

Université de Montréal

**Expression des cotransporteurs cation-
chlorure KCC2 et NKCC1 au cours du
développement de la moelle épinière de
l’opossum *Monodelphis domestica***

par

Ha-Loan Phan

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

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

Août, 2010

© Ha-Loan Phan, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Expression des cotransporteurs cation-chlorure KCC2 et NKCC1 au cours du développement de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica*

Présenté par :
Ha-Loan Phan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Thérèse Cabana, président-rapporteur
Dr Jean-François Pflieger, directeur de recherche
Dr Laurent Vinay, membre du jury

Abréviations utilisées

ADRA1	récepteur α -1
BH	faisceau de His (His bundle)
cc	canal épendymaire
cd	corne dorsale
ChAT	choline acétyltransférase
$[Cl^-]_i$	concentration interne en ions chlorure
Cl^-	ion chlorure
CPG	générateurs centraux de rythme (central pattern generators)
cv	corne ventrale
DRG ou g	ganglion dorsal
E	jour embryonnaire
fd	funicule dorsal
fl	funicule latéral
fv	funicule ventral
KCC2	cotransporteur potassium-chlorure de type 2
MB	matière blanche
MG	matière grise
MN	motoneurones

NA	noradrénaline
n	nerf
NGS	sérum naturel de chèvre (natural goat serum)
NKCC1	cotransporteur potassium-calcium-chlorure de type 1
P	jour postnatal
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PPL	voies propriospinales descendantes longues
SNC	système nerveux central
rd	racine dorsale
rv	racine ventrale
SNP	système nerveux périphérique
TRDA	texas-red couplé à des dextran aminés
TH	tyrosine hydroxylase
v	vertèbre
zi	zone intermédiaire
zm	zone marginale
zv	zone ventriculaire

Résumé

L'inhibition est nécessaire à la génération d'*outputs* coordonnés entre muscles antagonistes lors de la locomotion. Une baisse de la concentration neuronale en ions chlorure au cours du développement des mammifères conduit à l'émergence de l'inhibition. Cette baisse repose sur l'équilibre entre deux cotransporteurs cation-chlorure, KCC2 et NKCC1. KCC2 expulse Cl^- de la cellule alors que NKCC1 pompe Cl^- dans la cellule. L'opossum *Monodelphis domestica* naît dans un état très immature. Le seul comportement locomoteur qu'il présente à la naissance consiste en des mouvements rythmiques et alternés des membres antérieurs pour grimper le long du ventre de la mère vers une tétine. Les membres postérieurs sont des bourgeons immobiles dont le développement est en grande partie postnatal. Pour cette raison, cette espèce constitue un modèle idéal pour l'étude du développement locomoteur. Afin d'étudier les mécanismes conduisant à l'émergence de l'inhibition durant le développement moteur, nous avons décrit l'expression développementale de KCC2 et NKCC1 chez l'opossum postnatal par immunohistochimie au niveau des renflements spinaux. Les motoneurones et afférences primaires ont été identifiés en utilisant un marquage rétrograde au TRDA. Le marquage pour KCC2 et NKCC1 est détecté dans la moelle épinière ventrale dans la matière grise et blanche présomptive dès la naissance, ce qui suggère que l'inhibition serait déjà mise en place avant la naissance, permettant subséquemment l'alternance des membres antérieurs observée chez les nouveau-nés. L'expression développementale de KCC2 et NKCC1 suit des gradients ventrodorsal et médiolatéral, tels qu'observés chez les rongeurs (rats et souris). Le patron mature d'expression de ces cotransporteurs est observé aux alentours de la 5^{ème} semaine postnatale lorsque la locomotion de l'opossum est mature. Enfin, entre la naissance et P5, les dendrites exprimant KCC2 au niveau de la corne dorsale sont retrouvées en apposition aux afférences primaires ce qui suggère un rôle de KCC2 dans la formation des circuits sensori-moteurs.

Mots-clés : cotransporteurs cation-chlorure, développement, inhibition, locomotion, mammifères, moelle épinière.

Abstract

Inhibition is necessary to generate coordinated outputs between antagonistic muscles during locomotion. Inhibition is set by a lowering in neuronal chloride concentration during mammalian development. This lowering relies on the proper balance between two cation-chloride cotransporters, KCC2 and NKCC1. KCC2 extrudes Cl^- out of the cell while NKCC1 pumps Cl^- into the cell. The opossum *Monodelphis domestica* is born at a very rudimentary stage of development. Newborn opossums show rhythmic and alternate movements of the forelimbs as they crawl on the mother's belly to a nipple. The hindlimbs are immobile paddle-shaped buds and their development is mostly postnatal. Thus, this species is an ideal model to study motor development. In order to investigate the mechanisms involved in the appearance of inhibition during motor development, we described the developmental expression of KCC2 and NKCC1 on postnatal opossums using immunohistochemistry in the spinal cord enlargements. Motoneurons and primary sensory afferents were identified using retrograde labeling with TRDA. Immunolabeling for both KCC2 and NKCC1 is detected in the ventral spinal cord in the presumptive grey and white matter from birth on, suggesting that the development of inhibition begins before birth, enabling the alternate movements exhibited by the newborns. The developmental expression of KCC2 and NKCC1 follows ventrodorsal and mediolateral gradients, similar to those demonstrated in rodents (rats and mice). The mature pattern for both cotransporters is observed around the 5th week at a time when opossums demonstrate mature patterns of locomotion. Between birth and P5, dendrites expressing KCC2 in the dorsal horn superimpose on the primary afferents, suggesting a role for KCC2 in the establishment of sensorimotor circuits.

Keywords : Cation chloride cotransporters, development, inhibition, locomotion, mammals, spinal cord.

Table des matières

Abréviations utilisées	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Remerciements	ix
1. Introduction	1
1.1 Généralités sur la locomotion	2
1.2 La moelle épinière des mammifères	4
1.2.1 Organisation générale de la moelle épinière	4
1.2.2 Développement de la moelle épinière	5
1.3 Modèle expérimental dans l'étude du développement des systèmes locomoteurs chez les mammifères : l'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	8
1.3.1 Développement des comportements locomoteurs de <i>Monodelphis domestica</i>	8
1.3.2 Ontogénie de la moelle épinière chez <i>Monodelphis domestica</i>	14
1.3.3 Ontogénie de l'innervation des membres	26
1.3.4 Activité spontanée dans la moelle épinière de l'opossum en développement	26
1.4 Développement de l'inhibition dans la moelle épinière	28
1.4.1 Vue d'ensemble des cotransporteurs cation-chlorure	28
1.4.2 KCC2, un cotransporteur cation-chlorure spécifiquement exprimé par les neurones	31
1.4.2.1 Isoformes de KCC2	32
1.4.2.2 Profil développemental des KCC2	33
1.4.2.3 Régulation de l'expression et de la fonction des KCC2	35
1.4.3 NKCC1 et ses fonctions dans le système nerveux	38
1.4.3.1 Profil développemental des NKCC1	38

1.4.3.2 Détection de NKCC1 : des résultats discordants	40
1.4.4 KCC2, NKCC1 et inhibition au cours du développement	42
1.5 Problématique générale	45
2. Matériel et méthodes	46
2.1 Animaux et préparation du tissu	46
2.2 Immunohistochimie	47
2.3 Spécificité des anticorps	50
2.4 Traçage rétrograde des motoneurones	50
2.5 Observation et microphotographies	51
2.6 Quantification de la fluorescence obtenue pour KCC2 et NKCC1 à l'échelle des motoneurones	51
3. Résultats	52
3.1 Immunolocalisation des KCC2 et des NKCC1 dans la moelle épinière d'opossum au cours du développement et chez l'adulte	52
3.2 Traçage neuronal au TRDA	61
4. Discussion et conclusion générale	67
5. Bibliographie	75
Annexe	92

Liste des figures

Figure 1 : Neurulation ou formation du tube neural par invagination de l'ectoderme	6
Figure 2 : Formation des synapses	7
Figure 3 : Opossum <i>Monodelphis domestica</i> au jour de sa naissance (P0)	9
Figure 4 : Développement locomoteur de l'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	14
Figure 5 : Histologie de la moelle épinière en coupe transversale chez l'opossum, coloration au bleu de toluidine	15
Figure 6 : Afférences primaires marquées au DiI au niveau du renflement lombaire chez un opossum nouveau-né (P0)	24
Figure 7 : Changement dans la réponse des motoneurones spinaux au GABA et à la glycine durant le développement prénatal des rongeurs	44
Figure 8 : Expériences contrôles pour l'anticorps anti-KCC2	48
Figure 9 : Expression des KCC2 et NKCC1 dans la moelle épinière d'opossum à la naissance (P0)	53
Figure 10 : Développement de l'immunoréactivité pour KCC2 et NKCC1 dans la moelle épinière de l'opossum entre P0 et l'âge adulte	55
Figure 11 : KCC2- et NKCC1- ir dans la moelle épinière de l'opossum à P40	59
Figure 12 : Immunolocalisation au DAB de KCC2 et NKCC1 dans la moelle épinière d'opossum adulte	60
Figure 13 : Marquage au TRDA couplé à l'immunohistochimie des KCC2 et NKCC1 chez un opossum à P(0)	62
Figure 14 : Les afférences primaires segmentaires se superposent sur des neurites exprimant KCC2 chez les jeunes opossums	63
Figure 15 : Expression des cotransporteurs KCC2 et NKCC1 au niveau des motoneurones identifiés par traçage rétrograde au TRDA	66

Aux opossums du pavillon Marie-Victorin.

Remerciements

Que serait la recherche sans figures inspiratrices ?

Je tiens à remercier mon directeur de recherches et papa scientifique, le Dr Jean-François Pflieger pour son soutien attentif et constant durant mes études et recherches. En plus de m'avoir initiée à la beauté du modèle de l'opossum, il a su renforcer mes convictions d'athée et ma curiosité des choses vivantes (je me rappelle de cet insecte bizarre qu'il a trouvé près de son bureau que je n'avais jamais vu auparavant et dont j'ai déjà oublié le nom). Je remercie le Dr Thérèse Cabana, ma maman scientifique, qui en plus de prendre un certain nombre de fois mon parti, est une figure féminine avisée et expérimentée, très agréable à vivre. Je remercie le Dr Michel Anctil qui, par ses excellents cours, m'a beaucoup impressionnée avec ses connaissances en culture générale de biologie et m'a donné l'envie de suivre ses pas.

