RB à P11, probablement sur les axones des motoneurones et des voies vestibulospinales et réticulospinales, et, quelques jours plus tard, dans les funicules dorsaux, probablement les afférences primaires se dirigeant vers le noyau cuneatus, puis, vers P21, dans la portion des funicules latéraux contenant les axones réticulospinaux et spinaux ascendants. Vers P24, le marquage apparaît dans la partie interne de la matière blanche où se trouvent les fibres propriospinales, et il y est moins intense que dans la partie périphérique contenant les longues voies ascendantes et descendantes mentionnées. La région dorsolatérale du funicule latéral contenant les axones rubrospinaux est la dernière marquée, vers P45. Le marquage s'intensifie graduellement jusqu'à la 7^e semaine. Le marquage des fibres dans la matière grise du RB apparaît de la 3^e à la 7^e semaine, selon des gradients généraux ventrodorsal et latéromédian. Le marquage pour la myéline dans la matière blanche et dans la matière grise du LS apparaît selon le même patron que dans le RB, mais avec un décalage de quelques jours. Ainsi, la myélogénèse se produit postnatalement dans les renflements spinaux de *M. domestica*. Si on compare à d'autres études sur l'ontogénèse des systèmes

moteurs effectuées au laboratoire, on constate que la myélogénèse dans les renflements de la moelle épinière débute en même temps que dans les racines ventrales et dorsales correspondantes, mais se termine plus tôt, et qu'elle se déroule plus tard que la synaptogénèse dans les renflements spinaux respectifs. Celle-ci est davantage reliée à l'apparition des réflexes sensorimoteurs simples dans les membres, et celle-là, à leur maturation.

Mots-clés: MBP : systèmes moteurs; myéline; ontogénèse; PLP

Résumé anglais

As part of a study on the ontogenesis of mammalian motor systems, we have investigated the development of myelin in the brachial (BR) and lumbosacral (LS) enlargements of the spinal cord in the opossum *Monodelphis domestica*, a marsupial born very immature. The myelin proteins MBP and PLP were localized on spinal cord sections of opossums aged postnatal day (P)1 to P113 and of adults, using immunohistochemistry in light microscopy. Immunolabeling is first detected at P11 in the ventral and ventrolateral funiculi of the BR, presumably on motoneuronal, vestibular and reticular axons, and, a few days later, in the dorsal funiculi, probably on primary afferents ascending to nucleus cuneatus, and then, around P21, in the portion of the lateral funiculi containing reticulospinal and ascending spinal pathways. Around P24, labeling appears in the internal portion of the white matter containing the propriospinal projections, where it is less intense than in the peripheral portion containing the long ascending and descending pathways already mentioned. The area of the rubrospinal tract in the dorsolateral part of the lateral funiculus is the last to be labeled, around P45. Labeling intensity in the white matter increases until the 7th week. Labeling invades the brachial gray matter from the 3th to the 7th week, according to general ventrodorsal and lateromedial gradients. Comparable labeling in the white and the gray matter of the LS develops according to the same pattern as in the BR, but lags by a few days. Thus, myelinogenesis occurs postnatally in the spinal enlargements of *M. domestica*, but it starts and ends earlier than myelinogenesis in the corresponding ventral and dorsal roots, as shown in a previous study. However, myelinogenesis in the spinal enlargements

occurs later than synaptogenesis therein, the latter being correlated to the appearance of simple sensorimotor reflexes in the limbs, and the former, to their maturation.

Key words: MBP; motor systems; myelin; ontogenesis; PLP

Table des matières

Résumé français.....	iii
Résumé anglais.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abbréviations.....	xi
Remerciements.....	xii

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 Comportements locomoteurs: réflexes sensorimoteurs simples et locomotion spontanée.....	5
1.2.3 Développement des centres nerveux moteurs.....	9
1.2.3.1 Moelle épinière.....	10
1.2.3.2 Innervation motrice des membres.....	11
1.2.3.3 Longues voies propriospinales.....	12
1.2.3.4 Système vestibulaire.....	13
1.2.3.5 Voies encéphalospinales.....	15
1.2.3.6 Voies spinalencéphaliques.....	17
1.2.3.7 Synaptogenèse.....	18
1.2.3.8 Myélogenèse.....	19
1.3 Myélogenèse centrale.....	20
1.3.1 Qu'est-ce que la myéline?.....	22
1.3.2 Précurseurs des oligodendrocytes.....	24
1.3.3 Processus et conditions de myélinisation.....	25
1.3.4 Protéines de la myéline.....	26

1.3.4.1 PLP (proteolipid protein).....	26
1.3.4.2 MBP (myelin basic protein).....	27
1.4 Problématique.....	27
1.5 Méthodologie.....	28
1.5.1 Immunohistochimie en microscopie photonique.....	28
1.5.2 Microscopie électronique.....	30
2. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL	
2.1 Contribution de l'étudiant.....	44
2.2 Accord des coauteurs.....	44
2.3 Article:	
Lamoureux S, Gingras J, Cabana T. Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum <i>Monodelphis domestica</i> . (en préparation) sera soumis à Journal of Comparative Neurology.....	45
3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	
3.1 Gradients de formation.....	90
3.2 Myélogénèse et comportements moteurs.....	94
3.3 Avantages et inconvénients de l'utilisation de <i>M. domestica</i>	98
3.4 Perspectives.....	99
4. BIBLIOGRAPHIE.....	101

Liste des figures

- Figure 1:** Photographies d'opossums au début de chacune des quatre périodes du développement locomoteur.....32
- Figure 2:** Schéma du processus de myélinisation de l'axone dans le système nerveux central.....34
- Figure 3:** Photographie d'un axone myélinisé du système nerveux central montrant la région d'un nœud de Ranvier.....36
- Figure 4:** Schéma de la différenciation d'un oligodendrocyte à partir de son précurseur et oligodendrocyte mature en culture.....38
- Figure 5:** Schéma de la localisation des principales protéines de la myéline centrale.....40

Liste des tableaux

Tableau I: Résumé du développement de quelques réflexes sensorimoteurs chez <i>M. domestica</i>.....	42
---	-----------

Liste des abbréviations

ACh: acétylcholine

BR: renflement brachial

C: segment cervical de la moelle épinière

CPG: central pattern generator (générateur de patrons centraux)

E: jour embryonnaire

Fig.: figure

h: heure

i.p.: intrapéritonéale

kDa: kiloDalton

L: segment lombaire de la moelle épinière

LDPP: longues voies propriospinales descendantes

LS: renflement lombosacré

M: molaire

MA: membres antérieurs

MAG: myelin-associated protein

MBP: myelin basic protein

mg: milligramme

mm: millimètre

MP: membres postérieurs

nm: nanomètre

P: jour postnatal

PA: potentiel d'action

PLP: proteolipid protein

SNC: système nerveux central

S: segment sacré de la moelle épinière

T: segment thoracique de la moelle épinière

SNP: système nerveux périphérique

μ m: micromètre

ChAT: choline acetyl transferase

VACHT: vesicular acetylcholine transporter

Remerciements

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

Je voudrais également remercier mes parents et mon frère pour le soutien et l'encouragement qu'ils m'ont apportés.

Je remercie Gilles Cassidy, Jacinthe Gingras, Louise Pelletier et Jean-Luc Verville pour leurs nombreux conseils techniques, indispensables au bon déroulement de cette recherche. Je tiens aussi à remercier Johanne Bessette, Véronique Martel, Marie Chabre et Sandra Duboscq, qui ont collaboré à mon projet, que ce soit dans le cadre d'un cours d'initiation à la recherche ou d'un stage d'été.

Enfin, je remercie mes amis(es) et ma colocataire, pour leur sens de l'humour et leur soutien moral tout au long de mes études.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction

C'est chez les mammifères que les actes moteurs atteignent le plus haut niveau de complexité, si on en juge par le répertoire des comportements moteurs de plusieurs espèces et par la quantité de structures nerveuses impliquées dans leur contrôle. Chez les mammifères adultes, les systèmes moteurs ont généralement été étudiés chez des espèces euthériennes dont la majeure partie du développement du système nerveux se produit *in utero*. Le développement utérin des mammifères pose un sérieux handicap d'accès aux stades précoces. Néanmoins, les euthériens peuvent être divisés en deux groupes quant à leur développement locomoteur: les précoces, qui peuvent supporter leur poids dès la naissance et marcher très tôt par la suite (ex: les ongulés), et les non-précoces, qui n'ont pas cette capacité (ex: les carnivores) (Fox, 1964). C'est effectivement ces derniers, tel que dit, et particulièrement le rat, le chat et quelques espèces de primates, qui ont le plus fait l'objet d'études sur les systèmes moteurs par les neurobiologistes, incluant des études ontogéniques, tant morphologiques que physiologiques. Cependant, s'il est possible d'observer les quelque premiers stades du développement des actes locomoteurs chez les mammifères euthériens non-précoces, on constate que la majorité des centres nerveux qui les contrôlent sont relativement bien formés à la naissance (Lakke, 1997; ten Donkelaar, 1999). L'immaturation comportementale de ces animaux à la naissance est grandement attribuable à l'immaturation de leur système squeletto-musculaire qui, notamment, ne permet pas à

l'animal néonatal de supporter son poids, et non pas tant à l'imaturité de leur système nerveux (Cabana, 2000).

Les mammifères marsupiaux (métathériens), quant à eux, sont beaucoup plus immatures à la naissance que n'importe quelle espèce eutherienne non-précoce, grâce à une gestation plus courte et, donc, à une naissance encore plus précoce. Les membres des nouveaux-nés sont très immatures, tout comme leur système nerveux (Tyncale-Biscoe et Janssens, 1987). Ainsi, pour circonvenir le problème d'accessibilité aux premiers stades du développement des systèmes moteurs que nous voulons étudier, nous utilisons dans notre laboratoire une espèce marsupiale comme modèle expérimental: l'opossum brésilien *Monodelphis domestica* (Didelphidae).

Par sa morphologie et son mode de locomotion, l'opossum brésilien adulte ressemble quelque peu à une grosse souris ou un petit rat. Il est recouvert d'une fourrure gris foncé. Ses yeux sont noirs et proéminents, ses oreilles sont grandes, ses dents sont acérées, et son museau est allongé. La femelle opossum mesure en moyenne 10 cm (excluant la queue), et pèse entre 65 et 110 g. Le mâle, quant à lui, mesure entre 10-15 cm (sans la queue), et pèse entre 100 et 150 g. Les animaux possèdent une queue écailleuse, de longueur légèrement inférieure au reste du corps. Sexuellement mature vers 5 à 6 mois, l'opossum est un animal omnivore et nocturne, solitaire et capable de grimper. La femelle opossum ne possède pas de marsupium et les portées peuvent compter de 8 à 10 petits.

Après seulement 14 à 15 jours de gestation (Fadem et al., 1982; Kraus et Fadem, 1987), l'opossum *M. domestica* naît dans un état de développement peu avancé (Fig. 1A et voir Fig. 1 de l'article: Chapitre 2). La très grande immaturité de cette espèce à la naissance a permis à notre laboratoire ainsi qu'à quelques autres d'étudier postnatalement plusieurs aspects du développement somatique et nerveux, de même que le développement de comportements locomoteurs, comme il est rapporté en détails dans les sections qui suivent. C'est ainsi que mon projet de maîtrise s'inscrit dans le cadre de cette étude de l'ontogenèse des systèmes moteurs des mammifères. Plus spécifiquement, suite à plusieurs études des étapes précoces du développement moteur, un événement relativement tardif du développement, la myélogénèse, a fait l'objet de mon projet. Cet événement se prête bien à des corrélations avec l'ontogenèse des comportements locomoteurs.

1.2 Développement de l'opossum *Monodelphis domestica*

1.2.1 Développement somatique

À la naissance, l'opossum mesure environ 10 mm et pèse approximativement 100 mg (Cassidy et al., 1994). Sa peau nue est ridée et rosée, presque transparente. La tête est grosse par rapport à l'ensemble du corps (le tiers), le museau est bien développé mais dénué de vibrisses. La langue de l'opossum nouveau-né est bien développée, lui permettant ainsi d'exécuter de mouvements de succion, et les gencives sont dépourvues de dents. L'oreille externe n'est pas formée. Les yeux sont clos; il est impossible de deviner la fente qui sera formée par les futures paupières. Les membres antérieurs (MA),

qui seront davantage décrits plus loin, sont juste suffisamment développés pour exécuter des mouvements rythmiques et alternés, lui permettant de grimper sur le ventre de la mère, contre la gravité, afin de s'accrocher à une tétine. Il y a alors fusion des épithélia de la bouche et de la tétine. Quant aux membres postérieurs (MP) du nouveau-né, ils sont à peine plus développés que des bourgeons embryonnaires, incapables de mouvement. La queue de l'opossum est plutôt courte. Au cours des semaines suivantes, les vibrisses commencent à croître, les pinnae se détachent de la peau et la fente des paupières se dessine à la fin de la 2^e semaine. Un léger duvet gris pâle apparaît dans la 3^e semaine. Le pelage de l'opossum acquiert sa couleur gris foncé vers la 5^e semaine. Le canal de l'oreille externe s'ouvre dans la 5^e semaine, tout comme les yeux. Le jeune opossum reste attaché à la mère pendant 3 semaines, après quoi il continue à se nourrir selon ses besoins, pour être sevré entre la 7^e et 8^e semaine postnatale (Cassidy et al., 1994).

Sur coupes histologiques des MA de l'opossum nouveau-né, les rudiments des os sont tous cartilagineux, et de plus en plus immatures distalement. Il en est de même pour les muscles présomptifs, bien formés dans le bras mais immatures distalement. Les fibres apparaissent toutes striées au microscope photonique (Barthélemy et Cabana, 2001a). Les doigts sont bien individualisés et, de toutes les composantes des MA du nouveau-né, ce sont eux qui apparaissent les plus flexibles (Fig. 1A et voir Fig. 1 de l'article: Chapitre 2). Les épaules et les coudes, quant à eux, ne sont pas clairement visibles extérieurement, mais l'opossum nouveau-né exécute néanmoins des mouvements de flexion/extension de faible amplitude, tel que dit. Les MP, à peine

formés, ne possèdent aucune articulation visible. Les rudiments des os des MP du nouveau-né sont cartilagineux, de plus en plus immatures distalement, et les phalanges sont presque entièrement formées de mésenchyme. Les muscles présomptifs sont composés de myofibrilles non-striées entrecoupées de mésenchyme, reconnaissables dans la cuisse, mais davantage immatures plus distalement (Barthélemy et Cabana, 2001a). L'articulation de la hanche devient visible au jour postnatal (P) 2-3, suivie de l'articulation du genou (P4-5) et de la cheville (vers P9). Les premiers mouvements autonomes des MP apparaissent dans la 2^e semaine. Vers la fin de la 2^e semaine postnatale, les orteils sont bien individualisés (Cassidy et al., 1994).

1.2.2 Comportements locomoteurs : réflexes sensorimoteurs simples et locomotion spontanée

Un réflexe est une réponse spontanée et involontaire résultant d'une stimulation sensorielle spécifique. Les réflexes impliquant les membres peuvent être sous contrôle strictement spinal, généralement des réflexes simples (une ou quelques synapses), ou nécessiter l'encéphale, généralement des réflexes complexes (plusieurs synapses). Des réflexes comme le retrait simple ou croisé, l'extension croisée, l'empoignement, le sautiller, etc., communément étudiés chez le rat et le chat (voir Cassidy et al., 1994), ont été étudiés chez l'opossum en développement, car leur degré d'expression est corrélé au degré de maturité des centres nerveux qui les contrôlent (Fox, 1964). De plus, ces comportements moteurs simples entrent dans la composition de comportements moteurs plus complexes comme la locomotion qui, elle aussi, a fait l'objet d'investigations chez

l'opossum. On a ainsi pu constater que les réflexes des membres chez l'opossum apparaissent et se développent après la naissance (Cassidy et al., 1994), tout comme les comportements locomoteurs (Pflieger et al., 1996). Le développement de ces derniers peut se diviser en quatre périodes d'environ 10 jours chacune.

Durant la première période (P1 à P10) (Fig. 1A), l'opossum est attaché à la mère et exécute des mouvements rythmiques et alternés de faible amplitude avec ses membres antérieurs, couplé d'un balancement latéral, rythmique, du tronc. Ce sont ces mêmes mouvements, ajoutés à celui d'empoignement ("grasp") par les doigts, qui lui ont permis de grimper, contre la gravité, sur le ventre de la mère à la naissance. Les membres postérieurs sont immobiles. Si l'animal est détaché de la mère et placé sur une surface plane et rugueuse, il tombe sur le côté, car incapable de supporter son poids sur ses pattes. Aucun réflexe sensorimoteur ne peut être exprimé durant cette période, même l'empoignement qui se produit, mais qui n'est pas en réponse à une stimulation sensorielle.

Pendant la deuxième période (P11 à P20) (Fig. 1B), l'opossum est toujours attaché à la mère, les MA exécutant les mêmes mouvements rythmiques et alternés, mais avec plus de force et d'amplitude. Les membres postérieurs, plus développés, commencent à bouger durant cette période, des mouvements rythmiques de flexion/extension ressemblant quelque peu à ceux des MA. Si on détache l'animal de la mère et qu'on le place sur une surface, il peut supporter son poids avec ses MA, mais pas avec ses MP, et tourne en rond autour de son arrière-train, un mouvement appelé

"pivotement" (Altman et Sudarshan, 1975). Les MP sont donc encore incapables de supporter le poids corporel. Les réflexes de retrait ("withdrawal") et de redressement sur une surface ("body righting on a surface") apparaissent durant cette période.

C'est au début de la troisième période (P21 à P30) (Fig. 1C) que l'opossum commence à se détacher naturellement de la mère. Les MP supportent imparfaitement le poids corporel, les pieds étant positionnés très latéralement par rapport à l'axe du corps, et la locomotion quadrupède linéaire apparaît, par comparaison au pivotement. Elle est lente, ne s'effectue que sur de courtes distances et la coordination entre les membres n'est pas bonne. Le réflexe de sautillerment ("hopping") apparaît durant cette période, d'abord dans les membres antérieurs, puis les membres postérieurs.