Je remercie le Dr Chris Cameron pour m'avoir permis de prendre l'intégralité des figures du présent mémoire dans son laboratoire. Je le remercie également pour les cours de biologie évolutive des invertébrés marins et les travaux pratiques qu'il a donnés à Bamfield en collaboration avec le Dr Cory Bishop. Ce mois passé en leur compagnie a été très stimulant, autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Je remercie le laboratoire du Dr Annie Angers ainsi que celui du Dr Bouchard et leurs étudiants respectifs, Guillaume et Rachel puis Nawal et Bruno ainsi que Florence leur assistante. Ils ont été d'une aide et d'une gentillesse infinies. Grâce à eux, partant de rien, j'en sais beaucoup plus sur les Western Blots...

Je remercie mes frères et sœurs scientifiques : Abdel pour ses relectures attentives, Alexe pour les potins de filles et enfin Thierry et Matthieu pour apporter leur bonne humeur et leur bon humour tous les matins. N'oublions pas les étudiants du laboratoire Angers cités plus haut, ainsi que Christelle, Maggie, Maxime, Raymond, Serguei et Syndia et les nombreux étudiants en initiation à la recherche que nous avons eus, pour avoir insufflé la vie dans ce couloir morne. C'est grâce à eux que je me sens ici chez moi.

Je remercie ma famille pour leur soutien et leur amour inconditionnels malgré la distance qui nous sépare. Sans eux, je n'en serais pas là.

Je remercie enfin Paul Gonzalez, du laboratoire Cameron, pour partager et confronter ma vie et mes idées : que serait la recherche sans passion ?

1. Introduction

Chez les tétrapodes, l'activité coordonnée de chaque articulation du corps afin de générer un mouvement rythmique et fluide des membres est essentielle à la locomotion. Des circuits neuronaux situés dans la moelle épinière génèrent des patrons d'activité de base sous-tendant les mouvements de la locomotion. Ces réseaux contrôlent l'activité des neurones moteurs (ou motoneurones) qui provoque la locomotion, soit la rythmicité de décharge des motoneurones (MN), l'activité coordonnée entre MN fléchisseurs et MN extenseurs ainsi que la synergie entre les parties gauche et droite du corps. Les réseaux neuronaux reposent sur des connexions réciproques excitatrices et inhibitrices dont l'élément clé sont les interactions entre les interneurones (IN) spinaux situés dans cette région (revue dans Grillner et Wallen, 1985 et dans Kiehn, 2006). Parmi ces interneurones, les IN excitateurs relâchent des neurotransmetteurs (NT) excitateurs tels que le glutamate ou l'acétylcholine tandis que les IN inhibiteurs relâchent des NT inhibiteurs, tels que la glycine et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). L'inhibition joue un rôle crucial dans la coordination de l'activité musculaire lors de la locomotion.

Les récepteurs ionotropiques du GABA et de la glycine sont perméables aux ions chlorure (Cl^-). Les Cl^- entrent ou sortent des cellules via ces récepteurs ionotropiques selon la concentration en Cl^- de part et d'autre de la membrane cellulaire. Ainsi, selon la concentration intracellulaire ($[\text{Cl}^-]_i$) en ions Cl^- , l'effet du GABA et de la glycine sera soit inhibiteur, soit excitateur, selon la direction du courant postsynaptique net évoqué. Or la concentration intracellulaire en ions Cl^- est régulée en majeure partie par des cotransporteurs cation-chlorure (CCC) dont les principaux représentants sont le cotransporteur K^+-Cl^- de type 2 (KCC2), qui fait entrer les Cl^- , et le cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ type 1 (NKCC1), qui fait sortir les Cl^- des cellules. Ainsi, il a été montré dans plusieurs régions du système nerveux central, dont l'hippocampe et la moelle épinière, que les CCC, en contrôlant la $[\text{Cl}^-]_i$, déterminent la polarité de la réponse cellulaire au GABA et à la glycine (revue dans Ben-Ari, 2002). Ces neurotransmetteurs entraînent une réponse

excitatrice dans les neurones immatures puis deviennent progressivement inhibiteurs au cours du développement du système nerveux (revue dans Ben-Ari, 2002).

Notre laboratoire axe ses recherches sur le développement postnatal des systèmes moteurs chez un mammifère marsupial, l'opossum *Monodelphis domestica*. Les nouveau-nés *M. domestica* sont très immatures et le développement et la maturation (entre autres des systèmes locomoteurs) s'effectuent en grande partie postnatalement, ce qui facilite les études développementales. Dans le cadre de ces recherches, nous avons choisi d'étudier l'établissement de l'inhibition qui participe à la mise en place d'un système locomoteur fonctionnel.

Ce mémoire porte sur la description de l'expression de deux CCC majeurs, KCC2 et NKCC1, au cours du développement de la moelle épinière de l'opossum *M. domestica*. Une description sommaire de la locomotion et du développement général de la moelle épinière sera établie; ensuite, nous décrirons en détail notre modèle, l'opossum *M. domestica* pour enfin terminer en établissant un lien entre les cotransporteurs cation-chlorure et la mise en place de l'inhibition nerveuse au cours du développement. Les résultats de cette étude seront présentés puis l'ensemble du travail fera l'objet d'une discussion et d'une conclusion générale.

1.1 Généralités sur la locomotion

La locomotion est primordiale à la survie des animaux. Elle sous-tend les comportements de protection, de nutrition et de reproduction. À la naissance, tous les mammifères ne présentent pas le même degré de maturité locomotrice : certains sont capables de soutenir leur poids et de marcher peu après la naissance alors que d'autres naissent très immatures et démontrent des mouvements locomoteurs limités. Les premiers sont dits *précoces* (ex.: les ongulés) et les seconds sont dits *non précoces* ou *altriciels* (ex.: les carnivores ou les rongeurs). Chez les mammifères non précoces, la période de gestation est plus courte ; par conséquent, une plus grande proportion de la

maturation du système nerveux (et plus particulièrement celle de la moelle épinière) et du développement du système musculo-squelettique s'effectue postnatalement, hors de l'utérus maternel.

Chez les mammifères quadrupèdes, la locomotion nécessite des mouvements rythmiques et coordonnés des membres au sein d'une même ceinture ainsi qu'entre les ceintures pectorale et pelvienne. La locomotion requiert : (1) la capacité de la moelle épinière à générer un rythme transmissible aux muscles, (2) une coordination de l'activité des muscles fléchisseurs et extenseurs agissant sur les articulations d'un même membre, (3) une coordination entre membres au sein d'une même ceinture et enfin, (4) une coordination entre les ceintures pectorale et pelvienne. Ces propriétés reposent sur des réseaux neuronaux, les générateurs centraux de rythme (« *central pattern generators* », CPG), qui sont situés dans les renflements cervical et lombaire de la moelle épinière. Ces renflements contiennent les motoneurones qui innervent les membres (voir section 1.2.1). La capacité à générer un rythme dépendrait d'interactions entre IN essentiellement glutamatergiques, agencés en un réseau excitateur (revue dans Kiehn, 2006 ; McCrea et Rybak, 2008).

La coordination entre les différents muscles (fléchisseurs et extenseurs) et ceintures (pectorale et pelvienne) reposerait quant à elle sur des réseaux d'IN excitateurs (principalement glutamatergiques) et inhibiteurs (GABAergiques ou glycinergiques) (Kiehn *et al.*, 1997). Lorsque l'inhibition est bloquée, les fléchisseurs et extenseurs sont activés en synchronie (Cazalets *et al.*, 1998; Beato et Nitstri, 1999 ; Pflieger *et al.*, 2002). Plusieurs populations d'interneurones ont été découvertes (Gosgnach *et al.*, 2006) dont les interneurones commissuraux glutamatergiques et glycinergiques (revus dans Kiehn, 2006) intervenant dans la coordination gauche/droite. Enfin, l'activité des CPG est modulée par l'information sensorielle issue des membres via les afférences primaires segmentaires et par l'information provenant du cerveau qui chemine vers la moelle épinière par les voies descendantes (Grillner, 2006). Cette modulation permet à l'animal d'adapter sa locomotion à l'environnement (surface lisse, dénivelé, obstacle...) et à son état physiologique général.

1.2 La moelle épinière des mammifères

1.2.1 Organisation générale de la moelle épinière

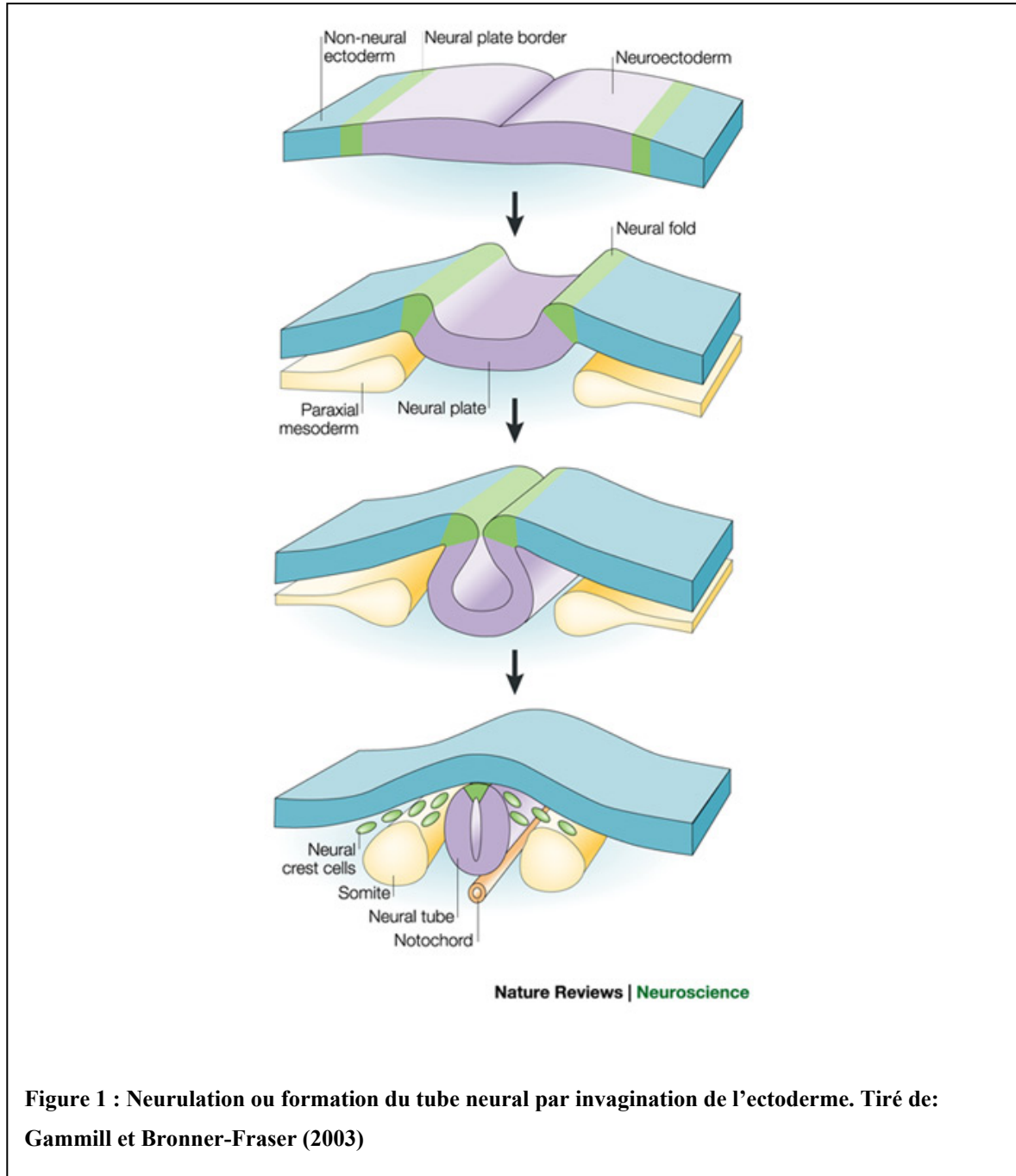
Le cerveau et la moelle épinière forment le système nerveux central (SNC). Ils sont situés dorsalement chez les vertébrés, protégés par la boîte crânienne et la colonne vertébrale. La moelle épinière est divisée dans sa longueur en régions cervicale, thoracique, lombaire, et sacrée, elles-mêmes subdivisées en segments. Il est possible de distinguer chez les mammifères deux renflements, l'un au niveau cervical et l'autre au niveau lombaire (ou lombosacré), correspondant respectivement à l'innervation plus importante des membres antérieurs et postérieurs.

En coupe transversale, la moelle épinière s'organise autour du canal épendymaire. La matière grise centrale contient les corps cellulaires des neurones tandis que la matière blanche périphérique contient les prolongements de ces corps cellulaires. La matière grise se subdivise en cornes dorsales et ventrales, respectivement orientées vers les faces dorsale et ventrale de l'animal et en une zone intermédiaire bordant le canal central. La matière blanche se subdivise en funicules dorsal, latéral et ventral qui contiennent les voies ascendantes (faisceaux d'axones dirigés vers les centres supérieurs) ou descendantes (faisceaux d'axones dirigés vers les parties plus rostrales de la moelle épinière). De part et d'autre de chaque segment de la moelle épinière partent les racines dorsale et ventrale qui se rejoignent en nerfs à la sortie de la colonne vertébrale. Les nerfs forment une partie du système nerveux périphérique (SNP). Chaque racine dorsale est formée par les prolongements centraux (axones) de cellules dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions spinaux. Les prolongements périphériques de ces cellules ganglionnaires empruntent la voie des nerfs périphériques et se terminent par les terminaisons sensorielles. Les informations sensorielles périphériques sont donc relayées par les neurones ganglionnaires et voyagent de la périphérie vers les neurones situés dans la moelle épinière (MN et IN). Les IN transmettent leurs signaux aux cellules motrices situées dans la corne ventrale, les motoneurones qui envoient ensuite la commande motrice aux muscles par les axones qui forment la racine ventrale.

1.2.2 Développement de la moelle épinière

La gastrulation met en place les trois feuillets embryonnaires (mésoderme, ectoderme, endoderme). Un cordon d'origine mésodermique situé sous l'ectoderme, la notochorde, exerce un effet inducteur sur l'ectoderme qui formera le tube neural. Au début de la neurulation (fig. 1), les cellules de l'ectoderme dorsal changent de forme et deviennent cylindriques, formant ainsi le neurectoderme. Le neurectoderme est surélevé par rapport à l'ectoderme général à ce stade du développement et porte le nom de « plaque neurale ». Les rebords de la plaque neurale (jonction entre l'ectoderme général et le neurectoderme) se soulèvent pour former les replis neuraux. Ceux-ci constituent les bords de la gouttière neurale. Les replis neuraux finissent par se rejoindre et fusionner ensemble, complétant ainsi la formation du tube neural dont la cavité est nommée neurocoele. Les cellules des replis neuraux ne sont ni incorporées dans la plaque neurale ni ne restent au niveau de l'ectoderme général. Elles forment en revanche la crête neurale, structure unique coiffant le tube neural sur sa longueur qui devient paire et métamérisée au niveau spinal. Le tube neural est l'origine du SNC alors que la crête neurale constitue la base du SNP dont les cellules sensorielles ganglionnaires et une partie du squelette céphalique.

L'épithélium initial du tube neural est simple ou pseudostratifié et devient stratifié par une division intense des cellules le constituant. On peut alors distinguer trois zones concentriques, organisées autour du neurocoele : (1) la *zone germinative* contient les cellules en activité mitotique intense ; les cellules post-mitotiques migrent ensuite vers (2) la *zone intermédiaire*, future matière grise, où elles se différencient en neurones qui envoient leurs axones vers la périphérie du tube neural, les axones créant (3) la *zone marginale* qui s'épaissit progressivement pour devenir la matière blanche, une fois les axones myélinisés. Au cours de la maturation de la moelle épinière, la zone germinative se réduit à une seule assise de cellules ciliées, l'épendyme, qui reste en contact avec le liquide épendymaire du neurocoele qui prend le nom de canal épendymaire dans la moelle épinière mature.



La croissance des axones et des dendrites constitue une étape clé du développement. Chez les mammifères, il se crée jusqu'à 10^{15} synapses potentielles (Chien, 2005). Les axones en croissance parcourent de longues distances avant de rencontrer leurs cibles choisies parmi des centaines de neurones. Il s'agit d'une étape complexe qui requiert une

signalisation complexe. La formation des synapses est précédée d'une série d'étapes (fig. 2) : l'axogénèse et la croissance dendritique, le pistage (« *pathfinding* »), la formation de branches collatérales, la reconnaissance de la cible, la sélection de la cible et l'établissement des connexions (« *branching* »). Le guidage axonal est régulé par différentes molécules de signalisation.

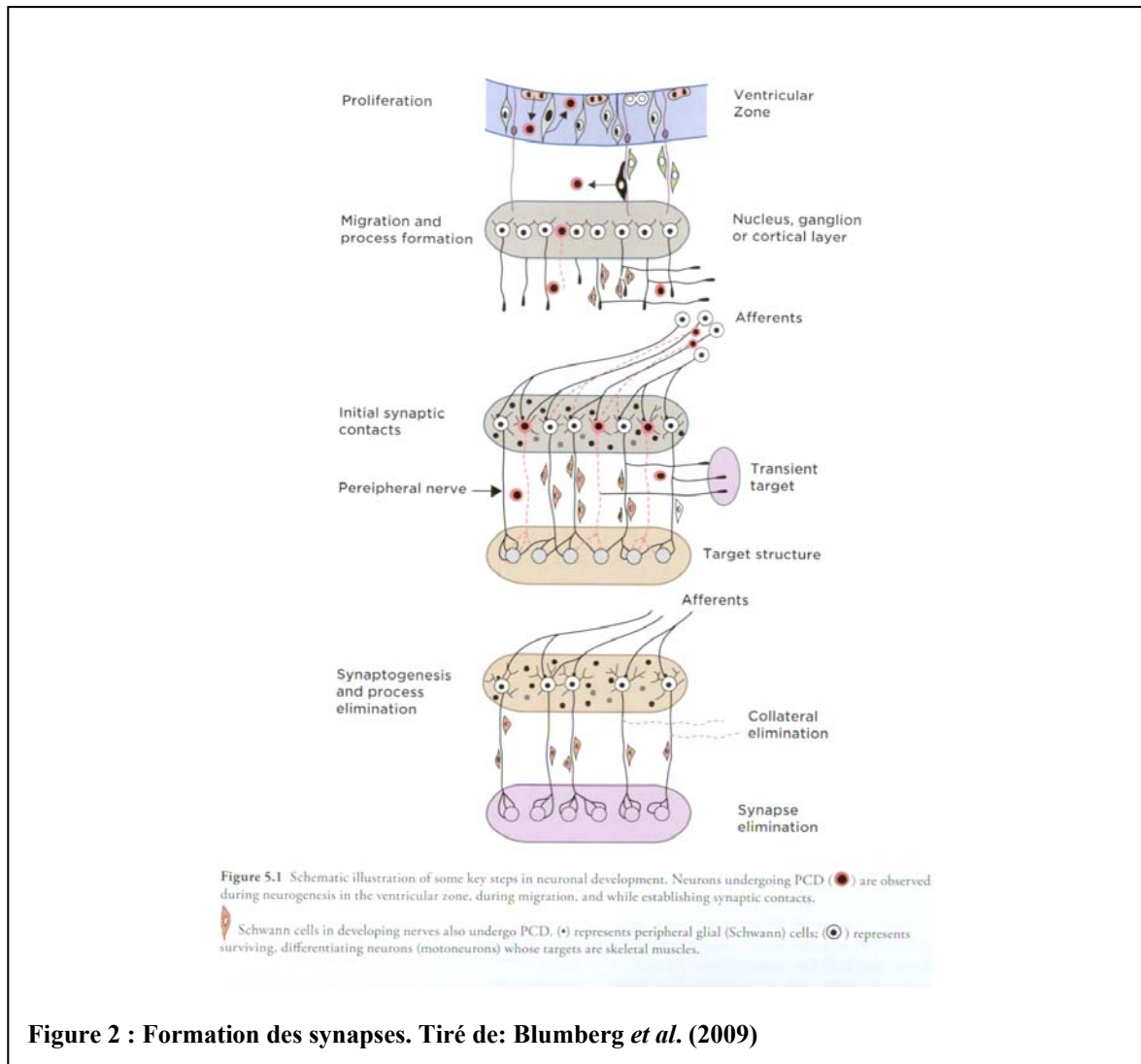


Figure 2 : Formation des synapses. Tiré de: Blumberg *et al.* (2009)