À la quatrième période (P31 à P40) (Fig. 1D), l'opossum montre un bon support du poids au niveau des quatre membres et une bonne coordination entre les membres et les ceintures. Durant la 5^e semaine, l'opossum commence à s'aider de sa queue lors des déplacements, sans que cette dernière soit franchement préhensile. L'ouverture des yeux durant cette période, fournissant ainsi à l'animal davantage d'indices sur son environnement, pourrait faciliter la maturation des comportements locomoteurs, surtout en ce qui a trait au support corporel et aux ajustements posturaux. Le réflexe de redressement dans l'air ("air righting") est exprimé à ce moment. La maturation des comportements moteurs se poursuit au delà de cette quatrième période, et ce n'est que vers la 6^e semaine que l'opossum marche de manière bien coordonnée. Tout au long de ce développement, la durée du cycle locomoteur ("step cycle") diminue

significativement. Vers l'âge de 50 jours, le jeune animal tend même à marcher plus rapidement que l'animal adulte, ce qui fait que le cycle locomoteur est temporairement plus court, puis sa durée augmente subséquemment pour atteindre sa valeur adulte moyenne.

Les études de Cassidy et al. (1994) et Pflieger et al. (1996) ont montré que, de manière générale, un gradient antéropostérieur, MA-MP, caractérise l'ordre de maturation des réflexes et des comportements moteurs. Également, les réflexes simples des MP semblent obéir à un gradient proximodistal. En effet, le réflexe de retrait, impliquant une flexion du genou, atteint sa maturité avant le réflexe d'empoignement ("grasp"), qui nécessite une flexion de tous les orteils et du pied. Tel gradient semble moins clair pour les MA, où les doigts sont capables d'empoignement dès la naissance, bien que pas de façon réflexe, tel que mentionné. Ce comportement pourrait être généré par un centre générateur de patrons moteurs (CPG) durant les deux premières semaines, pour devenir ensuite modulé par les inputs sensoriels. Les réflexes impliquant une seule ceinture, comme l'extension croisée des MA, se développent plus tôt que ceux impliquant les deux ceintures, comme la longue extension croisée nécessitant les MA et les MP. Enfin, les réflexes simples apparaissent avant les réflexes complexes modifiés par les centres supérieurs, comme les réflexes de redressement, surtout celui dans les airs. Cependant, le géotactisme négatif, un réflexe du système vestibulaire, est présent dès la naissance et permet à l'opossum naissant de se diriger contre la gravité vers une tétine maternelle. Ce réflexe n'est pas mentionné dans l'étude de Cassidy et al. (1994).

Le Tableau I résume l'apparition et le développement de quelques réflexes sensorimoteurs simples.

1.2.3 Développement des centres nerveux moteurs

La locomotion est tout d'abord un mécanisme intraspinal (Grillner, 1975). Elle est en partie contrôlée par les CPG ("central pattern generators"), circuits composés de neurones et ayant leur rythme propre, semblables aux cellules "pacemaker" du cœur. Ces cellules sont situées rostralement dans les renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière des quadrupèdes et permettent les mouvements rythmiques et alternés typiques à la locomotion. Les centres encéphaliques qui agissent directement sur la moelle épinière des mammifères, tels que la formation réticulée, le complexe vestibulaire, le noyau rouge et le cortex sensorimoteur (voir 1.2.3.5), ainsi que les afférences primaires, apportent, entre autres, les modifications nécessaires pour que la locomotion soit adaptée à l'environnement et à l'état de l'animal (Grillner, 1975). Le cervelet, dont on a fait mention dans la discussion des réflexes, ainsi que d'autres centres encéphaliques non reliés directement à la moelle épinière, modulent aussi la locomotion. Jusqu'à présent, le laboratoire ne s'est pas encore intéressé à ces derniers.

Des observations macroscopiques et microscopiques, ainsi que des expériences de traçage neuronal et d'immunohistochimie, ont permis de mettre en évidence le développement de plusieurs centres nerveux moteurs chez l'opossum *M. domestica*. Nous décrirons ces études en débutant par la moelle épinière, qui est le cœur de nos

études, et l'innervation motrice des membres. La formation des connexions de la moelle épinière avec l'encéphale, les voies tant descendantes qu'ascendantes, sera ensuite rapportée. La synaptogenèse dans les renflements de la moelle et la myélogénèse périphérique seront aussi résumées. Toutes ces études mettent en contexte le projet décrit dans ce mémoire et qui porte sur la myélogénèse centrale, dans les renflements de la moelle épinière.

1.2.3.1 Moelle épinière

La moelle épinière des mammifères est fragmentée en plusieurs divisions axiales, dont deux qui nous intéressent plus particulièrement: le renflement brachial (BR), qui innerve les membres antérieurs de l'animal, et le renflement lombosacré (LS), qui innerve les membres postérieurs. Ces renflements jouent un rôle important dans le contrôle de la locomotion. La moelle épinière est très immature chez l'opossum nouveau-né. Une fois sortie de la colonne vertébrale, la moelle épinière mesure 0.85 cm de long à P1 (9 cm chez le mâle adulte) et son diamètre est de 0.65 cm au niveau du BR (3.3 cm chez l'adulte) contre 0.50 cm au niveau du LS (3.2 cm chez l'adulte). Sur coupes histologiques colorées pour la substance de Nissl, on observe un gros canal épendymaire allongé dorsoventralement. Une épaisse zone ventriculaire le tapisse, recelant des figures mitotiques, particulièrement au niveau du LS. Une épaisse zone intermédiaire (matière grise présomptive), elle-même entourée d'une mince zone marginale (matière blanche présomptive), complètent le tout. La forme ovoïde ou fusiforme de plusieurs cellules des zones ventriculaire et intermédiaire subodore une activité de migration de

leur site de production vers leur position définitive. Dans la zone intermédiaire, les petits neuroblastes, non différenciés, sont en densité élevée. On distingue néanmoins des motoneurones présomptifs, par leur localisation dans la corne ventrale et leur taille légèrement supérieure à celle des autres cellules. Deux gradients généraux caractérisent le développement de la moelle épinière: un gradient rostrocaudal, donc le BR commence à se développer avant le LS, et un gradient ventrodorsal, où, dans un renflement donné, la plaque basale, à fonction surtout motrice, se développe avant la plaque alaire, à fonction davantage sensorielle.

1.2.3.2 Innervation motrice des membres

Les systèmes impliqués dans le contrôle de la locomotion agissent de manière directe ou indirecte sur les motoneurones (Vinay et al., 2000). Ces motoneurones projettent leurs axones dans les muscles, permettant leur contraction. Ainsi, le développement de ces projections périphériques a été étudié, posant comme hypothèse qu'au moins un certain nombre d'axones moteurs doit croître dans les membres et innover les muscles postnatalement, si l'on considère l'immaturation des membres et de la moelle épinière de l'opossum à la naissance, et plus particulièrement les MP et le LS. L'innervation motrice des membres a été investiguée en dévoilant le neurotransmetteur des motoneurones, l'acétylcholine (ACh). Plus précisément, la ChAT (choline acetyltransferase), l'enzyme de synthèse de l'ACh, et la VACHT (vesicular ACh transporter), la protéine de transport de l'acétylcholine nouvellement synthétisée, ont été mises en évidence dans les renflements spinaux et les membres, respectivement, par

immunohistochimie en microscopie photonique (Barthélemy et Cabana, 2001a, b). Il résulte de ces expériences que le développement de l'innervation motrice des MA et MP se produit majoritairement postnatalement chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Il existe d'abord un gradient rostrocaudal, c'est-à-dire que les MA sont innervés avant les MP. Ce gradient, mis en évidence par le gradient de développement de l'expression des protéines cholinergiques, peut être corrélé au gradient de développement des comportements locomoteurs chez *M. domestica* (Pflieger et al., 1996). Un second gradient proximodistal du développement de la VAcHt dans les membres indique que les muscles sont innervés selon l'ordre dans lequel ils sont formés (Barthélemy et Cabana, 2001a, b).

1.2.3.3 Longues voies propriospinales

Il existe chez les mammifères de longues voies propriospinales descendantes (LDPP), qui relient les segments cervicaux aux segments lombosacrés. Ces voies sont responsables de la coordination entre la tête et les membres antérieurs et postérieurs, et elles connectent les CPG des deux renflements spinaux, permettant ainsi la coordination entre les deux ceintures durant la locomotion (Miller, 1970; Grillner, 1975). Certains neurones seraient impliqués dans la synchronisation des CPG; cela semble le cas de neurones des segments C3 et C4, qui reçoivent d'importantes projections des centres moteurs encéphaliques (Ilert et al., 1978; Alstermark et al., 1987a, b).

Tel que dit, les MP ne démontrent aucun mouvement autonome avant la deuxième semaine et leur coordination avec les MA apparaît bien plus tard, suggérant que les LDPP ne sont pas encore formées à la naissance chez l'opossum, qu'elles se développeraient plutôt postnatalement. Cette hypothèse a été confirmée par Cassidy et Cabana (1993), qui ont démontré que les seules LDPP présentes dans le LS du nouveau-né proviennent de quelques neurones des laminae présomptives VII et VIII du BR. Ces laminae sont à l'origine de la majorité des LDPP chez les mammifères adultes. La croissance de la majorité des LDPP s'effectue dans le LS au cours des deux semaines postnatales suivantes, dont 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. Les projections provenant des segments cervicaux plus rostraux sont les dernières à atteindre le LS. La formation des LDPP vers le LS s'effectue donc selon un gradient proximodistal. Le patron adulte de projections des LDPP vers le LS est acquis vers P17.

1.2.3.4 Système vestibulaire

L'orientation (position) de la tête, la posture et l'équilibre du corps au repos et pendant les mouvements (ex: locomotion) sont, entre autres, sous le contrôle du système vestibulaire, qui comprend le labyrinthe vestibulaire de l'oreille interne, le complexe vestibulaire situé dans le tronc cérébral, et des centres situés à un niveau supérieur, tels que le thalamus, le cervelet et le cortex. L'utricule et le saccule, percevant l'accélération linéaire, ainsi que les canaux semicirculaires, percevant l'accélération angulaire, forment le labyrinthe vestibulaire. Ces structures sont tapissées d'un épithélium simple

cylindrique cilié et de concrétions calcaires appelées otolithes. Ces dernières stimulent les cellules ciliées en rapport avec les mouvements de l'animal. Quatre noyaux principaux se retrouvent dans le complexe vestibulaire: le supérieur, le médian, le latéral et l'inférieur. Ces noyaux sont reliés au système oculomoteur (sauf le noyau vestibulaire supérieur) et à la moelle épinière, où leurs influences sont directes et rapides (Wilson et Melvill-Jones, 1979; Lacour et Borel, 1993).

Chez l'opossum nouveau-né, le système vestibulaire tiendrait un rôle important. En effet, nous avons vu qu'à la naissance, l'opossum grimpe sur le ventre de la mère, assise sur son arrière-train, afin d'atteindre une tétine, et cela, contre la gravité et sans l'aide de la mère. Cette locomotion antigravitaire est probablement guidée par le système vestibulaire qui influencerait les mouvements du cou et des MA. En effet, le système vestibulaire, dit système direct, est mieux développé à la naissance (voir ci-bas) que le système olfactif (Brunjes et al., 1992), dit système indirect.

Les principales composantes du labyrinthe vestibulaire de l'opossum nouveau-né sont néanmoins très immatures (Pflieger et Cabana, 1996). L'utricle possède une macula composée de cellules ciliées présomptives et une membrane otolithique, mais pas les autres composantes du labyrinthe vestibulaire. Des figures mitotiques sont observées partout, surtout dans l'épithélium des canaux semicirculaires. Par traçage axonal, Pflieger et Cabana (1996) ont pu distinguer les deux branches du nerf vestibulaire, l'une ascendante et l'autre descendante, qui se distribuent vers les quatre noyaux vestibulaires du tronc cérébral. Cependant, seul le noyau latéral est facilement

identifiable sur coupes de Nissl, plus particulièrement où le nerf vestibulaire pénètre dans le tronc cérébral. Le reste du complexe vestibulaire est peu développé à la naissance. En effet, les trois noyaux restant ne sont pas encore bien distincts de la zone ventriculaire du 4^e ventricule qui renferme des figures mitotiques; leurs cellules sont petites et indifférenciées, plusieurs semblent en migration. Les limites des noyaux sont diffuses. Le nerf VIII envoie des fibres dans tous les quatre noyaux du complexe vestibulaire chez l'opossum nouveau-né (Pflieger & Cabana, 1996).

Vu l'immaturation considérable du saccule et des canaux semicirculaires à la naissance, il est possible que toutes les structures du labyrinthe ne soient pas fonctionnellement connectées aux noyaux vestibulaires; peut-être que seul l'utricule l'est. Le développement des projections du complexe vestibulaire à la moelle épinière est résumé ci-bas. Une étude de la myélogénèse dans le labyrinthe vestibulaire et le complexe vestibulaire est en cours.

1.2.3.5 Voies encéphalospinales

On a vu que les projections propriospinales reliant le LS aux segments supérieurs de la moelle épinière se forment en grande partie postnatalement. Or, comme la plus grande partie de l'encéphale se développe plus tardivement que la moelle, cela suggère que les voies nerveuses qui le relient à la moelle épinière, plus longues, qu'elles soient ascendantes ou descendantes, se forment certainement aussi en grande partie postnatalement, et probablement plus tard ou durant une plus longue période que les

LDPP. Tel qu'expliqué dans la section précédente, au moins une portion des afférences du complexe vestibulaire semblent suffisamment développées pour transmettre l'input sensoriel au complexe vestibulaire, surtout le noyau latéral. Pflieger et Cabana (1996) ont de plus montré qu'au moins une partie de la voie vestibulospinale latérale, prenant naissance dans le noyau vestibulaire latéral et se terminant dans les segments cervicaux de la moelle épinière, responsables du contrôle des mouvements de la tête et du cou, est établie à la naissance. Suivent les projections en provenance du noyau inférieur et celles du noyau médian (le noyau vestibulaire supérieur ne projette pas d'axones à la moelle épinière). La série d'expériences précédentes de traçage neuronal a également mis en évidence des projections du raphé et de la formation réticulée médiane médullaire à la moelle cervicale chez l'opossum nouveau-né, et les travaux de Desrosiers (1995) ont documenté de pareilles projections, quoique plus modestes, à la moelle lombosacrée.

L'étude de Wang et al. (1992) a démontré un gradient général proximodistal au cours du développement subséquent des projections du tronc cérébral à la moelle chez *M. domestica*. Ainsi, les voies d'origine médullaire, en partie présentes prénatalement dans la moelle, atteignent celle-ci avant les voies d'origine pontique, formées durant les trois premières semaines de vie postnatale, qui elles se forment avant celles d'origine mésencéphalique. Le nombre d'axones formant chacune de ces voies continue d'augmenter après la 3^e semaine.

Notons que chez l'opossum *M. domestica* adulte comme en développement, les axones du cortex cérébral 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). Ces axones n'exercent donc aucun contrôle direct sur la moelle épinière, mais seulement indirectement, via leurs projections aux structures motrices du tronc cérébral, cibles qui sont atteintes à partir de la 4^e semaine postnatale.

1.2.3.6 Voies spinoencéphaliques

Pour que les centres moteurs encéphaliques modulent adéquatement les centres locomoteurs de la moelle épinière, ils doivent recevoir un input de celle-ci les renseignant sur son activité et sur l'environnement, la périphérie (ex: surface de marche glissante ou rugueuse, droite ou en pente, degré d'étirement musculaire, etc.). Les informations de la périphérie sont apportées à la moelle ou au tronc cérébral par les afférences primaires qui se terminent dans la moelle ou montent aux noyaux gracilis et cuneatus par les cordons dorsaux (funicules gracilis et cuneatus), prenant origine des ganglions de la racine dorsale. Les voies spino-olivaires, spinoréticulaires, spinothalamiques et spinocérébelleuses, occupant la portion externe du funicule latéral, acheminent l'information sur l'état d'activité de la moelle même.

L'utilisation de traceurs neuronaux a permis de documenter chez l'opossum nouveau-né la présence d'axones provenant du LS dans les funicules ventrolatéraux présomptifs tout au long de la moelle épinière et jusqu'à la jonction spinomédullaire (Desrosiers, 1995). Ce n'est que postnatalement, à partir de P3, que ces axones, et tous ceux marqués après eux, atteignent leurs différentes cibles encéphaliques, selon un

gradient caudorostral (proximodistal), le cervelet étant toutefois la dernière structure desservie par les axones spinaux (Qin et al., 1993). Le développement du fascicule gracilis est décalé de quelques jours sur celui du fascicule cuneatus (Desrosiers, 1995; voir aussi Knott et al., 1999).

1.2.3.7 Synaptogenèse

Les expériences de traçage neuronal ci-devant résumées ont indiqué à quel moment les fibres nerveuses composant les différents systèmes de contrôle moteur atteignent leurs cibles. Même si on peut présumer que les fibres nerveuses établissent des contacts synaptiques avec leurs cibles dès qu'elles les atteignent, il existe plusieurs systèmes où un délai considérable entre l'atteinte d'une cible et la synaptogenèse a été documenté. Pour nous en tenir à l'ontogenèse des systèmes moteurs des marsupiaux, mentionnons en guise d'exemple le cas des fibres néocorticales qui pénètrent le noyau rouge environ deux semaines après l'avoir atteint chez l'opossum *Didelphis virginiana* (Cabana et Martin, 1986). C'est pourquoi des études sur la synaptogenèse ont été effectuées chez *M. domestica*, pour démontrer avec plus de certitude l'établissement des connexions synaptiques avec ces cibles, en commençant par les renflements de la moelle épinière.