1.3 Modèle expérimental dans l'étude du développement des systèmes locomoteurs chez les mammifères : l'opossum *Monodelphis domestica*

L'opossum *Monodelphis domestica* est un marsupial originaire du Brésil. L'adulte a l'apparence d'un petit rat au pelage vert-gris foncé; il pèse une centaine de grammes (Fadem *et al.*, 1986; Kraus et Fadem, 1987; Harder *et al.*, 1993). *M. domestica* est un mammifère dit « généralisé » ou non spécialisé : ses membres antérieurs ou postérieurs ne sont pas particulièrement développés en liaison avec une spécialisation. Un exemple de mammifère « spécialisé » est le kangourou, chez qui les membres postérieurs sont extrêmement plus développés que les membres antérieurs et les membres postérieurs sont adaptés au saut. Le mode de locomotion de *M. domestica* est comparable à celui d'un rat ou d'une souris bien que ses pattes et sa queue soient plus préhensiles que chez ces derniers. Comme tous les marsupiaux, il naît dans un état très immature et subit une longue maturation postnatale fixé à l'une des tétines situées sur le ventre de la mère. Ce modèle s'élève relativement facilement en captivité : il se reproduit tout au long de l'année et peut engendrer jusqu'à 4 portées par an, d'un maximum de 13 bébés chacune. Les femelles *M. domestica* ne possèdent pas de poche marsupiale, leurs tétines sont donc exposées, ce qui facilite les observations et la cueillette des spécimens en vue des expériences.

1.3.1 Développement des comportements locomoteurs de *Monodelphis domestica*

Le développement des systèmes moteurs chez *M. domestica* s'effectue en grande partie postnatalement (revue dans Cabana, 2000). À la naissance, après 14-15 jours de gestation, le nouveau-né mesure environ 1cm et pèse approximativement 100mg (Kraus et Fadem, 1987; Harder *et al.*, 1993; Cassidy *et al.*, 1994). L'état de développement de son système nerveux correspond approximativement à celui d'une souris embryonnaire de 14 jours et

celui d'un rat embryonnaire 13 jours (Smith, 2006). Toutefois, la région caudale du crâne, la ceinture pectorale ainsi que les membres antérieurs sont légèrement plus développés que ceux de rongeurs à ces âges, probablement par adaptation à une naissance précoce (Smith, 2006). Le reste du système musculo-squelettique demeure peu développé à la naissance (Cabana, 2000) comme les membres postérieurs qui apparaissent comme des bourgeons non mobiles et on n'y distingue ni flexure ni orteils (fig. 3).



La peau du nouveau-né est rose, transparente et glabre. Les membres antérieurs sont suffisamment développés à la naissance pour permettre au nouveau-né de grimper le long du ventre de la mère par des mouvements rythmiques et alternés, du pore génital à la tétine. En effet, les épaules, les coudes et les poignets des membres antérieurs sont discernables

même si leur flexion n'est pas optimale; les doigts individualisés portent de fines griffes à leurs extrémités qui agrippent la fourrure de la mère. Ces mouvements alternés des membres antérieurs s'accompagnent de mouvements de balancements rythmiques du tronc et les membres postérieurs suivent ces mouvements passivement. Lorsqu'il atteint une tétine, le nouveau-né l'aspire. Afin de maximiser son attachement, il se crée une fusion entre l'épithélium de la bouche du nouveau-né et celui de la tétine (revue dans Cabana, 2000). L'opossum passe les trois premières semaines de sa vie postnatale attaché à la tétine de sa mère, il ne s'en sépare complètement que lors de son sevrage entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine. Ses yeux et ses méats auditifs ne s'ouvriront que vers la 5^{ème} semaine, en même temps que s'effectue l'acquisition de son pelage définitif.

Pflieger *et al.* (1996) ont étudié les comportements locomoteurs spontanés de *M. domestica* en établissant une corrélation entre l'apparition et la maturation de ces comportements et la détermination des voies neurales primordiales à la locomotion. Les résultats ont permis de diviser le développement locomoteur en 4 périodes d'une dizaine de jours chacune (fig. 4). Ces travaux complètent l'étude de Cassidy *et al.* (1994) sur les réflexes sensorimoteurs simples.

Les réflexes sensorimoteurs simples sont des composantes du répertoire moteur mature des animaux dont l'expression peut être corrélée au développement et la maturation du système nerveux. Cassidy *et al.* (1994) ont testé certains réflexes purement spinaux (comme l'empoignement, le sautillerment, la flexion et l'extension des membres) et d'autres réflexes faisant appel aux centres supraspinaux (comme le *rooting*, le redressement corporel, le placement tactile et visuel). Ces tests ont été effectués tous les jours à partir de P15 (âge à partir duquel la plupart des réflexes apparaissent) jusqu'à P55. Les réflexes étudiés, lorsque présents, sont simples à détecter car stéréotypés et faciles à évaluer. Ils sont alors enregistrés comme étant présents ou absents. Le jour d'apparition du réflexe est déterminé lorsque le réflexe est exprimé à un niveau significativement différent au niveau statistique de zéro. Le but de cette étude est de déterminer l'ordre d'apparition et de maturation de certains réflexes sensorimoteurs simples puis de les mettre en relation avec la séquence de maturation du système somatique et nerveux.

Le *rooting* est un réflexe présent de façon systématique à P15 qui diminue progressivement à partir de la troisième semaine pour enfin disparaître entièrement aux alentours de P50. Ce réflexe permet à l'animal de chercher refuge constamment auprès de la mère. Le retrait simple des membres antérieurs semble être le premier réflexe à apparaître chez l'opossum autour de la 2^{ème} semaine; celui des membres postérieurs apparaît avec un décalage de cinq jours par rapport aux membres antérieurs. Quelques jours plus tard, l'extension croisée (du membre controlatéral de la même ceinture) est observée. L'empoignement au niveau des membres antérieurs est précoce au même titre que les réflexes cités précédemment car ce mouvement est essentiel au déplacement du nouveau-né de l'orifice urogénital à la tétine qui agrippe les poils de la mère pour se hisser. Cependant, l'empoignement caractérisé comme réflexe sensorimoteur n'a pas pu être provoqué par les expérimentateurs avant P15. Ceci s'explique dans l'éventualité où l'empoignement chez le nouveau-né est généré par un générateur central de patrons qui n'est pas sous influence sensorielle. L'influence sensorielle semble se mettre en place autour de la 2^{ème} et 3^{ème} semaines postnatales (Cassidy *et al.*, 1994) au moment où les afférences primaires ont établi leur patron mature d'innervation de la moelle épinière chez l'opossum (voir paragraphe sur les afférences primaires, Knott *et al.*, 1999; Kitchener *et al.*, 2006). Dans les membres postérieurs, l'empoignement réflexe apparaît deux semaines après l'empoignement réflexe exprimé par les membres antérieurs.

Le redressement corporel sur une surface apparaît quasiment en même temps que l'empoignement par les membres postérieurs, entre P35 et P40. Le sautellement apparaît plus tard, au niveau des membres antérieurs et postérieurs bien que la fréquence des sautellemets soit plus faible pour les membres postérieurs, indiquant que ce réflexe pourrait être exprimé d'abord au niveau antérieur. Les stimulations frontales entraînent le réflexe de sautellement de façon plus efficace que les stimulations médiales et latérales. Le placement tactile avec le menton est également un réflexe à maturation lente qui se superpose au réflexe de sautellement. Le redressement corporel dans les airs ainsi que le placement visuel sont les derniers réflexes à être observés, après l'ouverture des yeux et des

oreilles aux alentours de la 5^{ème} semaine postnatale. Le placement tactile avec un membre n'est pas significativement exprimé, même chez l'adulte.

Cette étude par Cassidy *et al.* (1994) montre qu'il y a une apparition séquentielle des réflexes simples. Quatre tendances générales peuvent être tirées de cette séquence : (1) les réflexes spinaux apparaissent avant ceux qui utilisent le cerveau (sauf le *rooting*) ; (2) un réflexe donné apparaît et devient mature dans les membres antérieurs avant les membres postérieurs, ce qui est en accord avec un développement selon l'axe antéropostérieur des membres et de la moelle épinière; (3) les réflexes simples comme le retrait ou l'empoignement apparaissent avant les réflexes plus complexes comme le sautillerment qui nécessite l'emploi d'un membre entier; (4) les réflexes faisant intervenir deux ceintures apparaissent après ceux ne concernant qu'une seule ceinture (les connexions propriospinales n'étant peut-être pas encore mature au moment où les boucles de réflexes dans les renflements spinaux le sont). Enfin, la locomotion sur quatre membres (mécanisme spinal) apparaît après que les réflexes spinaux individuels soient exprimés et matures. En effet, la locomotion quadrupède nécessite des ajustements posturaux et une coordination entre les membres et les deux ceintures.

Les paragraphes suivants font état des quatre périodes locomotrices retrouvées chez l'opossum en développement (Pflieger *et al.*, 1996).

Durant la 1^{ère} période (P1-P10), l'opossum reste fixé à la tétine. Il est généralement immobile mais présente des mouvements de balancement rythmiques du tronc et des mouvements rythmiques et alternés des membres antérieurs comme ceux qui lui ont servi à atteindre la tétine à la sortie de l'orifice cloacal. Les membres postérieurs suivent passivement les mouvements du tronc. Si un opossum âgé de moins de 10 jours est détaché de sa mère et il tombe sur le côté car il ne peut ni supporter son poids ni soulever sa tête et effectue les mêmes mouvements des membres antérieurs que lorsqu'il est attaché (Pflieger *et al.*, 1996).

À partir de la 2^{ème} période (P11-P20), l'opossum est toujours attaché à la tétine. Dès la 3^{ème} semaine, les membres antérieurs effectuent progressivement des mouvements alternés de plus grande force et de plus grande amplitude que ceux observés durant la première période. Les membres postérieurs commencent à s'animer et démontrer une capacité rythmique. Quand l'opossum est détaché par l'expérimentateur de la tétine et placé sur une surface, l'animal peut soulever la partie antérieure de son corps grâce à ses membres antérieurs et ses membres postérieurs ne supportent toujours pas son poids. L'animal a tendance à pivoter sur son arrière-train. Si on le place dans l'eau à cette période, il nage sur une courte distance avec ses membres antérieurs seulement, ses membres postérieurs manquant de mobilité et de coordination avec les membres antérieurs (Pflieger *et al.*, 1996).

C'est entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine, durant la 3^{ème} période (P21-P30), qu'apparaissent les réflexes sensorimoteurs complexes comme le sautillerment. La locomotion spontanée, quadrupède et linéaire, débute lorsque l'opossum commence à se détacher de la mère durant la 3^{ème} période du développement locomoteur (Pflieger *et al.*, 1996). Les membres postérieurs sont positionnés latéralement par rapport au reste du corps et ne supportent pas parfaitement le poids de l'animal. Les mouvements sont mal coordonnés, surtout entre les ceintures. La marche est lente avec une phase d'appui plus longue que la phase de balancement. Le répertoire comportemental reste simple et l'opossum paraît toujours maladroit, les réflexes étant encore immatures.

La 4^{ème} période du développement locomoteur (P31-P40) démontre une évolution rapide des capacités locomotrices dont un bon support du poids corporel, une bonne coordination des ceintures ainsi que des comportements locomoteurs semblables à ceux des adultes, même si les jeunes opossums marchent plus rapidement que les adultes (cycle de pas plus court, Pflieger *et al.*, 1996). L'ouverture des yeux et des oreilles aux alentours de P35 apportent à l'opossum des indices environnementaux supplémentaires qui raffinent ses déplacements et réflexes.

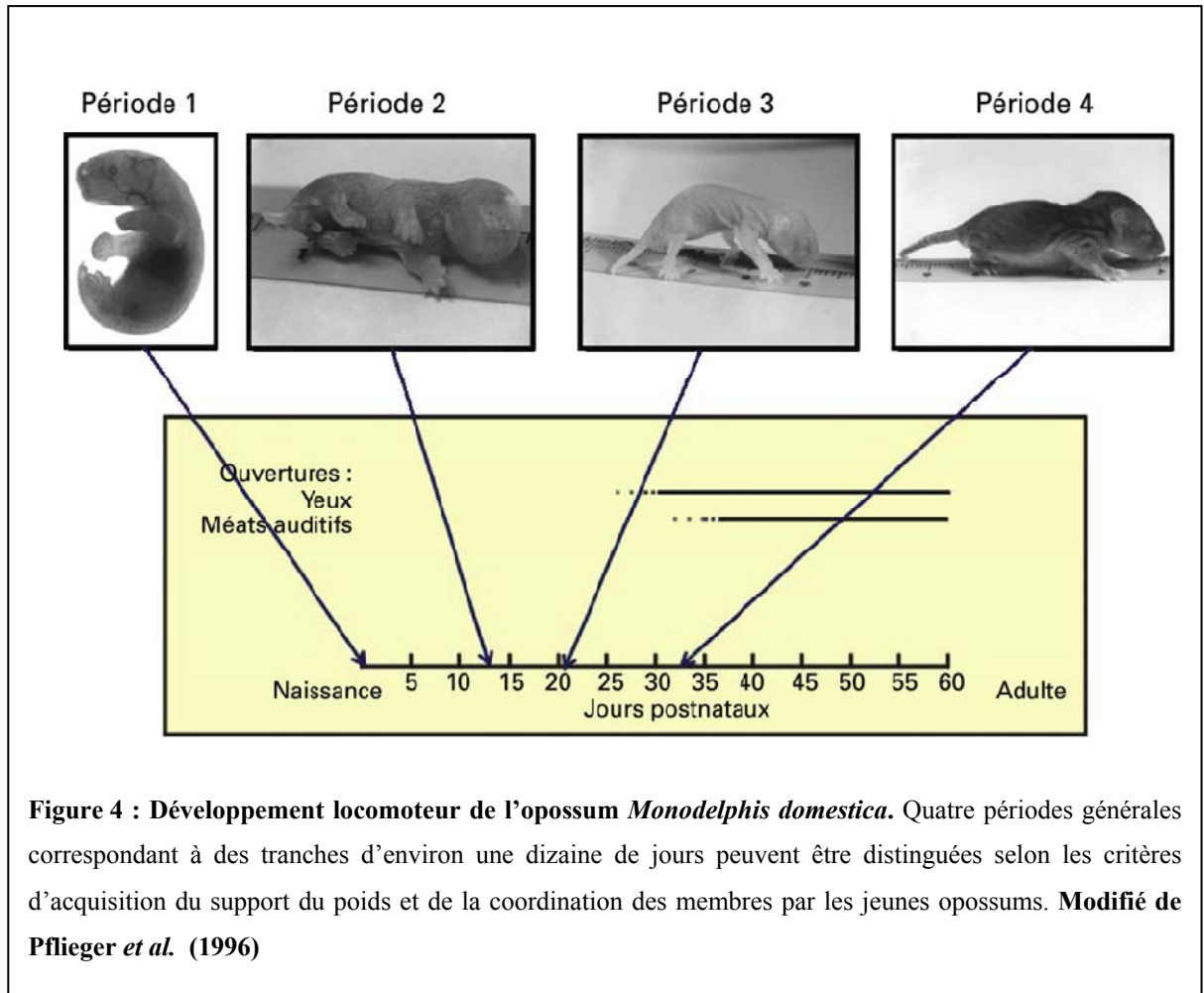


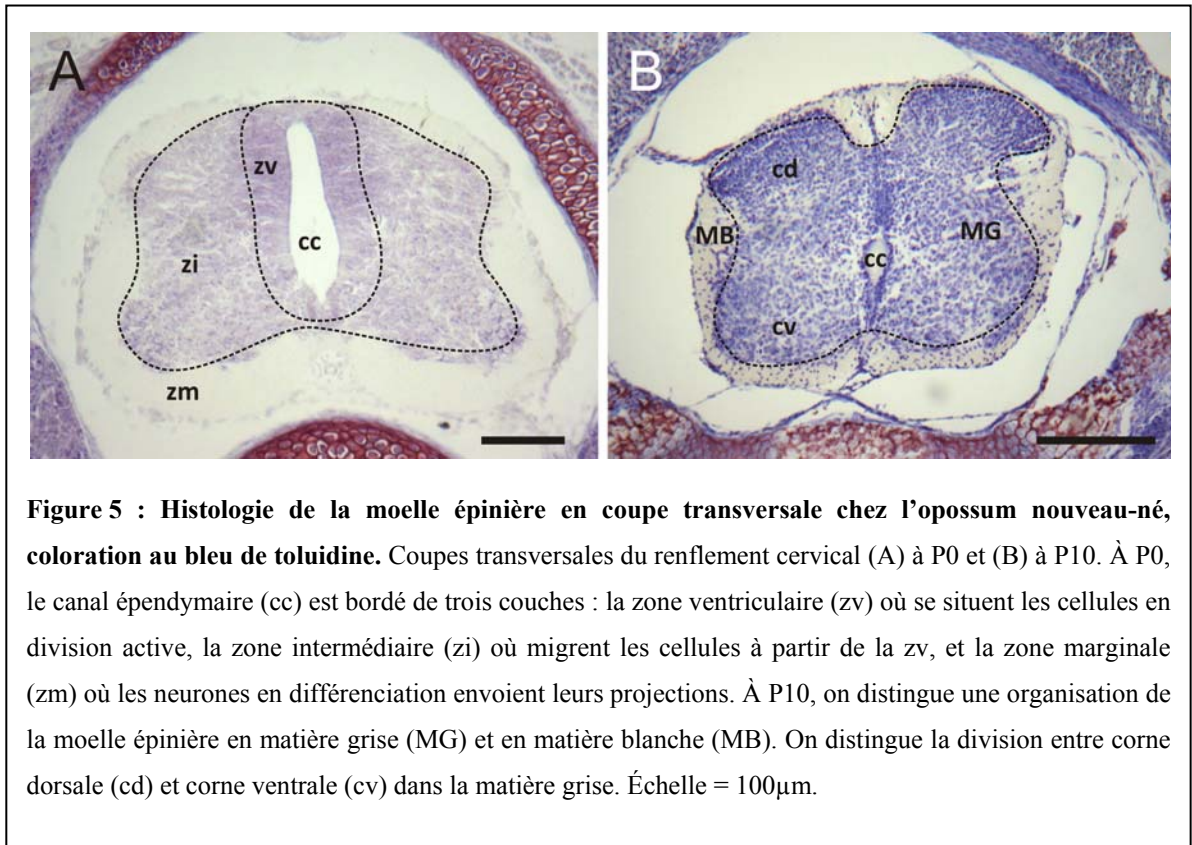
Figure 4 : Développement locomoteur de l'opossum *Monodelphis domestica*. Quatre périodes générales correspondant à des tranches d'environ une dizaine de jours peuvent être distinguées selon les critères d'acquisition du support du poids et de la coordination des membres par les jeunes opossums. **Modifié de Pflieger et al. (1996)**

1.3.2 Ontogénie de la moelle épinière chez *Monodelphis domestica*

Histologie de la moelle épinière du nouveau-né *Monodelphis domestica*

À la naissance, la moelle épinière de l'opossum revêt encore une apparence embryonnaire semblable à celle retrouvée chez les mammifères non marsupiaux (revue dans Cabana, 2000). Sur les coupes colorées au bleu de toluidine, trois couches concentriques s'organisent autour du neurocoele (fig. 5A) : la zone ventriculaire, la zone intermédiaire et la zone marginale (voir section 1.2.2). Le neurocoele est allongé dorsoventralement. Aux niveaux ventromédian et dorsomédian, on ne retrouve que la

couche ventriculaire. C'est vers P10 que l'organisation de la matière grise en cornes dorsales et ventrales apparaît (fig. 5B).