La mise en évidence de trois protéines synaptiques par immunohistochimie en microscopie photonique a révélé que la synaptogenèse se produit en grande partie postnatalement, en particulier dans le LS (Gingras et Cabana, 1999). Quelques rares

synapses immatures sont corroborées en microscopie électronique, probablement sur des dendrites de motoneurones présomptifs, dans le gris ventrolatéral et ventromédian du BR et du LS à P1. La synaptogenèse dans la moelle épinière de *M. domestica* s'effectue selon trois gradients généraux (pas absolus): un premier rostrocaudal, un deuxième ventrodorsal et un dernier latéromédian, et correspond à la croissance des principales voies motrices étudiées précédemment (Gingras et Cabana, 1998, 1999). Le gradient de synaptogenèse dans la matière grise suggère que les différents systèmes descendants établiraient des contacts synaptiques plus tôt ou en plus grand nombre sur les neurones innervant les muscles distaux que sur ceux innervant les muscles proximaux, sauf pour la voie vestibulaire latérale, précoce (voir 1.2.3.5), qui innerve surtout la région médiane du gris spinal. Les réflexes décrits précédemment et la locomotion spontanée apparaissent au moment où la synaptogenèse atteint son intensité maximale. Cependant, la maturation de ces fonctions tarde considérablement par rapport à la formation des substrats nerveux. En effet, les fonctions motrices ne dépendent pas uniquement de la formation des voies qui les contrôlent, c'est-à-dire la croissance axonale, et de l'établissement de connexions fonctionnelles entre ces voies, la synaptogenèse, mais aussi du développement de la myéline autour des fibres nerveuses, la myélinogenèse, myéline qui augmente considérablement la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

1.2.3.8 Myélogenèse

C'est ainsi que l'étude de la myélogenèse a été entreprise, dans un premier temps, celle des fibres périphériques motrices et sensorielles des racines ventrale et

dorsale aux niveaux des renflements de la moelle C8 et L4 (Leblond et Cabana, 1997). Le décompte de toutes les fibres myélinisées de ces racines a dévoilé que la myélogénèse périphérique s'effectue postnatalement chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Les premières fibres myélinisées sont détectées vers P8 dans les racines ventrales de C8 et vers P10 dans les racines dorsales, et seulement vers P13-15 dans les racines ventrales et dorsales au niveau L4. La myélinisation s'effectue donc selon deux gradients: un premier rostrocaudal, les racines de C8 se myélinisant avant celle de L4, et un second ventrodorsal, la racine ventrale avant la racine dorsale, à un segment donné. Le nombre de fibres périphériques myélinisées augmente jusqu'à la 7^e semaine, où on y rapporte même une surproduction par rapport au nombre retrouvé chez l'adulte. Ce nombre diminue pour atteindre le nombre retrouvé chez l'adulte vers trois mois. Le diamètre des fibres (incluant la myéline), motrices comme sensorielles, augmente tout au long de ces trois mois. La myélogénèse est particulièrement intense de la 4^e à la 8^e semaine, après l'apparition et la maturation de la plupart des réflexes sensorimoteurs. Mentionnons le plus grand nombre de fibres myélinisées dans les racines de L4 que dans celles de C8, possiblement parce que la masse musculaire des MP est plus importante.

1.3 Myélogénèse centrale

Toutes ces études qui viennent d'être résumées montrent que la presque totalité du développement de la motricité des membres, de la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs, de la coordination entre ces derniers, le tronc et la tête, ainsi que le développement des réflexes sensorimoteurs simples et des mouvements spontanés

plus complexes, telle que la locomotion, s'effectue postnatalement chez l'opossum, et que la formation d'un grand nombre de voies nerveuses centrales et périphériques impliquées dans le contrôle moteur se déroule aussi, en partie ou entièrement, postnatalement. Même la synaptogenèse dans la moelle épinière, et, plus spectaculairement, dans les membres, se produit en grande partie après la naissance. C'est ainsi que nous nous attendons à ce que la myélogénèse au niveau des renflements de la moelle épinière se produise postnatalement, et probablement encore plus tardivement que celles des racines périphériques, vu qu'elle ne concerne pas des voies primaires qui se forment tôt, mais des voies secondaires ou plus, qui se forment encore plus tard.

La myélogénèse est définie comme l'étape du développement nerveux où les cellules gliales myélinisantes (cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique, oligodendrocytes dans le système nerveux central) s'enroulent autour des axones pour former la gaine de myéline (Fig. 2). La myélogénèse fait donc partie intégrante de la formation des voies nerveuses et contribue, par le fait même, à la maturation des comportements moteurs. Cette étude sur la myélogénèse au niveau des renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica* sera donc mise en corrélation avec les études déjà réalisées au laboratoire sur l'acquisition des réflexes sensorimoteurs et des comportements complexes comme la locomotion, afin de comprendre davantage le développement et la maturation de ces derniers.

1.3.1 Qu'est-ce que la myéline?

Décrite pour la première fois par des histologistes qui ont remarqué une substance blanchâtre autour des fibres de nerfs périphériques observées au microscope photonique, la myéline a été qualifiée de "gaine de myéline" (Virchow, 1854, dans Morell, 1984). On parle ici d'une gaine dans le sens d'une enveloppe qui recouvre une fibre nerveuse. L'hypothèse selon laquelle la myéline était constituée de lipides, principalement à cause de sa couleur blanchâtre et de sa réaction aux préparations histologiques, a été confirmée par l'utilisation de la microscopie à lumière polarisée (Schmidt, 1936, dans Bischoff et Thomas, 1984).

La myéline est constituée de plusieurs enroulements membranaires. Dans le système nerveux central, ces enroulements sont formés par les prolongements membranaires d'oligodendrocytes, une membrane riche en lipides (Compston et al., 1997). Un oligodendrocyte émet plusieurs prolongements qui peuvent myéliniser plus d'un axone et un axone donné est myélinisé par les prolongements de plusieurs oligodendrocytes différents. Chaque prolongement membranaire s'enroule maintes fois autour d'un segment de fibre nerveuse et les lamelles de membrane deviennent compactes. Ces segments de lamelles de membrane forment ensemble la myéline. Celle-ci n'est donc pas continue sur toute la longueur d'une fibre nerveuse, mais interrompue à intervalles réguliers. Chaque segment myélinisé d'un axone se nomme "segment internodal" ou "internoeud" (Fig. 2). Chaque espace interrompant la gaine de myéline, où la fibre nerveuse est nue, s'appelle nœud de Ranvier, nommé d'après Louis Ranvier

(1871), qui le décrit comme étant un "étranglement annulaire, de forme élégante" (Fig. 3). La microscopie électronique a confirmé la structure multilamellaire de la myéline, formée par des prolongements spiralés s'étendant à partir du corps cellulaire d'un oligodendrocyte (Bunge, 1968). La fibre nerveuse couverte de myéline est électriquement isolée, sauf aux endroits dénudés que constituent les nœuds de Ranvier, ce qui permet au potentiel d'action parcourant les axones de "sauter" d'un nœud à l'autre le long de la fibre myélinisée. Ce phénomène, appelé "conduction saltatoire", permet aux fibres nerveuses de conduire le courant rapidement comparativement aux fibres dépourvues de myéline (Zigmond et al., 1999). La myéline fonctionne comme un isolant, en prévenant la perte de courants ioniques à travers la membrane axonale, ce qui facilite la conduction de l'influx nerveux électrique (Umemori et al., 1999). L'épaisseur de la gaine de myéline et la longueur des segments internodaux sont proportionnelles au diamètre (et à la longueur) de la fibre nerveuse. Ainsi, les très grosses fibres nerveuses sont fortement myélinisées et, de ce fait, conduisent l'influx nerveux extrêmement rapidement, pouvant aller jusqu'à 100 m/sec, comparativement à une conduction de 1 m/sec pour les fibres non myélinisées (Bischoff et Thomas, 1984).

Les lipides forment 70% de la myéline, dont la composante majeure, les phospholipides, en constituent 45% et le cholestérol, 25% (Norton et Cammer, 1984). Les phospholipides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux des oligodendrocytes et sont incorporés par la suite dans la membrane de la myéline en formation (Freysz et Horrocks, 1980). Les protéines ont une place considérable dans la constitution de la myéline (30%) et comprennent la galactocérobroside, la MAG

(myelin-associated glycoprotein), la MBP (myelin basic protein) et la PLP (proteolipid protein) (Dubois-Dalcq et al., 1986). Nous y reviendrons plus tard.

1.3.2 Précurseurs des oligodendrocytes

Les oligodendrocytes se développent à partir de cellules gliales progénitrices connues sous le nom de précurseurs O-2A (Raff, 1989; Richardson et al., 1990; Pfeiffer et al., 1993) (Fig. 4A et B). Dans la moelle épinière du rat embryonnaire, Yu et al. (1994) ont démontré que la lignée des oligodendrocytes trouvait son origine d'un site spécifique de la zone ventriculaire ventrale, vers E14. Des précurseurs des oligodendrocytes migrent dans la moitié dorsale, quelques jours plus tard. Les précurseurs O-2A se transforment en pro-oligodendrocytes, ou précurseurs O4, sous l'effet du facteur de croissance PDGF (platelet-derived growth factor) (Dubois-Dalcq et Armstrong, dans Martenson, 1992; Compston et al., 1997) (Fig. 4A et B). Cette observation chez le rat peut prendre une importance capitale chez l'opossum. En effet, si le développement prénatal de ce dernier est comparable à celui du premier, un rat de jour embryonnaire (E) 14 correspondrait à un opossum de P1. Ceci implique que la majorité, sinon la totalité, des oligodendrocytes seraient produits postnatalement dans la moelle épinière de l'opossum et, conséquemment, la myéline aussi, renforçant l'hypothèse émise plus tôt (voir section 1.3).

1.3.3 Processus et conditions de myélinisation

Plusieurs conditions ou situations doivent être respectées pour que le processus de myélinisation ait lieu. En fait, la myélinisation des axones dans le système nerveux des vertébrés représente une adaptation fonctionnelle résultant d'interactions complexes entre neurones et cellules gliales. Ces conditions concernent le diamètre de l'axone, la taille de l'oligodendrocyte, la présence de facteurs dans l'environnement (Colello et Pott, 1997), l'état électrique de l'axone (Gyllensten et Malmfors, 1963; Tauber et al., 1980; Demerens et al., 1996), les molécules de surface cellulaire et de la matrice extracellulaire (Bartsch et al., 1993). Pour l'oligodendrocyte, ceci correspond au moment où, une fois élaborées dans le cytoplasme, les protéines constitutives de la myéline sont insérées dans la membrane (Raine, dans Morell, 1984). L'élaboration de la myéline requiert donc une synthèse à grande échelle de lipides spécifiques à la myéline et de protéines associées aux membranes, qui jouent des rôles spécifiques dans l'enroulement spiralé et le compactage des lamelles de membrane (Pfeiffer et al., 1993; Campagnoni, 1995). On sait que l'oligodendrocyte est capable de produire de la myéline en l'absence d'axones (Lubetzki et al., 1993), indiquant que la production de myéline n'est pas déclenchée par un stimulus provenant de la fibre nerveuse. Un diamètre axonal minimal est requis pour qu'une fibre soit myélinisée (Duncan, 1934; Peters et Vaughn, 1970; Voyvodic, 1989). En deçà d'environ 5 μm , les fibres ne sont pas myélinisées, bien que protégées par leurs cellules gliales de soutien. Les axones qui seront les plus gros sont les premiers à être myélinisés, suivis progressivement des plus petits.

1.3.4 Protéines de la myéline

Comme il a été dit précédemment, les protéines comptent pour 30% de la composition de la myéline. La PLP et la MBP forment ensemble de 60 à 80% du contenu protéique de la myéline centrale (Kandel et al., 2000), la PLP étant la plus abondante (environ 50%) (Yu et al, 1994; Compston et al., 1997). Nous décrivons ici quelques-unes des caractéristiques de ces protéines qui, une fois mises en évidence en microscopie photonique par le biais de l'immunohistochimie, nous ont permis d'étudier la myélogénèse dans la moelle épinière de l'opossum *M. domestica*.

1.3.4.1 PLP (proteolipid protein)

Spécifique à la myéline centrale des vertébrés supérieurs, la PLP est une protéine membranaire intrinsèque de 23.5 kDa qui se retrouve à la face extracytoplasmique de la membrane (Kandel et al., 2000) (Fig. 5). La PLP est synthétisée sur les ribosomes liés à la membrane dans le corps cellulaire de l'oligodendrocyte (Colman et al., 1982), pour ensuite être transportée dans les prolongements de l'oligodendrocyte. Dans la myéline, elle pourrait participer à la translocation d'ions afin de maintenir l'équilibre ionique entourant l'axone (Lees et Bizzozero, dans Martenson, 1992). Elle joue aussi un rôle dans l'assemblage et le compactage de la myéline, où elle formerait des jonctions membranaires stabilisantes dans la myéline, entre deux lamelles de membrane, le tout semblable à une "fermeture-éclair" (Brophy et al., 1993; Compston et al., 1997;

Klugmann et al., 1997; Nadon et West, 1998). (Fig. 5). Plusieurs études sont actuellement en cours afin de préciser la nature et les rôles plus complexes de la PLP.

1.3.4.2 MBP (myelin basic protein)

La MBP est localisée à la face cytoplasmique de la membrane plasmique de l'oligodendrocyte (Readhead et al., 1987; Kamholz et Wrebetz, dans Martenson, 1992; Brophy et al., 1993), formant une ligne dense caractéristique et bien visible en microscopie électronique (Lemke, 1988; Martini et al., 1995) (Fig. 5). Durant les étapes précoces de la myélinisation, la MBP se trouve seulement dans le corps cellulaire de l'oligodendrocyte, mais elle est transportée dans les prolongements de la cellule quand la myéline se forme (Zeller et al., 1985; Amur-Umarjee et al., 1990; Alliquant et al., 1991). La MBP serait requise pour l'adhésion membranaire intracellulaire. Un rôle essentiel de la MBP est le compactage des lamelles de membranes formant l'éventuelle gaine de myéline dans le SNC. La MBP joue ainsi un rôle à différentes étapes de la formation des prolongements d'oligodendrocytes et de la myéline (Dyer et Benjamins, 1989; Wilson et Brophy, 1989).

1.4 Problématique

La grande majorité des comportements locomoteurs apparaissent postnatalement et atteignent leur maturité tard et sur une longue période de temps chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe un

délai notable entre l'apparition et la maturation de ces comportements et la formation de la plupart des voies de contrôle moteur. Les études de synaptogenèse ont établi une certaine corrélation entre la formation de ces voies et l'apparition des réflexes et certains comportements moteurs, mais, tel que dit, la synaptogenèse se déroule relativement tôt par rapport aux comportements et sur une période de temps plus courte. Par contre, nous avons vu que les comportements locomoteurs sont exprimés alors que seulement une faible proportion de fibres périphériques sont myélinisées et quand elles ne le sont qu'incomplètement, et ces comportements semblent matures bien avant l'achèvement de la myélogenèse périphérique. Nous tentons ici de voir si la myélogenèse dans les renflements brachial (BR) et lombosacré (LS) de la moelle explique mieux la maturation de ces comportements. Ainsi, nous avons tenté de déterminer quand commence la formation de la myéline à chaque niveau pour décrire son développement subséquent, et de corréler ces résultats avec ce qui est ressorti d'études antérieures sur la formation des voies nerveuses et le développement des comportements. Nous avons procédé en utilisant une technique d'immunohistochimie en microscopie photonique qui a permis de déterminer la distribution spatiale de la MBP et de la PLP tout au long du développement postnatal de l'opossum *M. domestica*.

1.5 Méthodologie

1.5.1 Immunohistochimie en microscopie photonique

Un total de 54 opossums âgés de jour postnatal (P)1 à P113 ainsi que 2 adultes ont été utilisés. Les opossums de P1 à P75 ont été profondément anesthésiés par

inhalation de Metofane, et les autres par injection intrapéritonéale d'une surdose de pentobarbital de sodium (Somnotol). Une laminectomie a été effectuée pour exposer l'ensemble de la moelle épinière. Le BR et le LS ont été prélevés et embloqués individuellement, sans fixation ni cryoprotection, pour être congelés et conservés à -80°C. Les renflements ont été tranchés en coupes sérielles (30 µm) au cryostat. Ces coupes ont été montées sur des lames de verre préalablement enduites de poly-L-lysine et traitées par immunohistochimie (MacLaren, 1996) pour révéler la présence des deux protéines.

Toutes les étapes de mise en évidence de la MBP ont été effectuées à 4°C. La mise en évidence de la PLP s'est effectuée à la température ambiante, sauf la fixation, qui a eu lieu à 4°C. Pour la détection de la MBP, les coupes ont été fixées dans une solution de 95% éthanol/5% acide acétique glacial et exposées à un anticorps monoclonal contre la MBP pendant 24 h (Boehringer-Mannheim). Pour la détection de la PLP, les coupes ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% et exposées 1 h à un anticorps polyclonal contre la PLP (gracieusement fourni par le Dr KA. Nave, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, Allemagne). Par la suite, les coupes, que ce soit pour mettre en évidence la MBP ou la PLP, ont été traitées avec un anticorps secondaire (anti-mouse/rabbit, Vector Laboratories), pour ensuite être exposées au complexe avidine-biotine (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) pendant 1 h. La visualisation de la MBP et de la PLP sur les coupes s'est faite à l'aide de chromogènes, soit le VIP (Vector Laboratories), qui produit un précipité mauve, ou encore le DAB (diaminobenzène, Sigma), qui produit un précipité brun. Le temps de révélation était en fonction de l'âge de l'animal, le temps le plus long pour l'animal le

plus jeune. De plus amples détails méthodologiques se retrouvent dans la partie "Materials and methods" de l'article, présenté dans le Chapitre 2.

Les coupes préparées pour l'immunohistochimie ont été observées en microscopie photonique. Des schémas des coupes réalisées à la caméra lucida, sur lesquelles le marquage a été enregistré, nous ont permis d'évaluer la distribution spatio-temporelle de ces protéines dans les principales voies nerveuses. Des photographies ont été réalisées de coupes ou parties de coupes choisies.