Comme chez les autres mammifères, la moelle épinière de l'opossum se développe selon deux gradients généraux : rostrocaudal et ventrodorsal (Cabana, 2000). Le gradient rostrocaudal est mis en évidence par un retard dans la maturation des segments lombaires et sacrés en comparaison aux segments cervicaux, pour un âge donné. Le gradient ventrodorsal est mis en évidence par une maturation plus précoce des différentes composantes nerveuses – cellules, synapses, myéline - de la plaque basale en comparaison à la plaque alaire à l'intérieur d'un segment donné de la moelle. Les différences sont plus prononcées aux âges précoces et s'estompent progressivement avec la maturation spinale.

Les motoneurones sont les cellules nerveuses spécialisées qui innervent les muscles des membres pour permettre la locomotion en relâchant de l'acétylcholine, le neurotransmetteur présent au niveau de toutes les jonctions neuromusculaires chez les

vertébrés. Dans la moelle épinière de l'opossum nouveau-né, on peut déjà distinguer des cellules exprimant la choline acétyltransférase (la principale enzyme de synthèse de l'acétylcholine) situées dans la corne ventrale. Ces cellules, que Barthélemy et Cabana (2005) identifient comme des motoneurones, mesurent respectivement $7\mu\text{m}$ et $5\mu\text{m}$ en moyenne au niveau des renflements cervical et lombaire. Durant le développement, les neurones augmentent de taille et se différencient. C'est vers P10-12 qu'il devient plus facile d'identifier les motoneurones par leur forme étoilée caractéristique et leur taille (entre 12 et $13\mu\text{m}$ au niveau de chaque renflement) (Barthélemy et Cabana, 2005). À la fin de la 3^{ème} semaine, deux groupes majeurs de neurones sont formés, un médian et un latéral qui se séparent de plus en plus au fur et à mesure que la moelle épinière croît. Durant les quelques semaines qui suivent la naissance, les motoneurones au niveau lombosacré sont toujours légèrement plus petits que les motoneurones retrouvés au niveau cervical; c'est un des aspects du gradient de maturation qu'on retrouve entre les deux niveaux de la moelle épinière. Ce n'est que huit semaines après la naissance que la taille des motoneurones (environ $27\mu\text{m}$) devient semblable aux deux niveaux (Barthélemy et Cabana, 2005). À l'âge adulte, il est possible de distinguer deux populations de motoneurones : les plus gros mesurent entre $35-37\mu\text{m}$ en moyenne et correspondent aux motoneurones α (responsables de la commande motrice), ils possèdent des axones myélinisés de diamètre entre 9 et $20\mu\text{m}$; les plus petits mesurent entre $20-21\mu\text{m}$ en moyenne, ils correspondent aux motoneurones γ (régulant la tension musculaire) et le diamètre de leurs axones se situe entre 3 et $8\mu\text{m}$ (Leblond et Cabana, 1996; Barthélemy et Cabana, 2005; classification de la taille des motoneurones α et γ établie chez le rat selon Ishihara *et al.*, 1995). L'ensemble des motoneurones innervant un groupe de muscles donné forment ce que l'on appelle un *pool* de motoneurones.

Localisation des pools de motoneurones chez l'opossum

Champagne *et al.* ont déterminé la position des *pools* de motoneurones dans la moelle épinière de l'opossum adulte et en développement en utilisant la technique du marquage neuronal rétrograde (Champagne *et al.*, 2008). Ce traçage consiste à injecter un traceur dans

un compartiment musculaire, au niveau des membres antérieurs et postérieurs. Le traceur est alors capturé par les terminaisons axonales du muscle et il est transporté de façon rétrograde jusqu'aux corps cellulaires des motoneurones localisés dans la moelle épinière. On localise ensuite le traceur sur des coupes transversales de la moelle épinière, celui-ci étant révélé par immunohistochimie en microscopie photonique. Champagne *et al.* ont utilisé deux traceurs rétrogrades pour marquer les pools de motoneurones : l'un couplé à une agglutinine du germe de blé conjuguée à une enzyme, la peroxydase du raifort (WGA-HRP) avec révélation par précipitation visible en champ clair, l'autre couplé à une souche recombinante du virus de la pseudo-rage (PRV-152), particulièrement adapté au traçage par injections intramusculaires, avec révélation en fluorescence. L'emploi de deux traceurs permet de marquer plusieurs compartiments musculaires sur un même animal, réduisant ainsi le nombre de spécimens à utiliser.

Les motoneurones innervant les membres forment des colonnes longitudinales dans la corne ventrale de la moelle épinière au niveau des renflements. Ces colonnes présentent une organisation rostrocaudale, dorsoventrale et médiolatérale. Cette organisation somatotopique reflète généralement la position des muscles par rapport à la colonne vertébrale et leur insertion sur une articulation donnée. Les colonnes innervant les segments proximaux (comme ceux du bras ou de la cuisse) débutent en position plus rostrale, ventrale et médiane par rapport aux colonnes innervant les segments distaux (comme ceux de l'avant-bras ou de la jambe), ceci est observé au niveau des deux renflements (cervical et lombaire) en dépit d'une superposition importante de ces colonnes. Les motoneurones innervant les fléchisseurs de l'avant-bras et de la cuisse ont une position rostrale, dorsale et médiane par rapport aux motoneurones innervant les extenseurs des mêmes compartiments musculaires. La tendance s'inverse pour les motoneurones innervant le bras et la jambe : les colonnes respectives pour les fléchisseurs sont plus caudales, ventrales et latérales par rapport aux extenseurs bien qu'une superposition de ces colonnes soit aussi observée pour chaque renflement. Cette distribution peut être expliquée par la fonction hybride d'un groupe de muscle donné : un groupe majoritairement fléchisseur peut agir comme extenseur et vice-versa, selon les circonstances, permettant des mouvements plus fluides et une

meilleure adaptation au terrain lors de la locomotion. Le nombre de neurones marqués pour chaque colonne augmente jusqu'à 3-4 semaines postnatales quand la locomotion quadrupède débute. La longueur de chaque colonne durant le développement excède celle retrouvée chez l'adulte d'une valeur allant jusqu'à deux segments spinaux puis diminue jusqu'à atteindre la valeur adulte. Cette perte correspondrait au raffinement de l'innervation, confirmée par le comportement locomoteur de l'animal. Enfin, les colonnes de motoneurones s'étendent sur une distance plus courte chez l'opossum (entre trois et quatre segments) que chez d'autres euthériens, soit entre deux à quatre segments spinaux de moins et la superposition des colonnes chez l'opossum démontrent une condition primitive au même titre que l'absence de projections corticospinales et spino-thalamiques.

Ontogénie des jonctions GAP

Chez les mammifères adultes, la majorité des connexions entre les différents acteurs de la locomotion (afférences primaires, interneurones spinaux, motoneurones, projections descendantes du cerveau) se font par l'intermédiaire des synapses chimiques. Néanmoins, au tout début du développement, les jonctions *gap* prévalent (Kandler et Katz, 1995). Une étude récente chez *M. domestica* (Lemieux *et al.*, 2010) montre qu'un marqueur présumé des jonctions *gap*, la connexine 36, se retrouve un peu partout dans la matière grise avec une prévalence ventrale dans les renflements spinaux chez le nouveau-né. Son expression diminue subséquemment dans la corne ventrale mais augmente fortement au niveau de la corne dorsale superficielle, avec un pic de densité entre P10 et P20, correspondant à une période d'arborisation des afférences primaires (Kitchener *et al.*, 2006). Son expression diminue ensuite dorsalement jusqu'à ne plus être détectable à partir de P40. Cela suggère que les jonctions *gap* pourraient avoir un rôle synaptique chez l'animal précoce avant que les synapses chimiques ne soient formées. L'expression très forte et passagère de la connexine 36 au niveau de la corne dorsale superficielle suggère une implication de cette protéine dans les systèmes sensoriels spinaux plutôt que dans le contrôle moteur direct des membres.

Ontogénie de la synaptogenèse

Bien qu'elle ait commencé avant la naissance, la synaptogenèse chimique dans la moelle épinière de *M. domestica* atteint un patron mature seulement entre la 5^{ème} et la 7^{ème} semaine après la naissance (Gingras et Cabana, 1999). En marquant par immunohistochimie la synaptophysine (protéine membranaire des vésicules synaptiques), la synaptotagmine-I (protéine membranaire des vésicules synaptiques) et la SNAP-25 (protéine du complexe de fusion membranaire des vésicules synaptiques), Gingras et Cabana (1999) ont pu déterminer que les synapses se développent selon trois gradients : rostrocaudal, ventrodorsal et latéromédian. Le marquage pour ces trois protéines synaptiques apparaît dans la matière blanche avant d'être observé dans la matière grise, ce qui suggère que ces protéines sont détectées au niveau des axones en croissance avant le début de la synaptogenèse. À la naissance, le marquage pour ces trois protéines dans la matière grise présomptive se limite à la périphérie ventrolatérale de la corne ventrale avant d'envahir progressivement la matière grise, d'abord ventralement puis au niveau du gris intermédiaire et enfin dorsalement aux environs de P15 pour les niveaux cervicaux et P18 pour les niveaux lombaires. Les auteurs en ont déduit l'origine des axones faisant synapse dans la moelle épinière. Au niveau de la matière blanche, ce pourrait être les voies propriospinales, vestibulaires et les fibres spinales ascendantes qui seraient marquées. Dans la matière grise, ce serait les synapses intersegmentaires et les axones propriospinaux courts qui seraient identifiés autour de la naissance. L'augmentation de marquage pour ces trois protéines synaptiques au cours du développement dans la matière blanche serait due à l'addition des voies descendantes qui se forment plus tardivement; dans la matière grise, l'augmentation de marquage et les gradients de développement correspondent à la croissance des systèmes descendants majeurs dans la matière grise spinale.