1.5.2 Microscopie électronique

Du total des animaux utilisés pour les expériences précédentes, 6 l'ont aussi été pour la microscopie électronique. En fait, lorsque les renflements ont été prélevés, une petite section de BR et de LS a été tranchée et fixée immédiatement par immersion complète dans une solution de 2.5% glutaraldéhyde/tampon cacodylate 0.1 M (pH 7,4) à 4°C pendant 2 heures. Ces tranches ont été rincées toute la nuit dans un tampon cacodylate 0.1 M et postfixées 2 heures dans une solution de 2% OsO₄/tampon cacodylate 0.1 M (pH 7,4) à 4°C. Elles ont par la suite été rincées pendant 45 minutes dans l'eau distillée, immergées 1 heure dans une solution de 1% d'acétate d'uranyle, pour être déshydratées dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante. La transition entre l'éthanol et l'Épon s'est fait graduellement, dans un mélange éthanol-Épon, suivi de l'Épon seulement, des bains de 30 minutes chacun. Finalement, les

morceaux ont été enrobés dans l'Épon extemporané et polymérisés 24 heures à 60°C (protocole tiré et modifié de Balslev et al., 1992) pour la même espèce.

Des coupes semi-fines (0.5 µm) et ultra-fines (100-120 nm) ont été effectuées à l'ultramicrotome, contrastées à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb, pour ensuite être observées et photographiées au microscope électronique à transmission (JEOL JEM 100S).

La microscopie électronique a permis d'apporter des informations supplémentaires sur l'aspect anatomique de la gaine de myéline à certains âges du développement.

Figure 1

Photographies d'opossums au début de chacune des quatre périodes du développement locomoteur: P1 (A), P13 (B), P21 (C) et P32 (D). (tiré de Pflieger et al., 1996).

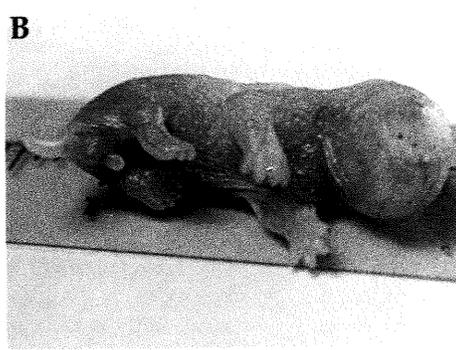
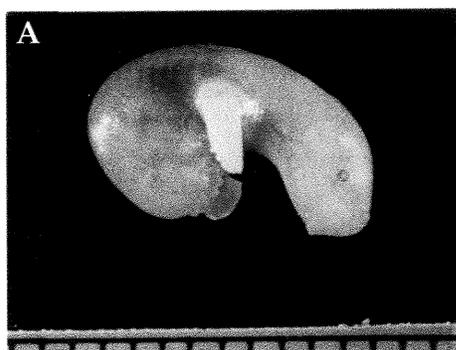


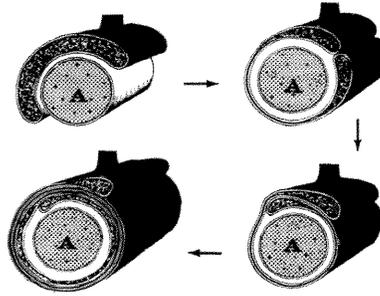
Figure 2

Schéma du processus de myélinisation de l'axone dans le système nerveux central.

A: représentation d'un prolongement d'oligodendrocyte s'enroulant autour d'un axone

(A) (tiré de Morell, 1984); B: Chaque prolongement d'oligodendrocyte, dont un est montré déroulé, forme un segment autour d'un axone, entre deux nœuds de Ranvier. (tiré et modifié de Morell, 1984).

A



B

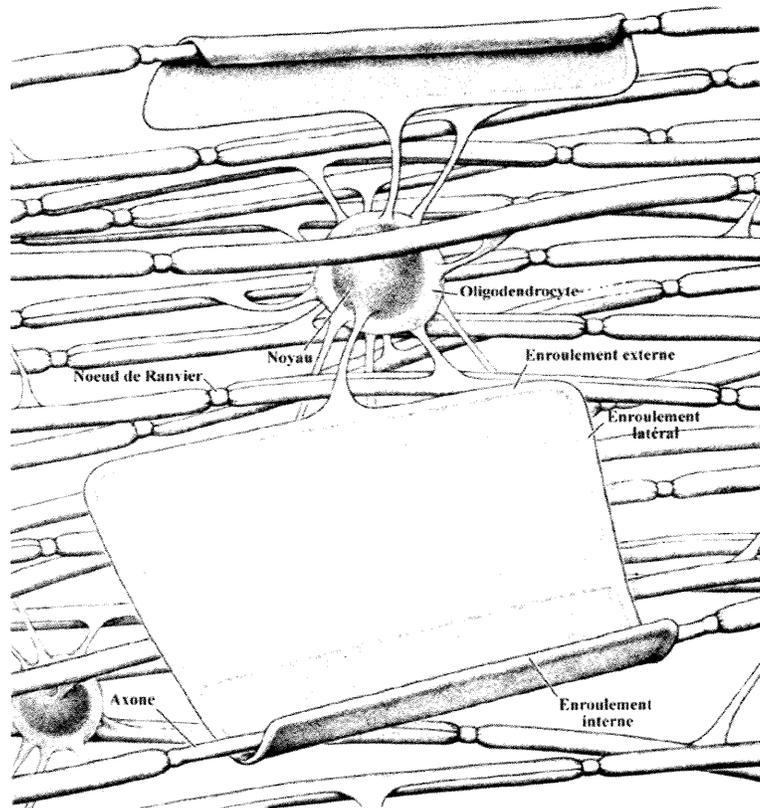


Figure 3

Photographie d'un axone myélinisé du système nerveux central montrant la région d'un nœud de Ranvier (Nd) en microscopie électronique.

Les flèches indiquent la région membranaire de l'axone (Ax) dénuée de myéline (M). (tiré et modifié de Kandel et al., 2000)

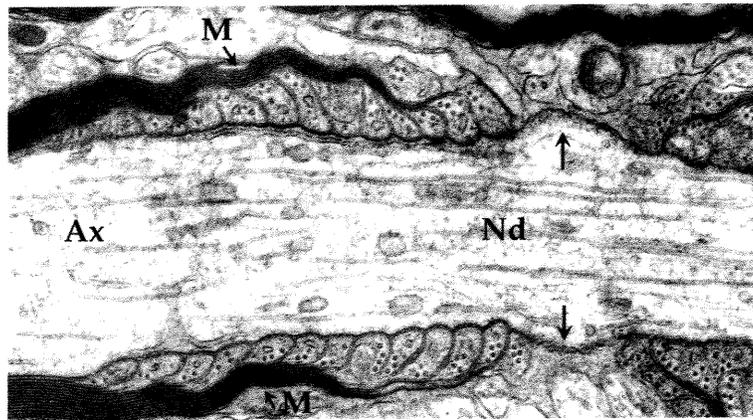


Figure 4

Schéma de la différenciation d'un oligodendrocyte à partir de son précurseur (A)
et photographie en microscopie de contraste de phase d'un oligodendrocyte
mature en culture (B). (tiré et modifié de Martenson, 1992)

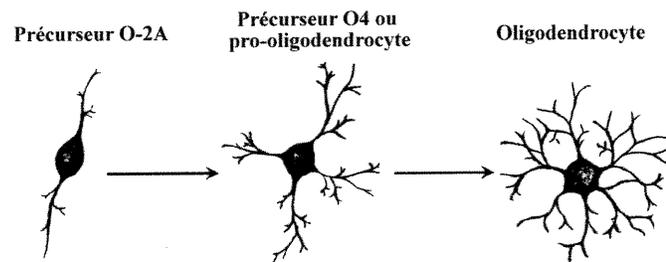
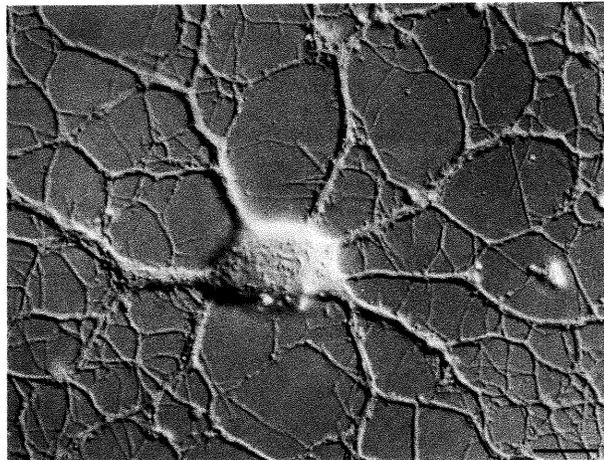
A**B**

Figure 5

Schéma de la localisation des principales protéines de la myéline centrale.

Représentation hypothétique de la MBP (myelin basic protein) et de la PLP (proteolipid protein) dans deux enroulements d'un prolongement oligodendrocytique. La MBP se retrouve à la surface cytoplasmique et la PLP dans l'espace extracellulaire et relie deux enroulements de myéline, via le domaine extra-membranaire.

M: membrane de l'oligodendrocyte. (tiré et modifié de Morell, 1984)

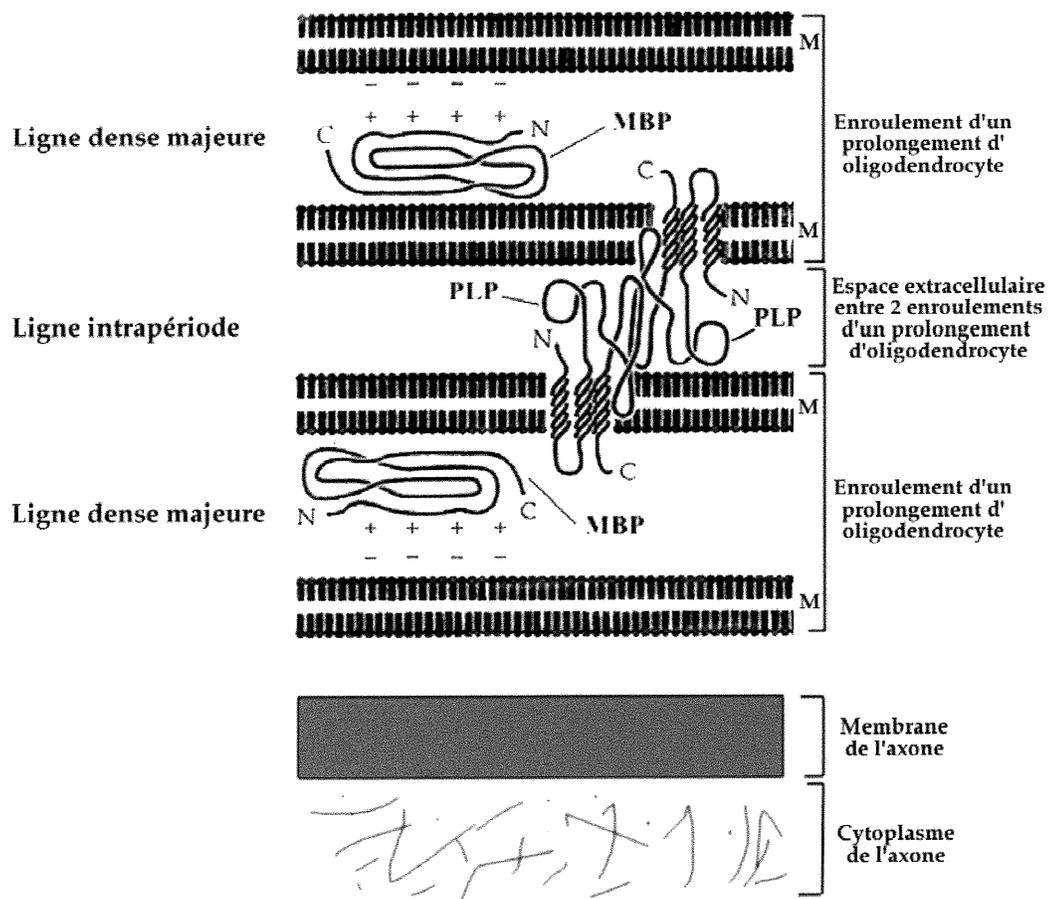
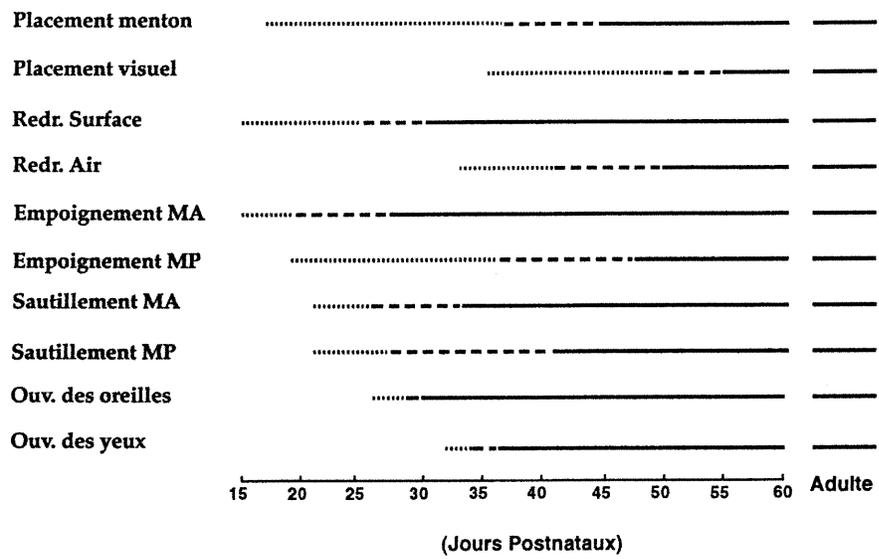


Tableau 1

Résumé du développement de quelques réflexes sensorimoteurs chez *M. domestica*.

Redr.: redressement, Ouv.: ouverture, MA: membres antérieurs, MP: membres postérieurs. Ligne pointillée: réflexe exprimé moins de 80% du temps; ligne brisée: réflexe exprimé entre 80 et 100% du temps; ligne pleine: réflexe exprimé 100% du temps. (tiré et modifié de Cassidy et al., 1994).



2. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL

2.1 Contribution de l'étudiant

Dans le cadre de la rédaction de ce mémoire de maîtrise, j'ai contribué de façon majeure à la préparation de l'article intitulé "Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*". J'ai effectué la revue de la littérature, en plus d'élaborer le protocole expérimental, particulièrement en ce qui a trait aux techniques d'immunohistochimie utilisant la PLP. J'ai participé à la cueillette de la presque totalité des résultats, ainsi qu'à l'analyse de ceux-ci, ce qui m'a permis d'écrire l'ensemble du présent article, sous la supervision de ma directrice de recherche, Mme Thérèse Cabana. Son aide et ses conseils ont en effet permis de rédiger cet article scientifique qui sera soumis prochainement à *Journal of Comparative Neurology*. Jacinthe Gingras m'a aidé, au cours d'un travail d'été précédant le début de mes travaux de maîtrise, à mettre au point le protocole expérimental visant à mettre en évidence la MBP par immunohistochimie. Elle a contribué à la cueillette des résultats préliminaires. Elle a de plus apporté ses commentaires et suggestions à l'article.

2.2 Accord des coauteurs

Les coauteurs Jacinthe Gingras et Thérèse Cabana ont signifié leur accord pour que l'article intitulé "Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*" soit inclut dans le mémoire de maîtrise ayant pour titre "Myélogenèse dans la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*".

- 2.3 Article: Lamoureux S, Gingras J, Cabana T. Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*.

En préparation, à soumettre prochainement à Journal of Comparative Neurology.

**Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements
of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica***

Stéphanie Lamoureux, Jacinthe Gingras¹ and Thérèse Cabana*

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

33 pages, 1 table, 4 figures

Running headline: Myelinogenesis in the spinal cord of the opossum

Associate Editor: Dr. Gert HOLSTEGE

Indexing terms: MBP; motor systems; myelin; ontogenesis; PLP

*Correspondence: address as above

Tel: [REDACTED]

Fax: (514) 343-2293

Email: [REDACTED]

¹ present address:

Centre for Research in Neuroscience

McGill University and Montreal

General Hospital Research Institute

1650 Cedar Avenue

Montréal, QC, Canada H3G 1A4

Grant sponsor: NSERC of Canada OGP0003595.

ABSTRACT

The central myelin proteins MBP and PLP were localized using immunohistochemistry in light microscopy on sections of the spinal cord enlargements of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*, to determine the timecourse of myelinogenesis therein and compare it with other aspects of motor systems development. Spinal tissue not treated for immunohistochemistry were prepared for electron microscopy. No immunolabeling for either protein occurred in the newborn opossum, but occasional fibers surrounded by a few loose, irregular membranous rings were seen in electron microscopy, near motoneuronal cell bodies. Labeling was detected first in the brachial enlargement in the 2nd week, presumably on motoneuronal, vestibular and reticular axons. In the brachial enlargement, the dorsal column, spino-encephalic, reticulospinal and propriospinal projections became labeled in the 3rd week, and the area of rubrospinal axons at 4 weeks. Labeling intensity in the white matter increased until 6-8 weeks. Immunolabeling invaded the gray matter of the brachial enlargement along ventrodorsal and lateromedial gradients, from the 4th to 7th weeks, still increasing afterwards, but remained light in laminae I-III. Labeling developed similarly, but 3-5 days later, in the white and gray matter of the lumbosacral enlargement. Thus, myelinogenesis in the spinal cord obeys general rostrocaudal, ventrodorsal and lateromedial sequences. Myelinogenesis in the enlargements occurs later than synaptogenesis therein, but starts and ends earlier than myelinogenesis in the corresponding ventral and dorsal roots. It correlates with the development of sensorimotor reflexes, weight support and quadrupedal locomotion.