Ontogénie des neurotransmetteurs principaux du SNC chez *Monodelphis domestica*

Dans le système nerveux mature, l'activité harmonieuse des réseaux neuronaux repose sur l'action coordonnée de la neurotransmission excitatrice et inhibitrice.

Le glutamate est l'acide aminé exciteur le plus commun dans le règne animal (Kandel *et al.*, 2000). Cet acide aminé agit sur les récepteurs AMPA, kainate, NMDA et métabotropiques (mGluR; Kandel *et al.*, 2000). Les récepteurs AMPA et kainate conduisent les ions Na^+ et K^+ et entraînent des réponses dépolarisantes rapides alors que les récepteurs NMDA entraînent des réponses postsynaptiques dépolarisantes lentes en conduisant Ca^{2+} en plus des Na^+ et des K^+ . La famille des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) se divise en trois types de protéines G qui agissent par des mécanismes de signalisation intracellulaire différents. L'action ionotrope du glutamate est toujours excitatrice mais le glutamate peut avoir des effets excitateurs et inhibiteurs lorsqu'il agit sur les récepteurs métabotropiques (Kandel *et al.*, 2000).

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine sont les deux neurotransmetteurs inhibiteurs principaux du SNC (Kandel *et al.*, 2000). Ces acides aminés se lient respectivement aux récepteurs ionotropiques GABA_A ainsi qu'aux récepteurs métabotropiques du GABA (GABA_B) et aux récepteurs glycine (GlyR). Les récepteurs ionotropiques, GABA_A et GlyR, sont perméables aux ions chlorure (Cl^-) et aux ions bicarbonate (HCO_3^-) et la direction du courant postsynaptique net évoqué est dictée par les gradients électrochimiques à travers la membrane cytoplasmique ainsi que les concentrations de ces deux ions de part et d'autre de celle-ci (Kaila, 1994).

Chez *M. domestica*, les trois neurotransmetteurs glutamate, GABA et glycine ont été étudiés en corrélation avec le développement des voies motrices principales et des comportements locomoteurs simples (Soza *et al.*, 2003; Lamoureux *et al.*, 2008). À la naissance, ces trois acides aminés sont présents dans la matière grise et blanche présomptives sous forme de points très abondants dans la corne dorsale et en quantité moindre dans la matière blanche. L'expression des trois acides aminés se développe selon

les gradients rostrocaudal, ventrodorsal et médiolatéral. Le marquage dans la matière blanche est probablement associé à des systèmes de projection intraspinaux ou descendants comme les voies réticulospinales ou vestibulospinales qui ont atteint la moelle épinière à la naissance (Pflieger et Cabana, 1996). L'augmentation d'intensité pour le marquage des trois acides aminés correspond à une période intense de croissance axonique et elle est suivie d'une diminution au moment où les voies ont terminé leur croissance (discuté dans Cabana, 2000). Afin de vérifier si les motoneurones expriment le glutamate tôt durant le développement (il n'est pas exprimé par les motoneurones chez les adultes), Lamoureux *et al.* (2008) ont utilisé un double marquage. Les motoneurones sont marqués rétrogradement avec du Texas-Red couplé à des amines dextran (TRDA), injecté au niveau des plexi nerveux des membres et le marquage pour le glutamate est détecté sur des coupes transversales de moelle épinière traitées par immunohistochimie contre le glutamate. NeuN est utilisé comme marqueur des neurones chez les animaux dont les nerfs ne sont pas injectés. Afin d'observer si l'expression du glutamate précède ou concorde avec celle de l'acétylcholine dans la moelle épinière de l'opossum nouveau-né, les auteurs ont également utilisé des anticorps ciblés contre le glutamate et la choline acétyltransférase (ChAT), l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Le marquage sous forme de points est observé sur les neurones marqués au TRDA à la ChAT et à NeuN. Il augmente durant les deux premières semaines postnatales puis décroît. Cela suggère que la glutamate est présent dans les motoneurones et démontre une colocalisation avec l'acétylcholine. La présence de cet acide aminé chez le nouveau-né pourrait expliquer l'initiation rythmique des mouvements alternés des membres antérieurs lorsque la moelle épinière est tellement immature que les réseaux locomoteurs spinaux ne sont pas encore complètement établis.

La noradrénaline (NA) est une monoamine qui maintient l'activité des CPG et qui agit sur la durée de la flexion ou de l'extension via les récepteurs α -1 et α -2. Vigneault et Cabana (2010) ont utilisé deux marqueurs de la NA afin de décrire son développement dans la moelle épinière de l'opossum en développement. Le premier marqueur immunohistochimique cible la tyrosine hydroxylase (TH) qui est l'enzyme précurseur de la NA et de la dopamine. Le deuxième marqueur vise le récepteur α -1 (ADRA1), un récepteur

noradrénergique mais pas dopaminergique. À P10, peu de marquage pour la TH est détecté. On retrouve des points dans la région dorsolatérale de la corne dorsale et dans le funicule latéral. ADRA1 est observé au niveau des corps cellulaires et des neurites dans la portion la plus ventrale de la corne ventrale, appartenant probablement à des motoneurones. TH et ADRA1 sont plus épars au niveau du renflement lombaire par rapport au niveau cervical. À P20, les points retrouvés pour la TH se retrouvent au niveau de toute la matière blanche ainsi que dans la corne ventrale, autour du canal central et dans la partie dorsale de la corne dorsale. ADRA1 se retrouve au niveau des corps cellulaires situés dans la corne dorsale et ventrale mais aussi au niveau des funicules latéral et ventral sur des neurites. À P90, la TH se réduit à des points, quelques corps cellulaires (probablement des cellules gliales) et des neurites dans le funicule latérale. TH n'est pas détecté dans la matière grise. ADRA1 est détecté dans des corps cellulaires probablement de cellules gliales, surtout dans la matière blanche. La densité de points ADRA1 est faible dans la matière grise. Le marquage pour l'enzyme précurseur est très épars et présent surtout dans la moelle dorsale alors que le récepteur noradrénergique est plutôt présent dans la région ventrale où se situent les motoneurones. Les résultats présentés ci-contre sont encore préliminaires mais on observe un gradient général latéromédian pour les deux marqueurs de la noradrénaline.

Ontogénie de la myélinisation

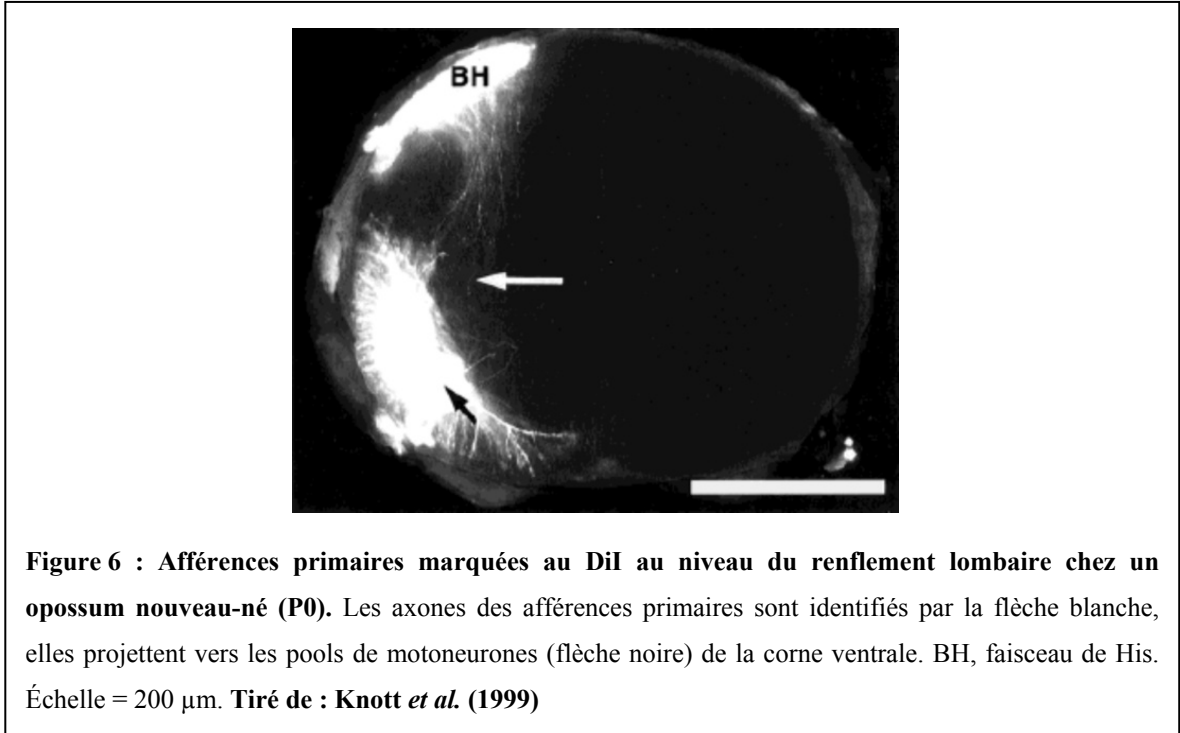
La mise en place du patron de myélinisation dans les renflements de la moelle épinière est entièrement postnatale. Elle commence à partir de la 2^{ème} semaine postnatale au niveau des renflements cervical et lombaire (Lamoureux *et al.*, 2005), tant au niveau des racines ventrales que dorsales (Leblond et Cabana, 1997). C'est seulement à partir de ce moment que les réflexes simples observés par Cassidy *et al.* (1994) sont exprimés. La myélinisation s'effectue selon les mêmes gradients que la synaptogenèse chimique (rostrocaudal, ventrodorsal et latéromédian). Le marquage immunohistochimique de la protéine basique de la myéline et de la protéine protéolipidique (deux protéines constitutives de la myéline) est détecté en premier lieu au niveau cervical (Lamoureux *et al.*, 2005) aux alentours de la

2^{ème} semaine, au niveau des axones des motoneurons et des axones vestibulaires et réticulaires. Durant la 3^{ème} semaine, ce sont les aires des colonnes dorsales puis les projections spino-encéphaliques, réticulo-spinales et propriospinales qui sont marquées, et enfin, les axones rubrospinaux au cours de la 4^{ème} semaine. La myélinisation au niveau des segments lombosacrés suivent la maturation de la myélinisation au niveau des segments cervicaux avec un décalage estimé entre 3 et 5 jours. Le nombre de fibres myélinisées tant au niveau périphérique (racines) que central (matières grise et blanche) augmente durant environ 7 semaines jusqu'à un nombre excédant celui des fibres comptabilisées chez l'adulte au niveau périphérique (Leblond et Cabana, 1997; Lamoureux *et al.*, 2005). Ces fibres surnuméraires sont probablement des collatérales au niveau périphérique (Leblond et Cabana, 1997). Les fibres augmentent également en diamètre jusqu'à 14 semaines après la naissance dans les racines ventrales et dorsales. Il est possible de classer les fibres au niveau des racines ventrales selon leur taille (divisées en fibres α et γ) autour de la 4^{ème} semaine postnatale. En revanche, cette séparation en différents types (I, II et III) au niveau des racines dorsales est moins bien définie (Leblond et Cabana, 1997). Ainsi, le patron mature de myélinisation est atteint chez les opossums âgés de plus de trois mois, bien après que la synaptogenèse soit établie (Lamoureux *et al.*, 2005).