INTRODUCTION

We are reporting on myelinogenesis in the spinal cord enlargements of the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*, which we have used previously as an experimental model to study various aspects of motor development. This marsupial species is born in a very immature state, only 14-15 days after conception (Kraus and Fadem, 1987), with immobile hindlimbs resembling embryonic buds (Fig. 1, arrow). Even if mobile, the forelimbs of the newborn exhibit no articulations visible externally, but possess individualized fingers terminated by fine claws. At birth, the opossum performs alternate and low amplitude extensions-retractions with its forelimbs, which, together with the fingers that grasp hair on the mother's belly and the trunk that sways from side to side, allow the animal to climb from the birth canal to a nipple. It then attaches to a nipple and remains thus firmly attached for about three weeks, while performing the previous trunk and forelimb movements with gradually greater strength, without however progressing on the mother's belly. The hindlimbs start moving during the second week, in a fashion similar to the forelimbs. If detached from the nipple during the first week and a half and placed on a surface, the opossum cannot support its weight and falls on its side. If detached after that age, and until 4 weeks, it can support weight with the forelimbs, but not with the hindlimbs, thus pivoting around its hindquarter. The opossum begins to support weight with all four limbs at 4 weeks, when it naturally detaches from the nipple and linear locomotion starts (Pflieger et al., 1996). Simple sensorimotor reflexes such as withdrawal appear in the forelimbs at 3 weeks and in the hindlimbs at 4 weeks (Cassidy et al., 1994). The young opossum often returns to the mother's nipple until weaning, around 60 days.

Axonal tracing experiments have shown that the major nerve pathways involved in motor control in mammals (see Grillner, 1975), in particular brain projections to the spinal cord (Mølenaar and Kuypers, 1975), form partly or entirely postnatally in the opossum (reviewed in Cabana, 2000). For instance, although some vestibular and medullary reticular projections reach the cervical cord prenatally (Pflieger and Cabana, 1996), most projections arising in the brainstem grow into the cord, especially the lumbosacral enlargement, during the first three postnatal weeks (Wang et al., 1992). The long propriospinal projections connecting the cervical and lumbosacral segments start forming prenatally, but most of them reach their targets during the first three postnatal weeks (Cassidy and Cabana, 1993). Ascending projections arising from the lumbosacral enlargement have reached the spinomedullary junction at birth and mostly invade their brainstem targets during the 2nd to 4th weeks, and the cerebellum even later (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995). Consequently, synaptogenesis of these pathways with their targets can only occur after they have grown into them, thus mostly postnatally. This claim has been substantiated for the projections impinging onto the brachial and lumbosacral enlargements, by the light microscopic demonstration of synaptic markers therein and by observations in electron microscopy (Gingras and Cabana, 1998, 1999). The latter study indicates that even short local circuits form synaptic contacts mostly postnatally in the spinal enlargements, especially the lumbosacral one (see also Knott et al., 1999). If, as just explained, early steps of neural ontogeny such as axogenesis and synaptogenesis occur largely postnatally in the spinal cord enlargements of the opossum, the myelin around the nerve fibers therein likely develops even later, possibly entirely in postnatal life, thus allowing for a complete description of this event.

Myelin significantly increases nerve impulse conduction velocity. For example, the conduction velocity of unmyelinated fibers averages 1 m/sec, but that of myelinated fibers can reach 100 m/sec (Bischoff and Thomas, 1984). The myelination of nerve pathways may thus account for the maturation of motor acts. In the opossum, myelination of ventral and dorsal root fibers at both brachial and lumbosacral levels unfolds entirely postnatally (Leblond and Cabana, 1997), a consequence of the largely postnatal motor innervation of the limbs (Barthélemy and Cabana, 2000, 2001a, b), and the later formation of sensory fibers over motor axons (Knott et al., 1999). Furthermore, peripheral myelination proceeds over a relatively long period of at least three months (Leblond and Cabana, 1997), well after sensorimotor reflexes and locomotion appear adult-like (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). In fact, only a relatively small proportion of motor and sensory root fibers are myelinated when locomotor behaviors seem mature, and they have not yet attained their adult diameter (Leblond and Cabana, 1997).

In the present study, we have sought to determine the timecourse of myelinogenesis within the spinal cord enlargements of the opossum. We have used immunohistochemical techniques to localize with the light microscope two proteins that constitute a major part of the proteic content of myelin in the central nervous system: the myelin basic protein (MBP) and the proteolipid protein (PLP) (review in Hildebrand et al., 1993). Both proteins play an important role in the myelination of fibers by contributing to myelin compaction. An 18.5 kDa protein that accounts for 35% of the protein content of central myelin, MBP is required for intracellular oligodendrocytic

membrane adhesion, whereas PLP, a 23.5 kDa protein constituting at least 50% of central myelin, forms stabilizing junctions between the membranes of adjacent oligodendrocytic processes (Brophy et al., 1993; Nadon and West, 1998; Compston et al., 1997; Klugmann et al., 1997). In addition to these experiments, we prepared for transmission electron microscopy spinal cord sections from animals at selected ages without treatment for immunohistochemistry. By comparing the present results with those summarized above on the formation of pathways involved in motor control, we sought to determine when the latter become myelinated in the spinal cord of the opossum. We also wished to verify if the development of motor behaviors correlates better with central myelinogenesis than peripheral myelinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animal and tissue preparation

The opossums, *Monodelphis domestica*, used for these experiments were obtained from a colony kept at the University vivarium and maintained according to Fadem et al. (1982) and Kraus and Fadem (1987). Animals up to 3 weeks of age were euthanized by Metofane inhalation and older ones by an overdose of sodium pentobarbital (i.p.). For opossums under P9, working under the surgical microscope, the cartilaginous vertebral column containing the spinal cord was rapidly dissected out and the dorsum of the vertebrae was removed at the levels of the brachial and lumbosacral enlargements. In older animals, each spinal enlargement was taken out from the vertebral column.

In opossums of selected ages, one slice of about 1 mm from each enlargement was cut from these blocks and reserved for electron microscopy. For immunohistochemistry in light microscopy, the blocks of unfixed tissues were immediately frozen in optimal cutting compound (Tissue-Tek O.C.T. Compound) using 2-methyl-butane cooled with dry ice in ethanol, and stored at -80°C until sectioning. The blocks were cut with a cryostat into 20 µm thick serial transverse sections, which were mounted onto poly-L-lysine coated slides and dried at room temperature for 20 minutes before processing for immunohistochemistry. A total of 46 opossums aged from postnatal day (P) 1 to P113 and 2 adults were used for the detection of MBP (Table 1), but the lesser quantity of antibody against PLP available limited the experiments to a lesser number of the same animals (Table 1) and sections. The procedures for MBP and PLP immunohistochemistry were based on the protocols of MacLaren (1996) for the same species.

MBP and PLP immunohistochemistry in light microscopy

For MBP detection, the following steps were conducted at 4°C in the dark. The mounted and dried sections were fixed for 20 min with 95% ethanol/5% acetic acid, rehydrated in phosphate buffer saline (PBS) and incubated 20 minutes in 5% normal horse serum (NHS, Gibco BRL)/PBS as a blocking agent. The sections were then exposed during 20 h to a commercial monoclonal antibody to MBP (Sires et al., 1981; Boehringer-Mannheim, Laval, QC, Canada) diluted 1:500 in 5% NHS.

No monoclonal antibody against PLP being available, a polyclonal antibody (Jung et al., 1996) generously provided by Dr. K.-A. Nave (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, Germany) was utilized. After fixation in 4% paraformaldehyde/PBS (pH 7.4) for 20 min at 4°C, the sections were rinsed in PBS for 15 min, incubated 30 min in 5% NHS/0.1% triton/PBS at room temperature, and exposed for 1 h at 4°C to the PLP antibody diluted 1:1000 in 5% NHS, all steps conducted in the dark.

After incubation with the MBP or PLP primary antibody, the sections were rinsed in PBS and incubated in biotinylated horse anti-mouse/anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) as a secondary antibody, diluted 1:200 in 5% NHS/PBS during 1 h at room temperature in the dark. The sections were rinsed again in PBS and reacted with the avidin-biotin complex (Vector Elite Kit, 1:200) at room temperature for an additional 1 h in the dark. By using the chromogen diaminobenzidine (DAB-Sigma) on some sections and VIP (Vector) on others, a peroxidase reaction product was evidenced. The DAB reaction (0.1% DAB/0.03% H₂O₂ in 0.1 M phosphate buffer) was monitored carefully and stopped when the appropriate contrast was obtained, after 2 to 25 min depending on the age of the animal, the shorter time for the older animals. The VIP kit was utilized following the instructions of the company, and the reaction was stopped after a few seconds to 5 min, when the appropriate contrast was achieved. All sections were rinsed with 0.9% saline and dried overnight. They were finally dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared in toluene and coverslipped with Microkit.

The sections were observed with the light microscope to detect the presence of the brownish (DAB) or purple (VIP) punctate reaction product indicating the presence of the myelin proteins. Modelized sections of the brachial and lumbosacral enlargements were drawn using a Camera lucida to plot the labeling. Photomicrographs of selected sections were taken with a Wild Leitz Photoautomat.

To serve as controls for both myelin proteins, one section on 10 was processed as above, except that either the primary (anti-MBP or anti-PLP) or the secondary (horse anti-mouse/anti-rabbit IgG) antibody was omitted. Occasional sections were not processed for immunohistochemistry, but instead stained with cresyl violet to facilitate histological identification.

Electron microscopy of non-immunohistochemical material

The large number of animals necessary for the purpose of this study did not make it possible to prepare material for observation with the electron microscope for all of them or even at all the ages investigated immunohistochemically. Therefore, only some of the above animals were selected (Table 1) to confirm the ultrastructural level the results obtained by light microscopy. Thus, the slices cut from the blocks of unfixed tissues before freezing were immediately immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 1-2 hours, according to the protocol of Balslev et al. (1992) for the same species. The tissues were rinsed overnight in 0.1 M cacodylate buffer and postfixed in 2% OsO₄ in cacodylate buffer at 4°C for 1-2 h. They were rinsed 45 min in distilled water, immersed in 1% uranyl acetate for 1 h, dehydrated in graded ethanol, bathed in a mixture of ethanol-Epon, then Epon alone, 30 min each bath, and finally

embedded in pure Epon and polymerized overnight in a 60°C oven. Sections of approximately 100-120 nm were cut on an ultramicrotome, mounted onto copper grids, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate to be observed and photographed on a JEOL JEM 100S transmission electron microscope. Observations focused mostly on the area of the spinal cord where we first saw immunolabeling (see Results) in order to corroborate these results.

This original research was performed under the guidelines of the NIH (1985) and the Canadian Council on Animal Care (1994).

RESULTS

MBP and PLP immunohistochemistry in light microscopy

On Nissl-stained cross-sections, the spinal cord enlargements of the opossum on the day of birth (P1) appear very immature, especially the lumbosacral enlargement. A thick ventricular zone around the large central canal exhibits some mitotic figures. The intermediate zone (presumptive gray matter) comprises small and undifferentiated cells. The ovoid shape and radial orientation of numerous cells within these two zones suggest that they are in the process of migration. The slightly larger neurons occupying ventral positions in the ventral horns are presumably motoneurons. The marginal zone (presumptive white matter) is thin.

No immunolabeling for either MBP or PLP is seen in the spinal cord of the P1 opossum processed for immunohistochemistry, whether in the brachial or the lumbosacral enlargement (Fig. 2, P1). Even in the P9 opossums processed for MBP and PLP (not shown), no immunolabeling is detected in either enlargement.

Immunolabeling in light microscopy is first observed at P11, and only against MBP in the brachial enlargement alone (Fig. 2, P11). At this age, the central canal of the brachial cord is smaller and more ovoid, the ventricular zone is thinner, the intermediate zone is thicker, presumably by the addition and differentiation of postmitotic neuroblasts and of glioblasts, and the marginal zone is also thicker. The MBP immunolabeling therein is scant, very pale and restricted to the part of the ventrolateral marginal zone, where ventral root fibers exit the spinal cord and in the external part of the presumptive ventral funiculus. It is absent in the internal portion of the marginal zone bordering on the gray matter. This labeling does not stand out on photomicrographs, but is unambiguously identifiable at the microscope, with either DAB or VIP as chromogen.

By P14, the next age studied, MBP labeling is more abundant in the ventral marginal zone of the brachial cord (Fig. 2, BR at P14). It extends more medially, and crosses the ventral midline, as well as more laterally, without however reaching the dorsoventral midpoint of the lateral funiculi. The intensity and density of labeling decrease from ventral to dorsal along the ventral and ventrolateral funiculi, and likewise from outside to inside within the thickness of the marginal zone. The innermost part of the marginal zone contains no labeling, except where the ventral roots leave the ventral horns. PLP labeling is present in the brachial enlargement of P14 opossums (Fig. 2, BR

at P14). The location, intensity and density of this labeling resembles those described for MBP at P14, with some more labeling in the ventromedial, ventral and ventrolateral parts of the marginal zone. At P14, immunolabeling for both proteins is observed in the lumbosacral enlargement (Fig. 2, LS at P14). For each protein, the location, density and intensity of the labeling are less than in the brachial enlargement.

On sections of the brachial cord from P16 opossums (Fig.2, BR at P16), the labeling for MBP extends more dorsally in the lateral funiculi, its intensity decreasing ventrodorsally, and that for PLP is slightly more abundant. The presumptive dorsal funiculi now contain MBP and PLP labeling (arrows in Figs. 2 and 4A). In the lumbosacral enlargement of P16 opossums (Fig. 2, LS at P16), the labeling for MBP and PLP compares to that described at brachial levels for the respective proteins in P14 opossums. Photomicrographs of sections from both enlargements processed for MBP immunohistochemistry at P16 presented in Figure 3 show the appearance of the labeling in different areas of the presumptive white matter.

By P21, the next age investigated, MBP and PLP label is found in almost all funiculi of the white matter, except the dorsalmost portion of the lateral funiculi, and as a whole is less abundant in the lumbosacral than in the brachial enlargement (Fig. 2; see also Fig. 4C for PLP labeling). The quantity of the immunolabeling decreases along the ventral, ventrolateral, lateral and dorsolateral white matter, but the dorsal funiculus is more heavily labeled than most of the lateral white matter. The labeling intensity decreases from outside to inside within the thickness of the ventral and lateral funiculi,

but the opposite gradient is observed in the dorsal funiculi. As it been described for the earlier ages investigated, the labeling for PLP appears more intense than for MBP in comparable areas of the white matter, especially at brachial levels. At P21, pale and scant immunolabeling for both proteins is detected for the first time in the presumptive gray matter of the brachial enlargement, seemingly of fibers from the ventromedial and ventral funiculi that penetrate the ventral horns and only course a short distance within the ventral horn (arrows in Fig. 2, BR at P21). Rare PLP-labeled fibers penetrate the intermediate gray at that age (Fig. 2, BR at P21). The first labeling in the gray matter has the appearance of fibers coursing through it as well as the punctate form of terminals.

At P24, labeling for both proteins is evident in the intermediate gray matter (arrow in Fig. 2 for MBP in the BR at P24), apparently penetrating from the lateral funiculi. Immunolabeling is now more abundant in the ventral horns and PLP labeling begins to penetrate the dorsal horn dorsomedially (arrow in Fig. 2 for PLP in the BR at P24). At lumbosacral levels, the labeling is less abundant in the gray matter, being altogether absent in the dorsal horn. At P24, all regions of the white matter contain label for both proteins, and in the entire thickness of it, in both enlargements. Whether in the white matter or the gray matter, the PLP labeling appears more abundant than that for MBP at that age.

In the older animals processed for immunohistochemistry, MBP and PLP labeling continues to invade the ventral and intermediate gray matter following an outside-in gradient, the lumbosacral enlargement lagging the brachial enlargement. The labeling penetrates the dorsal horn along a general dorsoventral gradient however

without apparently terminating in its dorsalmost portion in P30 and P36 (Fig. 2) opossums. Clear punctate labeling is first seen in the dorsalmost part of dorsal horn at P46 (not shown), but it is light and sparse and remains thus in laminae I-III of older and adult opossums (Fig. 2, Ad), although the density and intensity of the immunolabeling increases until the last developmental age studied, P113, in the rest of the gray matter. Until at least P113, the spinal cord continues to grow, especially the white matter that, proportionately, increases more than the gray matter. It is in the adult animal that the labeling is the darkest (compare Ad to younger ages in Fig. 2), the white matter being significantly darker and more densely labeled than the gray matter (Fig. 2, Ad) at lumbosacral as well as brachial levels. White matter labeling appears relatively homogeneous, except for the dorsalmost part of the lateral funiculi that is paler and also the innermost portion of the ventral funiculi bordering on the gray matter. Gray matter labeling appears less homogeneous, and the most superficial laminae of the dorsal horns are the most lightly labeled.

Immunostaining was not seen on any of the control sections processed without either the primary antibody, whether for MBP or PLP, or the secondary antibody. Such a control for MBP taken from a P46 opossum is shown in Figure 4G.

Slight variations between specimens of given ages were observed for a given myelin protein. These variations pertained mostly to the intensity of the labeling, not to its location within the white or the gray matter. Interindividual variations could be explained by the fact that opossums may not all be at the exact same stage of

development at birth and that their subsequent growth rate may differ slightly, especially for litters of different sizes. Slight differences in the temperature of the baths, especially when same-aged specimens were processed in different batches, may also account for variations in the results.

Electron microscopy of non-immunohistochemical material

On sections from the P1 opossum prepared for electron microscopy, a few loose rings of membranes surround some nerve fibers in the vicinity of presumed motoneuronal cell bodies in the ventral horns (Fig. 4A). Such profiles are not numerous, particularly in the lumbosacral enlargement. The rings around the fibers rarely exceed 4 to 5 and are loosely and irregularly organized. Numerous small spaces are seen between two membranous layers of a given ring (arrows in Fig. 4A).

At P9, the next age for which electron microscopic material is available, P11 and P14 (not shown), more fibers in the same area of the marginal zone have membranous rings around them. Some of these fibers have more numerous, although loose and irregular, rings than at P1. At each age, such myelinating fibers are again more numerous at brachial than at lumbosacral levels.

By P24, the next age prepared for electron microscopy, the number of fibers surrounded by membranous rings has increased in the same region of the ventral funiculi. Many such fibers have numerous rings tightly rolled around them, such as shown in Figure 4B. Nonetheless, even at P30, the last age examined in electron

microscopy, numerous fibers in the same area have the immature features of those in the early process of myelination described for P1 and shown in Fig. 4A.

DISCUSSION

The use of immunohistochemistry in light microscopy to evidence two proteins of central myelin combined to non-experimental material in electron microscopy has allowed us to infer the time of onset of myelinogenesis and to describe its course in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum, *Monodelphis domestica*.

Onset and gradients of myelinogenesis

In light microscopy we found no immunolabeling in the spinal enlargements of the opossum before the middle to the end of the second week, and such labeling was located at the exit of the ventral root fibers from the spinal cord in the adjacent areas of the presumptive ventral white matter. In electron microscopy, small fibers surrounded by a few loose rings of membranes, presumably from oligodendrocytic processes, were observed in the same areas as early as P1. They were not numerous however. The paucity of fibers surrounded by membranous rings, the small number of rings around them and the looseness of the latter in the P1 opossum converge to indicate that we are witnessing the initial stages of myelination. Thus, myelinogenesis in the spinal cord enlargements of the opossum would begin at birth or slightly before and proceed almost entirely postnatally.

That the onset of myelination can be documented in electron microscopy earlier than in light microscopy is expected. At the onset of myelinogenesis, when glial processes begin to enwrap nerve fibers, MBP and PLP may not be abundant enough to be detected immunohistochemically in light microscopy. The time when the immunolabeling for these proteins starts to be evidenced may correspond to the beginning of compaction of the membranous rings.

From *in vitro* culture preparations of oligodendrocytes, Dubois-Dalcq et al. (1986) have demonstrated that MBP appears before PLP in the course of development. This can be understood in the light of the respective function of these proteins in myelin compaction. MBP is thought to establish intracellular adhesive junctions between the two membranes of each oligodendrocytic process as it rolls around a nerve fiber (Readhead et al., 1987; Brophy et al., 1993) and then PLP to link the membranes of adjacent processes, thus further stabilizing the myelin sheath (Klugmann et al., 1997; Nadon et West, 1998). This could explain the slightly earlier detection of MBP in our material. As for the earlier appearance of PLP in almost all portions of the white and gray matter, this could be explained by the use of a polyclonal antibody against PLP, which might be less specific than a monoclonal antibody, such as the one used against MBP.

Our data reveal three general gradients of myelinogenesis in the spinal cord of the opossum. Firstly, a rostrocaudal gradient results in the lumbosacral enlargement lagging the brachial enlargement by a few days during the entire course of

myelinogenesis. This matches the general rostrocaudal gradient of spinal cord development in that species and in Vertebrates as well as that of somative development, in particular the limbs. Secondly, within each enlargement, a general, but not absolute, ventrodorsal gradient characterizes myelin development in the white matter and the gray matter. The ventral, ventrolateral, lateral and dorsolateral portions of the white matter become myelinated in that order, but the dorsal funiculus precedes part of the lateral white matter. Within the gray matter, the ventral horn contains myelinated fibers earlier than the dorsal horn. Thirdly, superimposed to this second gradient, a general outside-inside or lateromedial gradient concerns both the white matter, except the dorsal funiculus, and the gray matter. The latter two gradients of myelinogenesis also match observations made from our previous studies (see below) on spinal cord development, and they concur with the investigations of Altman and Bayer (1984) in the rat, notably as regards neuronal and glial production and the formation of the ventral and dorsal roots. The sequences of labeling for the two myelin proteins in the spinal enlargements of *Monodelphis domestica* reported here compares with that provided for MBP in the cord of the North American opossum *Didelphis virginiana* (Ghooray and Martin, 1993), except that all events happen somewhat later and are more protracted in the latter species.

The three developmental gradients of immunolabeling for the myelin proteins in the spinal gray matter described here parallel those reported for three synaptic proteins in the same species (Gingras and Cabana, 1999), but the onset of myelin labeling in the different regions of the gray matter lags synaptic labeling by about two weeks and

myelinogenesis unfolds over a longer period. Such parallel and delay between myelinogenesis and synaptogenesis in the spinal enlargements of the opossum could be understood in the light of the inhibitory effect that myelin exerts on neuritic growth and the formation of synapses, as demonstrated in the spinal cord of the rat (Kapfhammer and Schwab, 1994). The increased presence of myelin signals a slowdown and eventual completion of synaptogenesis.

Identification of the immunolabeling and timecourse of myelinogenesis

The location of the immunolabeling for myelin at different ages evidenced here in *M. domestica* can be compared with the sequence of development of spinal pathways revealed by axonal tracing or immunohistochemistry in the same species to infer the identity of the labeled elements. In making the following comparisons, however, it must be understood that the immunolabeling for the myelin proteins is not synchronous to the growth of the fiber systems along the cord, but delayed by one to two weeks.

Thus, some of the earliest labeling for the myelin proteins, in the 2nd week, may be of motor axons exiting the ventral roots. The position of the fibers surrounded by membranous rings visualized in electron microscopy at P9-11 supports this interpretation. Motor axons have grown into the forelimbs and the hindlimbs in opossums at that age, but they are still scant and very immature (Barthélemy and Cabana, 2000, 2001a, b). In a quantitative light microscopic study of entire ventral roots, the first myelinated axons were identified at P9 at brachial levels and P13 at lumbosacral levels in *Monodelphis domestica* (Leblond and Cabana, 1997), corresponding to the ages

of appearance of immunolabeling in the ventral marginal zone of the respective enlargements in the present study. Moreover, some of the first axons myelinated, in the external part of the ventral funiculus and then in the ventromedial funiculus, may originate from the lateral vestibular nucleus and the medullary reticular formation (including the raphe), the earliest brainstem projections to the spinal cord of the opossum (Wang et al., 1992; Pflieger and Cabana, 1996). Using conventional staining for myelin in *Didelphis virginiana*, Langworthy (1928) reported the vestibular nerve and vestibulospinal tracts as the most precocious.

The next area labeled in our material, the ventrolateral and lateral presumptive white matter, may contain axons descending from the medullary and pontine reticular formation (Wang et al., 1992). The labeling in the most external part of the ventrolateral presumptive white matter observed from the 3rd week on may belong to the long ascending projections, such as the spinoreticular and spinothalamic tracts (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995). The labeling then occurring in the dorsal funiculus may largely be from primary afferents ascending the dorsal columns (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995; Knott et al., 1999). As for the external part of the lateral funiculus dorsally, but also ventrally, this labeling likely marks the later forming spinocerebellar projections (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995). The labeling in the inner portion of the marginal zone of all funiculi probably belongs to propriospinal projections, including the long ones between the two enlargements that form mostly during the first 2-3 postnatal weeks (Cassidy and Cabana, 1993). The area of the dorsolateral funiculus that labels last for the myelin proteins contains axons of the rubrospinal tract, the last major descending system

to form in the opossum, around the 6th week (Wang et al., 1992). (Neocortical projections in *M. domestica* only descend to the first cervical segment and do not penetrate the gray matter; Cabana et al., 1992). Immunolabeling in the different regions of the white matter becomes darker as more fibers from the different projection systems are added to the early ones.

The relatively late myelination of the propriospinal fibers compared to many brainstem projections that form later or at the same time but are myelinated earlier may be puzzling. As a general rule, propriospinal axons have smaller diameters than the longer axons of brainstem origin, and are little myelinated or unmyelinated (Bear et al., 1996). The lesser quantity of myelin around these fibers and the presence of unmyelinated fibers among them may simply make them less detectable at early stages. In older and adult opossums, the labeling in the areas of white matter containing the propriospinal tracts is paler and less dense than in the areas comprising the descending and ascending tracts connecting the spinal cord and the encephalon. Similarly, the dorsalmost laminae of the dorsal horn, only lightly labeled for myelin even in the adult animal, abound in small diameter unmyelinated and thinly myelinated fibers conveying notably the pain modality (Christensen and Perl, 1970).

We note herein a delay of approximately 5 days between the time presumed motor axons first show label for myelin proteins in the ventral funiculus (e.g. P11 for MBP in the brachial enlargement) and the time presumed dorsal root afferents are first labeled in the dorsal funiculus (e.g. P16 for the same protein at the same spinal level). In

their already mentioned study, Leblond and Cabana (1997) reported an identical delay in the myelination of the dorsal roots over the ventral roots.

Behavioral correlations

Except for the simple trunk and forelimb movements performed by the newborn, locomotor behaviors develop postnatally in the opossum, classified in four periods of approximately 10 days each by Pflieger et al. (1996). In the 1st period (P1-10), the opossum performs the same movements described at birth, but without progressing on the mother's belly since it is firmly attached to a nipple. The hindlimbs are immobile. None of the simple reflexes such as withdrawal, crossed extension or hopping are expressed by the forelimbs during this period (Cassidy et al., 1994). Even grasp cannot be elicited by tactile stimulation, which led Cassidy et al. (1994) to hypothesize that this movement of the neonatal opossum is initially purely motor and that the sensory component is in place later. Moreover, as already mentioned, few motor axons have grown into the limbs during this period (Barthélemy and Cabana, 2000, 2001a, b), and the ventral and dorsal roots contain no myelinated fibers (Leblond and Cabana, 1997). During this 1st period of locomotor development, the myelin proteins are detected in neither spinal enlargement in light microscopy, and only some fibers are seen to begin the process of glial enwrapping in electron microscopy and cannot be considered truly myelinated. This period can thus be called one of "premyelination".

In the 2nd period of locomotor development (P11-20), the opossum, still attached to the mother, performs the same trunk and forelimbs movements with greater strength

and amplitude, while the hindlimbs start moving (Pflieger et al., 1996). Pivoting around the hindquarter can be evidenced in this period. The grasp reflex in the forelimbs and body righting on a surface, a reflex that necessitates body exteroception and proprioception as well as the vestibular system, begin to be expressed at the end of this period, but no other purely spinal reflexes are demonstrable (Cassidy et al., 1994). We detected the myelin proteins in the brachial enlargement at the beginning of this period, and in the middle of it in the lumbosacral enlargement, first in the ventral and ventrolateral marginal zone and later in the dorsal horn. Some fibers in this area seen in electron microscopy can be considered as myelinated, albeit not necessarily fully. By the end of this period, about 65% of ventral root fibers are myelinated at brachial level and 30% at lumbosacral level, but only 15% and 5% of dorsal root fibers are myelinated at the respective levels, and all these fibers are not fully myelinated (Leblond and Cabana, 1997). Hence, it seems that a minimum of myelination is required for the expression of simple reflexes.

In the 3rd period of locomotor development (P21-30), the young opossum starts to detach from the mother, its hindlimbs begin to support body weight and linear quadrupedal locomotion appears, albeit very slow and for only short distances (Pflieger et al., 1996). Grasp, withdrawal and hopping develop rapidly in the forelimbs and then the hindlimbs, and body righting acquires a mature expression (Cassidy et al., 1994). Nonetheless, most motor acts have an immature expression, the animal seems "clumsy", and the behavioral repertoire is relatively simple. This period corresponds to one of intense myelination in all areas of the presumptive white matter at both brachial and lumbosacral levels, but myelination remains incomplete, as for the ventral and dorsal

roots (Leblond and Cabana, 1997). Furthermore, myelinogenesis is only beginning in the spinal gray matter.

The 4th period (P31-40) sees a rapid evolution in locomotor abilities, including good weight support and intergirdle coordination, as well as adult-like locomotor behaviors, except for a shorter step cycle (the young opossum walks faster than the adult animal; Pflieger et al., 1996). Body righting in the air, which requires the cerebellum, can be elicited during this period (Cassidy et al., 1994). An increase in the intensity of the myelin labeling in all parts of the white matter in both spinal enlargements, indicating a greater number of myelinated fibers and a thicker myelin sheath, characterizes this 4th period. Myelin labeling also abounds in the gray matter, suggesting that the pathways innervating one or both of the spinal enlargements are myelinated up to their terminal levels. In the ventral and dorsal roots of the enlargements, myelinated fibers have continued to increase in number and become in excess by the end of the period, even though their adult diameter is not attained (Leblond and Cabana, 1997). The maturation of motor behaviors, such as the refinement of their trajectory and the speed of their execution, would thus necessitate a high degree of myelination, but not necessarily its full completion.

The opossum *Monodelphis domestica* has proven an excellent model to study the course of myelinogenesis in the spinal cord, since this developmental event occurs virtually entirely during postnatal life in this species and over a number of weeks. This has rendered possible some correlations with other events of spinal cord and behavioral

development. The postnatal and protracted occurrence of myelinogenesis in the spinal cord of *Monodelphis domestica* makes it an ideal model for investigations on spinal cord regeneration.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank G. Cassidy, J. Bessette, V. Martel, M. Chabre and S. Duboscq for technical assistance, L. Pelletier and J.-L. Verville for help with electron microscopy and photography. This work was performed by S.L. in partial fulfillment of the requirement for the M.Sc. degree at the Université de Montréal, and was supported by an NSERC grant to T.C. (OGP0003595).

LITERATURE CITED

Altman J, Bayer SA. 1984. The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol* 85:1-166.

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

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

Barthélemy D, Cabana T. 2001 b. Synaptogenesis in the hindlimb of the opossum *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abst* 27, 167.1.

Barthélemy D, Cabana T. 2000. Postnatal development of limb innervation in the opossum *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abst* 26, 514.3.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 1996. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Williams & Wilkins, USA.

Bischoff A, Thomas PK. 1984. Microscopic anatomy of myelinated nerve fibers. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, and Bunge R (eds): *Peripheral Neuropathy*, Vol 1. Philadelphia: Saunders WB, pp.104-130.

Brophy PJ, Boccaccio GL, Colman DR. 1993. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *TINS* 16:515-521.

Cabana T. 2000. The development of mammalian motor systems : the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53:615-626.

Cabana T, Desrosiers C, 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.

Canadian Council on Animal Care. 1994. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. 1994. The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 43:244-253.

Cassidy G, Cabana T. 1993. The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 72:291-299.

Christensen BN, Perl ER. 1970. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol* 33:293-307.

Compston A, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, Shaw C, Wood A, Scolding N. 1997. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat* 190:161-200.

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

Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA. 1986. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurones. *J Cell Biol* 102:384-392.

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

Ghooray GT, Martin GF. 1993. The development of myelin in the spinal cord of the north american opossum and its possible role in loss of rubrospinal plasticity. A study using myelin basic protein and galactocerebroside immuno-histochemistry. *Dev Brain Res* 72: 67-74.

Gingras J, Cabana T. 1999. Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:551-560.

Gingras J, Cabana T. 1998. The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 106:211-215.

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

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartar C. 1993. Myelinated nerve fibers in the CNS. *Progr Neurobiol* 40:319-384.

Jung M, Sommer I, Schachner M, Nave KA. 1996. Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J Neurosci* 16:7920-7929.

Kapfhammer JP, Schwab ME. 1994. Increased expression of the growth-associated protein GAP-43 in the myelin-free rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6:403-411.

Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA. 1997. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.

Knott GW, Kitchener PD, Saunders NR. 1999. Development of motoneurons and primary sensory afferents in the thoracic and lumbar spinal cord of the South American opossum *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:423-436.

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

Langworthy OR. 1928. The behavior of pouch-young opossums correlated with the myelination of tracts in the nervous system. *J Comp Neurol* 46:201-247.

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

MacLaren RE. 1996. Expression of myelin proteins in the opossum optic nerve: late appearance of inhibitors implicates an earlier non-myelin factor in preventing ganglion cell regeneration. *J Comp Neurol* 372:27-36.

Mølenaar I, Kuypers HGJM. 1975. Identification of cells of origin of long fiber connections in the cat's spinal cord by means of the retrograde axonal horseradish peroxidase technique. *Neurosci Lett* 1:193-197.

Nadon NL, West M. 1998. Myelin proteolipid protein: function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci* 20:533-539.

National Institutes of Health. 1985. Principles of laboratory animal care. NIH publication No. 86-23.

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

Qin YQ, Wang XM, Martin GF. 1993. The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 75:75-90.

Readhead C, Popko B, Takahaschi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman RL, Hood L. 1987. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell* 48:703-712.

Sires LR, Hruby S, Alvord EC Jr, Hellstrom I, Hellstrom KE, Kies HW, Martemspm R, Deibler GE, Beckman ED, Casnellie JE. 1981. Species restriction of monoclonal antibody reacting with residues 130-137 in encephalitogenic myelin basic protein. *Science* 214:87-89.

Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF. 1992. The origin of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 68:203-206.

Table 1

Number of opossums used for immunohistochemistry and electron microscopy

Age ¹	1	3	9	11	14	16	21	24	30	36	46	50	55	60	75	113	Ad
MBP ²	1	2	4	3	5	4	8	4	-	5	4	1	1	2	1	1	2
PLP ³	1	-	2	2	4	2	1	1	-	1	1	1	-	1	-	-	1
E.M. ⁴	1	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ in postnatal days (P1 = day of birth)

²MBP, number of opossums used for the immunohistochemical localization of MBP in light microscopy.

³PLP, number of opossums used for the immunohistochemical localization of PLP in light microscopy.

⁴E.M., number of opossums used for transmission electron microscopy without immunohistochemistry.

Figure 1

The opossum *Monodelphis domestica* on the day of birth (P1). It is hairless, weighs about 100 mg and measures 10 mm from snout to rump. The arrow points to a hindlimb.

Scale bar = 1 mm.

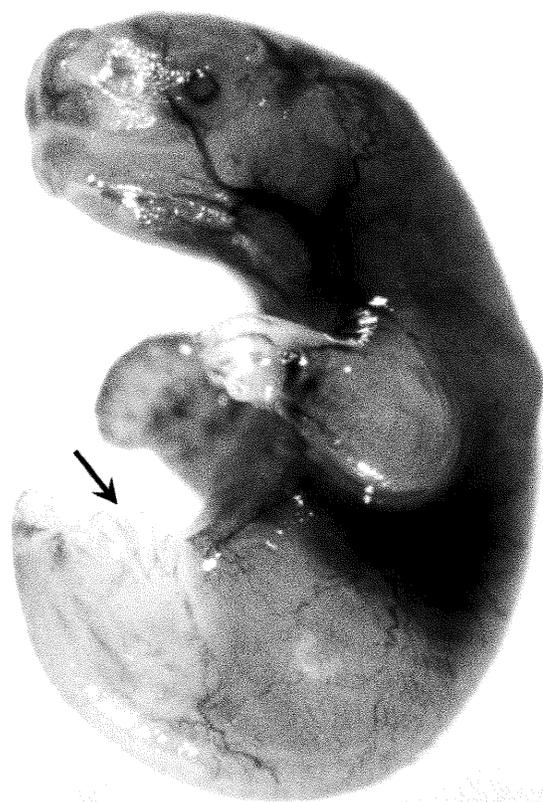


Figure 2

Camera lucida drawings of cross-sections through the brachial (BR) and lumbosacral (LS) enlargements from developing and adult opossums on which the immunolabeling (black dots) for the myelin basic protein (left side of the spinal cord) and the proteolipid protein (right side of the spinal cord) has been plotted. IZ, intermediate zone; MZ, marginal zone; VZ, ventricular zone. Scale bars: 200 μ m.

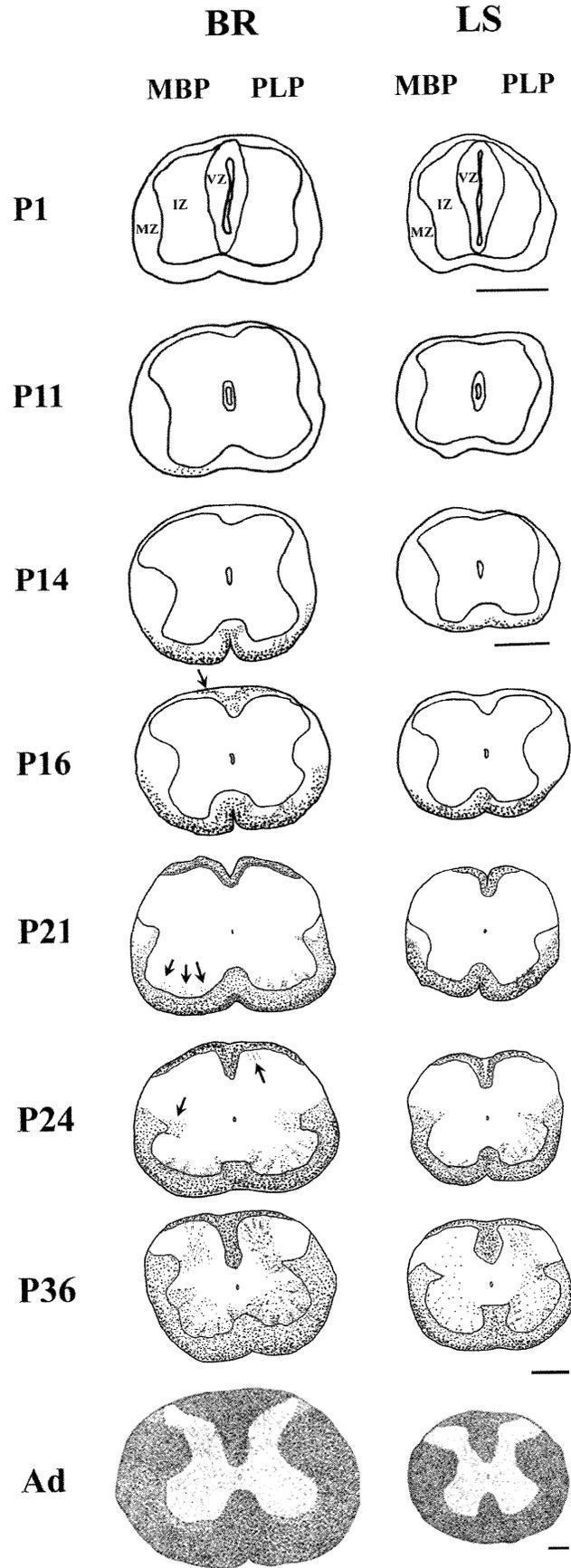


Figure 3

(A and B) Cross-sections of the brachial and lumbosacral enlargements of a P16 opossum processed for MBP. The arrows point to the dorsal funiculi. (C) Cross-section through the brachial enlargement of a P21 opossum processed for PLP. (D) Cross-section of the brachial enlargement of a P36 opossum processed for MBP, using the DAB chromogen, from which portions are shown at higher magnification in E and F. (E and F) Higher magnifications of D. The arrows point to MBP-like immunolabeled fibers penetrating the ventral horn radially. (G) Control section from the BR of a P46 opossum which was processed without the anti-MBP antibody.

Scale bars = 250 μm for A-D and G, 100 μm for E and F.

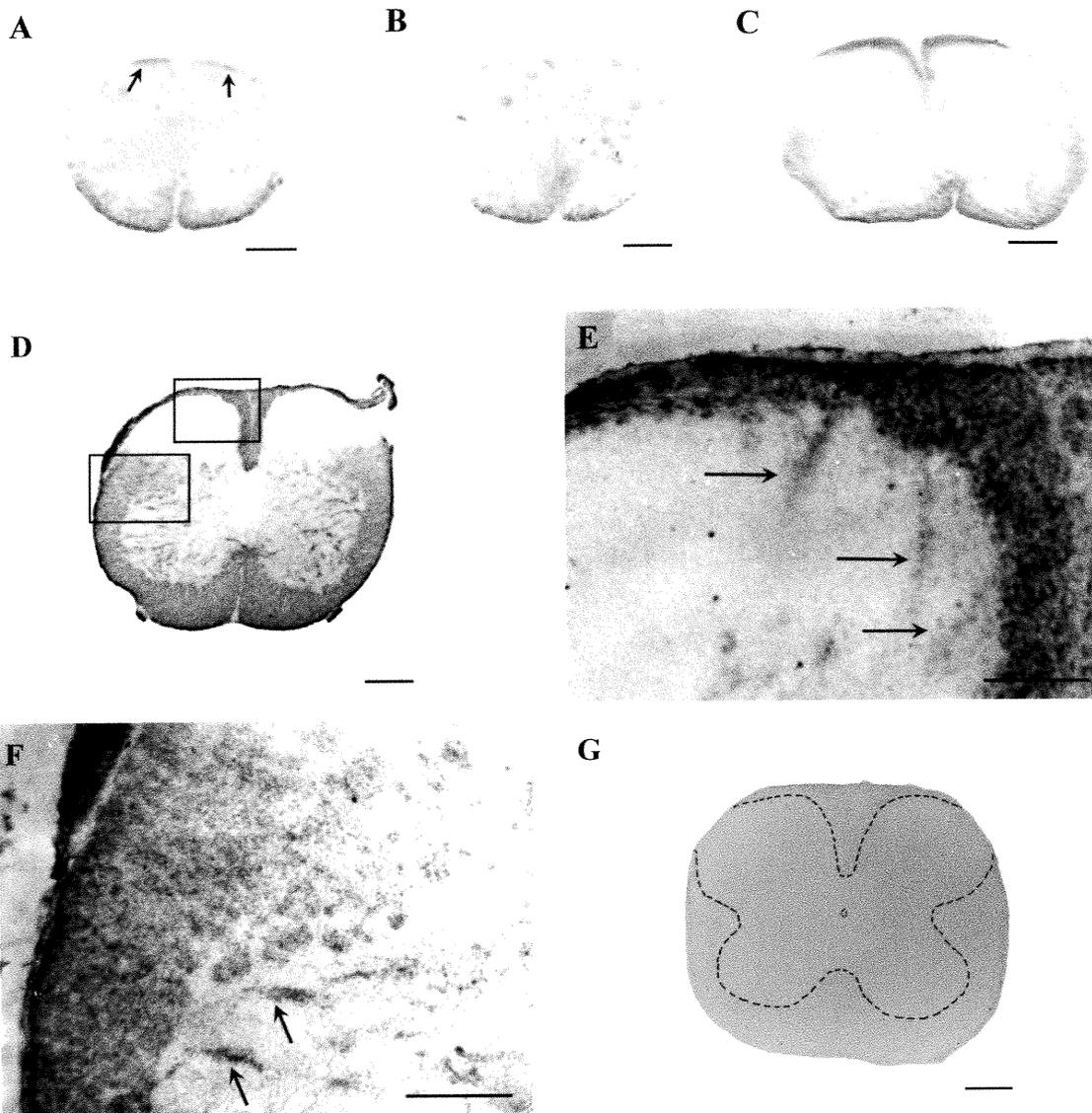


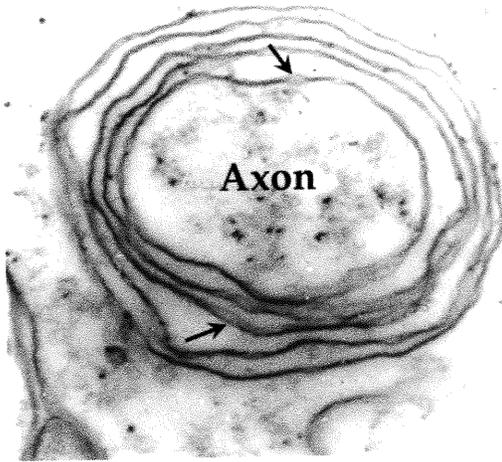
Figure 4

Electronmicrographs of the ventral marginal zone at lumbosacral level in a P1 opossum and at P24, showing an axon surrounded by either a few loose rings of membranes (A) or numerous tightly rolled membranous rings (B).

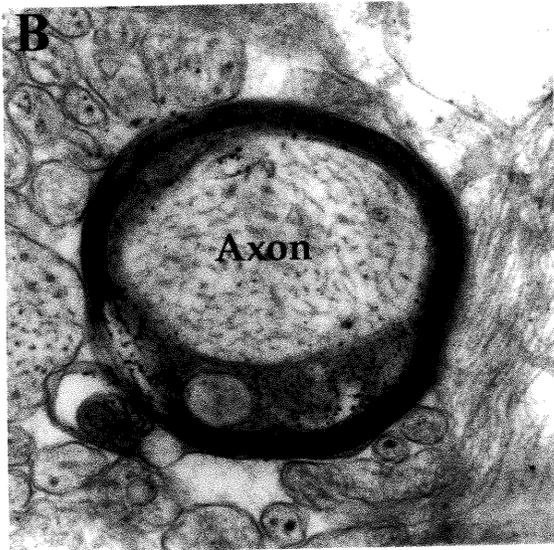
The arrows point to small spaces between two membranous layers of a given ring.

Magnifications: A = 40,000X and B = 20,000X.

A



B



3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Des études sur la myélogénèse de la moelle épinière ont été effectuées chez l'opossum *Monodelphis domestica* afin de voir quelles corrélations existent avec les autres événements de la formation des différentes voies motrices et avec l'apparition et la maturation des comportements moteurs, tels qu'étudiées précédemment dans ce laboratoire.

La technique d'immunohistochimie utilisée pour ce projet a permis la mise en évidence de deux protéines de la myéline centrale, la MBP (myelin basic protein) et la PLP (proteolipid protein). Bien que cette méthode ne permette pas le dénombrement exact des fibres myélinisées, comme l'ont effectué Leblond et Cabana (1997) pour les fibres périphériques dans les racines ventrales et dorsales, à leur sortie de la moelle épinière, elle donne néanmoins de bonnes indications quant au commencement et au déroulement de la myélinisation dans les renflements brachial et lombosacré de la moelle épinière de l'opossum. Des études en microscopie électronique sur un petit nombre d'animaux ont fourni des observations anatomiques pertinentes complémentaires. Ainsi, à la naissance, quelques rares fibres nerveuses de petit diamètre sont entourées de quelques membranes plutôt lâches provenant présumément de prolongements d'oligodendrocytes. On retrouve ces fibres dans la zone marginale de la corne ventrale dans les deux renflements de la moelle épinière. Il s'agit donc des toutes premières étapes de la myélogénèse dans la moelle épinière, et ces rares fibres, que l'on ne peut considérer comme étant myélinisées, ne contiennent vraisemblablement pas

suffisamment de protéines, MBP ou PLP, pour être détectées en immunohistochimie en microscopie photonique. En effet, le marquage immunohistochimique n'apparaît que dans la 2^e semaine de vie postnatale, au niveau du renflement brachial. Ainsi, la myélogénèse dans les renflements de la moelle épinière s'effectue presque entièrement durant la vie postnatale de l'opossum. L'augmentation graduelle du marquage dans les semaines qui suivent, tout d'abord dans la matière blanche présumptive et par la suite dans la matière grise, est associée à une augmentation du nombre de fibres entourées d'anneaux de membranes, et du nombre d'anneaux membranaires autour d'elles, ainsi que de leur compactage qui forme ce qui peut être appelé myéline.

3.1 Gradients de formation

Le patron d'immunomarquage révèle trois gradients de la myélogénèse dans les renflements spinaux pendant le développement de l'opossum. D'abord un gradient rostrocaudal: la myélogénèse commence dans le renflement brachial avant le renflement lombosacré. Un deuxième gradient ventrodorsal est visible dans la matière blanche et la matière grise. Les régions de la matière blanche deviennent myélinisées dans l'ordre suivant : la portion ventrale en premier, suivie des portions ventrolatérale, latérale et dorsale, et, finalement, la portion dorsolatérale. La myéline apparaît dans la corne ventrale avant la corne dorsale. Un gradient général "périphérie-centre" s'ajoute au gradient précédent, toujours dans la matière blanche et la matière grise. Ces trois gradients de la myélogénèse correspondent à ceux du développement général de la moelle épinière de l'opossum observés à partir de coupes histologiques ou dévoilés par

les expériences mentionnées plus tôt, en plus de correspondre à ce qui est retrouvé chez le rat (Altman et Bayer, 1984), notamment en ce qui concerne la production des neurones et des cellules gliales, ainsi que la formation des racines ventrales et dorsales. Les gradients d'apparition des protéines de la myéline dans la moelle épinière sont comparables à ceux de l'expression des protéines synaptiques (Gingras et Cabana, 1999), mais la myélogénèse est retardée d'environ 2 semaines par rapport à la synaptogénèse, et elle s'étale sur une plus longue période. La séquence de marquage des protéines de la myéline dans les renflements spinaux de *M. domestica* ressemble à ce qui a été rapporté pour la MBP chez l'opossum nord-américain *Didelphis virginiana* (Ghooray et Martin, 1993), bien que ces événements commencent plus tard et se déroulent sur une plus longue période chez cette dernière espèce.

Nous pouvons comparer les résultats obtenus quant à la localisation et l'intensité du marquage immunohistochimique de la MBP et la PLP avec ce qui a été étudié antérieurement du développement des voies ascendantes et descendantes, particulièrement par traçage neuronal. Une partie du marquage précoce des protéines de la myéline observé dans la 2^e semaine pourrait provenir d'axones moteurs formant les racines ventrales. Chez le nouveau-né et les jeunes opossums, quelques axones moteurs sont retrouvés dans les membres antérieurs et postérieurs, mais ils sont très immatures (Barthélemy et Cabana, 2001a, b). Une étude quantitative des racines ventrales entières en microscopie photonique chez *M. domestica* a montré que les premiers axones myélinisés peuvent être identifiés à P9 au niveau brachial et à P13 au niveau lombosacré (Leblond et Cabana, 1997), ce qui correspond sensiblement à ce observé ici dans la zone

marginale ventrale des renflements spinaux dans la présente étude. Les premiers axones myélinisés dans la portion externe du funicule ventral et dans la partie ventromédiane, dans la 2^e semaine, proviennent probablement du noyau vestibulaire latéral et de la formation réticulée médullaire. Ces projections du tronc cérébral sont les premières à croître dans la moelle épinière de l'opossum (Wang et al., 1992; Pflieger et Cabana, 1996). Langworthy (1928) a démontré, en utilisant la méthode de coloration de Weigert-Pal, que le nerf vestibulaire et le faisceau vestibulospinal sont les premiers à être myélinisés chez une autre espèce d'opossums, *Didelphis virginiana*. Le marquage de la matière blanche présomptive ventrolatérale et latérale provient d'axones descendant de la formation réticulée médullaire et pontique. Le marquage dans la portion la plus externe de la matière blanche, observé à partir de la 3^e semaine, met probablement en évidence les longues projections ascendantes, comme les faisceaux spinoréticulaires et spinothalamiques, et celui de la portion externe du funicule latéral, aussi bien ventralement que dorsalement, les projections spinothalamiques plus tardives (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995). Le marquage retrouvé dans le funicule dorsal provient des afférences primaires remontant les cordons dorsaux (Qin et al., 1993; Desrosiers, 1995; Knott et al., 1999). Le marquage de la zone marginale interne de tous les funicules appartient probablement aux projections propriospinales, incluant les longues projections reliant les deux renflements spinaux, formées majoritairement durant les 2 à 3 premières semaines postnatales (Cassidy et al., 1993). La portion du funicule dorsolatéral marquée en dernier contient des axones du faisceau rubrospinal. Ce faisceau est en réalité le dernier système descendant majeur à se former chez l'opossum, vers la 6^e semaine (Wang et al., 1992). Il faut spécifier que les projections néocorticales ne se

rendent qu'au premier segment cervical et ne pénètrent pas dans la matière grise chez *M. domestica* (Cabana et al., 1992).

Le marquage tardif des fibres propriospinales peut sembler intrigant, tenant compte qu'elles sont formées avant ou au même moment que plusieurs projections du tronc cérébral qui, elles, sont marquées plus tôt pour les protéines de la myéline. Règle générale, les axones propriospinaux possèdent de plus faibles diamètres que les longs axones reliant le tronc cérébral et la moelle épinière, et ils sont peu ou non myélinisés (Bear et al., 1996). La plus faible quantité de myéline autour des fibres propriospinales et la présence de fibres non myélinisées parmi elles pourraient expliquer le fait qu'elles soient plus difficilement discernables durant les stades précoces. Chez les opossums plus âgés et les adultes, le marquage dans les régions de la matière blanche contenant les faisceaux propriospinaux est plus pâle et moins dense que dans les régions où se trouvent les voies descendantes et ascendantes reliant la moelle épinière à l'encéphale. Dans la matière grise, l'ensemble des laminae de la corne ventrale et dorsale sont myélinisées. Par contre, les laminae les plus dorsales sont plus légèrement marquées pour les protéines de la myéline. Cette région est pourvue de nombreuses fibres de petit diamètre non myélinisées ou faiblement myélinisées, responsables notamment de la perception de la douleur.

Il existe un délai de quelques jours entre le moment où les axones moteurs sont marqués pour les protéines de la myéline dans le funicule ventral (P11 pour la MBP dans le BR) et le moment où les afférences des racines dorsales sont marquées dans le

funicule dorsal (P16 pour la MBP au même niveau). Leblond et Cabana (1997) ont rapporté un délai similaire entre la myélinisation des racines ventrales et des racines dorsales correspondantes, en comptant les fibres myélinisées de sections semi-fines des racines, tel que déjà mentionné.

Les patrons de marquage de la MBP et de la PLP sont semblables en de nombreux points, sauf que le marquage de la MBP est visible légèrement plus tôt, une différence de 1 à 2 jours. Dubois-Dalcq et al. (1986) ont démontré, à partir de préparations de cultures cellulaires *in vitro*, que la MBP apparaît avant la PLP au cours du développement. Les fonctions respectives de ces protéines dans le phénomène de compactage de la myéline nous permettent de mieux comprendre cette observation. La MBP semble établir des jonctions intracellulaires adhésives à l'intérieur d'une membrane d'un prolongement d'oligodendrocyte lorsque celui-ci s'enroule autour d'une fibre nerveuse (Readhead et al., 1987; Brophy et al., 1993). La PLP semble plutôt relier les feuillettes membranaires de deux prolongements adjacents d'oligodendrocyte, stabilisant davantage la gaine de myéline (Klugmann et al., 1997; Nadon et West, 1998). Ceci pourrait expliquer la détection légèrement plus précoce de la MBP dans notre matériel immunohistochimique.

3.2 Myélogénèse et comportements moteurs

La majorité des comportements locomoteurs se développent postnatalement chez l'opossum, à l'exception des mouvements simples du tronc et des membres antérieurs

(MA) observés chez le nouveau-né. Pflieger et al. (1996) ont décrit ce développement en quatre périodes d'environ 10 jours chacune, décrites plus en détail en Introduction. Au cours de la première période (P1 à P10), l'opossum est attaché à la mère et bouge les MA de façon rythmique et alternée; les membres postérieurs (MP) sont immobiles. Aucun réflexe simple n'est exprimé par les MA durant cette période. Le réflexe d'empoignement ne pouvant être reproduit suite à une stimulation tactile, Cassidy et al. (1994) ont émis l'hypothèse que ce mouvement, observé dès la naissance, est d'abord purement moteur et que la composante sensorielle est mise en place plus tard, vers 2 semaines. Durant la première période, les protéines de la myéline n'ont pas été détectées dans les renflements spinaux, et seulement quelques fibres entourées d'anneaux membranaires ont été recensées en microscopie électronique. Les racines ventrales et dorsales ne contiennent aucune fibre myélinisée (Leblond et Cabana, 1997). Cette première période de développement moteur pourrait être qualifiée de "prémyélinisation", car quelques fibres ne font que commencer à se myéliniser.

Pendant la seconde période de développement locomoteur (P11 à P20), l'opossum est encore attaché à la mère et bouge les MA avec plus de force, tandis que les MP se développent rapidement et commencent à bouger. Si l'on détache l'opossum de la mère, un mouvement de pivotement autour de l'arrière-train peut être observé. Le réflexe d'empoignement est exprimé avec certitude à la fin de cette période, mais aucun autre réflexe purement spinal n'a été observé. Le réflexe de redressement sur une surface, nécessitant l'extéroception et la proprioception du corps ainsi que l'apport du système vestibulaire, commence à être exprimé (Cassidy et al., 1994). Les protéines de la

myéline sont détectées pour la première fois dans le BR, au début de cette période, et dans le LS, au milieu de la période, dans la zone marginale ventrale et ventrolatérale d'abord, et dans la corne dorsale par la suite. Environ 65% des fibres de la racine ventrale sont myélinisées au niveau brachial vers la fin de la période, contre 30% au niveau lombosacré. Par contre, seulement 15% et 5% des fibres de la racine dorsale sont myélinisées au niveau du BR et du LS, respectivement, et ces fibres ne sont pas complètement myélinisées (Leblond et Cabana, 1997). Quelques fibres sont considérées comme étant myélinisées dans la moelle épinière durant la seconde période de développement moteur. Ainsi, une myélinisation minimale semble être nécessaire à l'expression des réflexes sensorimoteurs simples.

La 3^e période de développement moteur (P21 à P30) est caractérisée par le jeune opossum qui commence à se détacher de la mère. Ses MP peuvent alors supporter le poids corporel et la locomotion quadrupède linéaire apparaît, bien qu'elle soit plutôt lente et sur de courtes distances (Pflieger et al., 1996). Les réflexes d'empoignement, de retrait et de sautillerment se développent rapidement, dans les MA d'abord, et dans les MP ensuite, et le réflexe de redressement devient mature (Cassidy et al., 1994). La plupart des actes moteurs possèdent néanmoins une expression immature ; l'animal semble maladroit et son répertoire comportemental demeure limité. Cette période correspond à une myélinisation intense dans l'ensemble de la matière blanche aux niveaux brachial et lombosacré, mais elle reste encore incomplète. De plus, la myélogénèse ne fait que commencer dans la matière grise.

La 4^e période (P31 à P40) permet l'observation d'une évolution rapide des habiletés locomotrices de l'opossum. Les comportements locomoteurs acquièrent une expression presque adulte vers la fin de cette période, au moment où le support du poids corporel et la coordination interarticulaire pendant la locomotion sont satisfaisants. La durée du cycle de la marche est par contre plus courte que chez l'animal adulte ; le jeune opossum marche en effet plus rapidement (Pflieger et al., 1996). Le redressement corporel dans l'air, qui nécessite l'apport du cervelet, est exprimé pendant cette période (Cassidy et al., 1994). Cette 4^e période est caractérisée par une augmentation de l'intensité du marquage des protéines de la myéline dans toutes les régions de la matière blanche, et cela, dans les deux renflements spinaux, signifiant qu'un plus grand nombre de fibres sont myélinisées et que la gaine de myéline s'épaissit. La matière grise est bien marquée, ce qui suggère que les fibres contenues dans les voies innervant les renflements spinaux sont myélinisées jusqu'à leurs terminaisons. Le réflexe de redressement dans l'air se stabilise plus tard, vers P45, parce que le cervelet se développe et acquiert sa pleine maturité dans les semaines suivantes. Parallèlement, un excès de fibres myélinisées a été observé dans les racines ventrales et dorsales des renflements correspondants (Leblond et Cabana, 1997). Le raffinement de la trajectoire et la vitesse d'exécution des comportements moteurs, au moment où un surplus de fibres myélinisées peut être observé, nécessitent une myélinisation encore plus poussée (Hildebrand et al., 1993).

L'étude de la synaptogenèse (Gingras et Cabana, 1999) a permis d'établir un lien entre la disparition du marquage des protéines synaptiques dans la matière blanche et

l'arrêt de la croissance des voies nerveuses centrales, de même que le début de la myélogénèse dans les racines ventrales et dorsales des deux renflements spinaux (Leblond et Cabana, 1997). Si la synaptogénèse correspond à l'apparition des comportements moteurs, la myélogénèse correspondrait davantage à leur maturité.

3.3 Avantages et inconvénients de l'utilisation de *M. domestica*

Les études développementales nécessitant l'utilisation d'animaux d'âge croissant occasionnent souvent des périodes d'attentes parfois longues avant d'obtenir un animal d'un âge particulier: ce fut le cas de la présente étude. Les accouplements en captivité n'étant pas toujours fructueux, il a fallu s'armer de patience. L'acquisition des différentes techniques chirurgicales a demandé un temps considérable, les tissus nerveux du jeune opossum étant très immatures, donc difficiles à manipuler.

L'opossum s'est néanmoins révélé une espèce par excellence pour étudier l'évolution de la myélogénèse dans la moelle épinière. Ce phénomène a lieu presque entièrement durant la vie postnatale de l'animal, et sur une période de plusieurs semaines, ce qui a permis d'en décrire en détail les séquences de la myélogénèse et de faire des corrélations avec d'autres événements reliés au développement de la moelle épinière et avec les comportements moteurs simples étudiés précédemment au laboratoire. Les propriétés uniques à la myélogénèse dans la moelle épinière de *Monodelphis domestica* font de cette espèce un modèle idéal pour d'éventuelles expérimentations sur la régénération de la moelle épinière.

3.4 Perspectives

Le système vestibulaire joue un rôle important dans le contrôle de la posture et de l'équilibre dans la locomotion (Kandel et al., 2000). Des expériences de traçage neuronal ont démontré que l'ensemble des composantes du système vestibulaire de l'opossum sont présentes à la naissance, tant au niveau du complexe vestibulaire comprenant les noyaux vestibulaires, des afférences vestibulaires, ou encore des projections vestibulospinales. Le labyrinthe vestibulaire a une apparence très immature (Pflieger et Cabana, 1996). Une étude de la myélogénèse du système vestibulaire est présentement en cours, et nous permettra de faire des parallèles intéressants avec les études des réflexes et des comportements locomoteurs, ainsi qu'avec la présente étude dans la moelle épinière de l'opossum. Des résultats préliminaires montrent qu'il n'y a aucun immunomarquage pour les protéines de la myéline dans l'oreille interne, le nerf et les noyaux vestibulaires de l'opossum nouveau-né. La myélogénèse commence durant la 1^{re} semaine dans le ganglion vestibulaire, suivi du labyrinthe et du nerf vestibulaire. Les composantes de l'oreille interne, comme la saccule-utricule, sont marquées dans la 3^e semaine, suivies par les afférences vestibulaires et les noyaux vestibulaires, en débutant par le noyau vestibulaire latéral, dans la 4^e semaine. Des expériences plus poussées fourniront davantage d'indices quant au moment où les différentes structures formant le système vestibulaire sont marquées pour la MBP et la PLP. Dès lors, il sera possible d'établir des liens entre la myélogénèse dans le système vestibulaire et la myélogénèse dans la moelle épinière, ainsi qu'avec les différentes études des réflexes et des comportements locomoteurs.

Il serait intéressant de compléter l'étude de la myélogénèse dans les renflements de la moelle épinière, en plus des travaux en cours sur la myélogénèse du système vestibulaire, avec l'étude de la synaptogénèse dans le cerveau (à compléter) et des travaux d'immunohistochimie sur les neurotransmetteurs et leurs différents récepteurs (à entreprendre sous peu). Il sera ainsi possible de dresser un portrait plus complet de l'impact des différentes composantes dans l'ontogénèse des systèmes moteurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*.

BIBLIOGRAPHIE

Alliquant B, Stangaitis SM, D'Urso D, Colman DR. 1991. The ectopic expression of myelin basic protein isoforms in Shiverer oligodendrocytes: implications for myelinogenesis. *J Cell Biol* 133:393-403.

Alstermark B, Kümmel H, Pinter MJ, Tantisira B, 1987a. Branching and termination of C3-C4 propriospinal neurons in the cervical spinal cord of the cat. *Neurosci Lett* 74:291-296.

Alstermark B, Lundberg A, Pinter M, Sasaki S. 1987b. Long C3-C4 propriospinal neurons in the cat. *Brain Res* 404:382-388.

Altman J, Bayer SA. 1984. The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol* 85:1-166.

Altman J, Sudarshan K. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 23:896-920.

Amur-Umarjee SG, Hall L, Campagnoni AT. 1990. Spatial distribution of mRNAs for myelin proteins in primary cultures of mouse brain. *Dev Neurosci* 12:263-272.

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

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

Barthélemy D, Cabana T. 2001b. Synaptogenesis in the hindlimb of the opossum *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abst* 26:167.1..

Bartsch U, Peshava P, Raff M, Schachner M. 1993. Expression of janusin (J1-160/180) in the retina and optic nerve of the developing and adult mouse. *Glia* 9:57-69.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 1996. *Neuroscience: exploring the brain*. Williams & Wilkins, USA.

Bischoff A, Thomas PK. 1984. Microscopic anatomy of myelinated nerve fibers. Dans: *Peripheral Neuropathy, Vol 1*. (Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, and Bunge R, eds.), Saunders WB, Philadelphia, pp.104-130.

Brophy PJ, Boccaccio GL, Colman DR. 1993. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *TINS* 16:515-521.

Brunjes PC, Jazaeri A, et Sutherland MJ. 1992. Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (the grey short-tailed opossum). *J Comp Neurol* 320:544-554.

Bunge RP. 1968. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48:197-251.

Cabana T. 2000. The development of mammalian motor systems : the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53:615-626.

Cabana T, Desrosiers C, 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, Martin GF. 1986. Development of projections from somatic motor-sensory areas of neocortex to the diencephalon and the brainstem in the North American opossum. *J Comp Neurol* 251:506-516.

Campagnoni A. 1995. Molecular biology of myelination. Dans : *Neuroglia*. (Kettenmann H, et Ransom BR., eds.), Oxford University Press, New York, pp. 550-570.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. 1994. The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 43:244-253.

Cassidy G, Cabana T. 1993. The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 72:291-299.

Colello RJ, Pott U. 1997. Signals that initiate myelination in the developing mammalian nervous system. *Molec Neurobiol* 15:83-100.

Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD. 1982. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95:598.

Compston A, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, Shaw C, Wood A, Scolding N. 1997. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat* 190:161-200.

Demerens C, Stankoff B, Logak M, Angalde P, Allinquant B, Conrad F, Zalc B, Lubetzki C. 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9887-9892.

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

Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA. 1986. Emergence of three proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102:384.

Duncan DJ. 1934. A relation between axon diameter and myelination as determined by measurements of myelinated spinal rat fibers. *J Comp Neurol* 60:437-472.

Dyer CA, Benjamins JA. 1989. Organization of oligodendroglial membrane sheets. I: Association of myelin basic protein and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase with cytoskeleton. *J Neurosci Res* 24:201-211.

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

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

Freysz L, Horrocks LA. 1980. Regulation of the metabolism of myelin phospholipids. Dans: Neurological mutations affecting myelination. (Baumann NA, ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 223.

Ghooray GT, Martin GF. 1993. The development of myelin in the spinal cord of the North American opossum and its possible role in loss of rubrospinal plasticity. A study using myelin basic protein and galactocerebroside immuno-histochemistry. *Dev Brain Res* 72:67-74.

Gingras J, Cabana T. 1998. The development of synaptophysin-like immunoreactivity in the lumbosacral enlargement of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 106:211-215.

Gingras J, Cabana T. 1999. Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:551-560.

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

Gyllensten L, Malmfors T. 1963. Myelination of the optic nerve and its dependence on visual function : a quantitative investigation in mice. *J Embryol Exp Morphol* 11:255-266.

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartar C. 1993. Myelinated nerve fibers in the CNS. *Progr Neurobiol* 40:319-384.

Illert M, Lundberg A, Padel Y, Tanaka R. 1978. Integration in descending motor pathways controlling the forelimbs in the cat. 5. Properties of and monosynaptic excitatory converge on C3-C4 propriospinal neurons, *Exp Brain Res* 33:101-130.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Companies. USA, fourth edition.

Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA. 1997. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.

Knott GW, Kitchener PD, Saunders NR. 1999. Development of motoneurons and primary sensory afferents in the thoracic and lumbar spinal cord of the South American opossum *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414:423-436.

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

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

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

Langworthy OR. 1928. The behavior of pouch-young opossums correlated with the myelination of tracts in the nervous system. *J Comp Neurol* 46:201-247.

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

Lemke G. 1988. Unwrapping the genes of myelin. *Neuron* 1:535-543.

Lubetzki C, Demerens C, Anglade P, Villarroya H, Frankfurter A, Lee WMY, Zalc B. 1993. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:820-824.

MacLaren RE. 1996. Expression of myelin proteins in the opossum optic nerve: late appearance of inhibitors implicates an earlier non-myelin factor in preventing ganglion cell regeneration. *J Comp Neurol* 372:27-36.

Martenson RE. 1992. Myelin: biology and chemistry. (Martenson RE, Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL.

Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M. 1995. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci* 15:4488-4495.

Miller S. 1970. Excitatory and inhibitory propriospinal pathways from lumbo-sacral to cervical segments in the cat. *Acta Physiol Scand* 80:25A-26A.

Morell P. 1984. *Myelin*. New York, Plenum.

Nadon NL, West M. 1998. Myelin proteolipid protein: function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci* 20:533-539.

Norton WT, Cammer W. 1984. Isolation and characterization of myelin. Dans: *Myelin*, 2nd ed. (P. Morell, ed.) Plenum press, New York 147-195.

Peters A, Vaughn JE. 1970. *Myelination*. Thomas, Springfield, Il. Pp. 3-79.

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3:191-197.

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

Qin YQ, Wang XM, Martin GF. 1993. The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 75:75-90.

Raff MC. 1989. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 243:1450-1455.

Ranvier L. 1871. Recherches sur l'histologie et la physiologie des nerfs. *Ach Physiol I Sér 4*, 129.

Readhead C, Popko B, Takahashi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman RL, Hood L. 1987. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell* 48:703-712.

Richardson WD, Raff MC, Noble M. 1990. The oligodendrocyte type-2-astrocyte lineage. *Semin Neurosci* 2:445-454.

Tauber H, Waehnoldt TV, Neuhoff V. 1980. Myelination in rabbit optic nerves is accelerated by artificial eye opening. *Neurosci Lett* 16:235-238.

ten Donkelaar HK. 1999. Development and regenerative capacity of descending supraspinal pathways in tetrapods: A comparative approach. *Adv Anat Embryol* 154:1-145.

Tyncale-Biscoe CH, Janssens PA. 1987. *The developing marsupial: models for biomedical research*. Springer-Verlag, New York.

Umemori H, Kadowaki Y, Hirosawa K, Yoshida Y, Hironaka K, Okano H, Yamamoto T. 1999. Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase for myelination. *J Neurosci* 19:1393-1397.

Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. 2000. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53:635-647.

Voyvodic JT. 1989. Target size regulates caliber and myelination of sympathetic axons. *Nature* 342:430-433.

Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF. 1992. The origin of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res* 68:203-206.

Wilson R, Brophy P. 1989. Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22:439-448.

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

Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. 1994. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 12:1353-1362.

Zeller NK, Nehar TN, Dubois-Dalcq ME, Lazzarini RA. 1985. The timely expression of myelin basic protein gene in cultured rat brain oligodendrocytes is dependent of continuous neuronal influences. *J Neurosci* 5:2955-2962.

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. 1999. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, London.