Afférences primaires

Le développement de l'innervation spinale par les afférences primaires sensorielles chez *M. domestica* a été documentée grâce aux techniques de traçage neuroanatomique et d'immunohistochimie marquant différentes sous-catégories d'afférences (Knott *et al.*, 1999; Kitchener *et al.*, 2006). En marquant antérogradement les afférences primaires au DiI, ces auteurs ont observé aux niveaux thoracique et lombaire que les premières afférences primaires atteignent la corne ventrale, en particulier les colonnes motrices, entre P0 et P6 (fig. 6). Ce n'est qu'après P5 que les afférences primaires envahissent la corne dorsale, la région superficielle de la corne étant la dernière à être innervée, entre la 2^{ème} et 3^{ème} semaine postnatale, où l'on suppose l'apparition de l'influence sensorielle sur les centres moteurs. Aucune différence notable n'a été décelée entre l'innervation des segments

thoraciques les plus caudaux et les segments lombaires malgré les différences observées au niveau histologique. Ces auteurs n'ont pas étudié les niveaux cervicaux mais on peut penser que le développement de leur innervation par les afférences primaires se fait légèrement plus précocement que les segments thoraciques ou lombaires.



Systèmes de projection

L'anatomie et le développement des connexions intrasegmentaires et des systèmes de projections courtes n'ont pas fait l'objet d'études chez l'opossum. En revanche, les voies propriospinales descendantes longues (PPL) chez l'opossum ont été étudiées grâce aux techniques de traçage neuroanatomique (Cassidy et Cabana, 1993). Ces voies ont pour rôle de coordonner les mouvements de la tête, du tronc et des membres durant la locomotion. Les PPL relient les renflements cervical et lombaire entre eux et les relient aux segments cervicaux supérieurs. Chez l'opossum, ces voies se développent postnatalement. En effet, autour de la naissance, seules quelques afférences issues de neurones du renflement

cervical sont présentes dans le renflement lombaire. Le nombre de ces projections propriospinales descendantes augmente avec le temps et des projections issues des segments cervicaux les plus rostraux s'y ajoutent. Le patron mature de connexion est atteint aux environs de P17.

Les projections descendantes provenant de l'encéphale et innervant la moelle épinière (voies descendantes) et celles voyageant en direction opposée (voies ascendantes) ne sont pas toutes développées à la naissance de l'opossum (revue dans Cabana, 2000). Plusieurs études utilisant des techniques de traçage axonique ont mis en évidence le développement principalement postnatal des voies reliant l'encéphale et la moelle épinière chez l'opossum (Wang *et al.*, 1992; Pflieger et Cabana, 1996; Cabana, 2000). Ces études ont montré que des neurones de la formation réticulée bulbaire et pontique ainsi que des neurones des noyaux vestibulaires projettent à la moelle lombosacrée chez l'opossum nouveau-né. Le nombre de ces projections augmente avec l'âge. À ces projections s'ajoutent les projections issues d'autres noyaux du tronc cérébral et du prosencéphale. Les dernières voies à atteindre la moelle au cours de la 3^{ème} semaine postnatale sont celles issues du cervelet et du collicule supérieur. Ces voies innervent principalement les segments cervicaux et thoraciques. En ce qui concerne les projections de la moelle lombaire vers l'encéphale, elles commencent à atteindre le tronc cérébral seulement vers P3 et le thalamus vers P11-P12 (Desrosiers, 1995; Qin *et al.*, 1993).

Les voies impliquées dans le contrôle moteur se forment donc en grande partie postnatalement chez *M. domestica*. Cependant, les réflexes sensorimoteurs (Cassidy *et al.*, 1994) et la locomotion spontanée (Pflieger *et al.*, 1996) ont un développement retardé par rapport à la croissance aux voies citées ci-dessus vers leurs cibles. Ce retard entre la croissance neurale et les comportements locomoteurs vient du fait que l'expression de ces comportements ne repose pas uniquement sur la formation des voies motrices mais aussi sur l'établissement des connexions fonctionnelles entre les centres moteurs et la formation de myéline autour des fibres nerveuses.

1.3.3 Ontogénie de l'innervation des membres

Des observations histologiques des membres chez l'opossum nouveau-né (Martin et MacKay 2003; Barthélemy et Cabana, 2005) montrent que les os des membres antérieurs ne sont que des ébauches cartilagineuses. Les muscles sont encore immatures mais déjà striés, et enfin, le tissu conjonctif est mésenchymateux. Dans les membres postérieurs, aucune fibre musculaire n'est encore striée, le tissu musculaire est lâche dans la cuisse et la jambe, absent au niveau des pieds. Le gradient antéropostérieur dans le développement musculo-squelettique des membres de l'opossum s'accompagne de gradients similaires de l'innervation des membres, mis en évidence par une étude de l'expression du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine dans les axones des motoneurones (Barthélemy et Cabana, 2005). À la naissance, seules quelques projections cholinergiques sont envoyées vers les membres antérieurs et postérieurs. Chez l'opossum, l'innervation des membres s'effectue selon un gradient antéropostérieur et en grande partie postnatalement sur une période qui s'étend jusqu'à deux mois après la naissance, concordant avec le développement de la locomotion précédemment décrit.

1.3.4 Activité spontanée dans la moelle épinière de l'opossum en développement

L'activité spontanée est une activité physiologique générée de manière intrinsèque. Des expériences *in vitro* sur des préparations de moelles épinières isolées montrent qu'une activité spontanée est présente dans le système nerveux en développement (Ren et Greer, 2003; Yvert *et al.*, 2004). Les rôles développementaux de l'activité spontanée dans le système nerveux ont été étudiés dans diverses structures. L'activité spontanée apparaît cruciale à la mise en place des circuits neuronaux en développement : certaines synapses sont renforcées tandis que d'autres sont éliminées par l'activité neuronale (Goodman et Shatz, 1993). Dans la moelle épinière de l'amphibien *Xenopus laevis*, les patrons de dépolarisations spontanées de Ca^{2+} générés par les neurones embryonnaires spécifient

l'expression de leurs neurotransmetteurs (Borodinsky *et al.*, 2004; Spitzer *et al.*, 2004). Les bouffées de potentiel d'actions périodiques conduisent à une augmentation de la concentration calcique dans les neurones participants (Feller, 1999). De multiples études sur le calcium démontrent que des changements synchrones dans la concentration intracellulaire en calcium peuvent influencer en profondeur une diversité de processus intracellulaires, allant de l'expression génique à l'établissement d'un phénotype pour la cellule (Zhang et Poo, 2001). L'activité spontanée jouerait un rôle important dans l'établissement des connexions synaptiques au niveau central (Hanson et Landmesser, 2003; Gonzalez-Islas et Wenner, 2006) mais aussi dans la croissance des axones des motoneurones au niveau périphérique (Hanson et Landmesser, 2004). Chez les mammifères euthériens, ce phénomène est principalement observé à des stades prénataux (Ren et Greer, 2003; Yvert *et al.*, 2004) même s'il peut aussi être enregistré chez des animaux nouveaux-nés (voir Vinay *et al.*, 2002).

La présence d'activité spontanée a été démontrée dans la moelle épinière de l'opossum sur des préparations *in vitro* entre le jour de la naissance et le milieu de la 3^{ème} semaine postnatale (Lavallée et Pflieger, 2009). En utilisant des techniques d'imagerie calcique, ces auteurs ont mis en évidence la présence de fluctuations périodiques de la concentration calcique dans les motoneurones spinaux à différents âges. Ils ont utilisé un marqueur neuroanatomique de l'activité cellulaire, la Sulforhodamine 101, pour montrer que des interneurones et possiblement des cellules gliales démontrent eux aussi une activité spontanée. En dénombrant le nombre de cellules autres que des motoneurones marquées par la Sulforhodamine, ils ont mis en évidence que l'activité spontanée est présente dans la moelle épinière dès P1 dans le renflement cervical et dès P5 au niveau lombaire. Le nombre de cellules spontanément actives augmente dans les deux renflements jusqu'à atteindre un pic vers P12-14 avant de diminuer puis être nul à la fin de la 3^{ème} semaine postnatale. Des comparaisons entre le nombre de cellules marquées à la Sulforhodamine dans des préparations isolées et dans des préparations dans lesquelles la moelle est laissée en place dans la carcasse (préparations *in situ*) suggèrent que le *feedback* sensoriel n'est pas suffisamment important pour avoir une influence notable sur l'activité spontanée. Des

comparaisons similaires entre moelles isolées avec ou sans tronc cérébral ont montré que la genèse de l'activité spontanée est intraspinale mais elle peut être affectée par les systèmes descendants.

1.4 Développement de l'inhibition dans la moelle épinière

1.4.1 Vue d'ensemble des cotransporteurs cation-chlorure

Les cotransporteurs cations-chlorure (CCC) sont des transporteurs membranaires actifs secondaires qui transportent les ions Cl^- à travers la membrane en couplage avec d'autres cations ou anions. Les CCC ont été identifiés comme d'importants régulateurs de la concentration intracellulaire en ions chlorure des neurones (Payne, 1997; Kakazu *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2003; Mercado *et al.*, 2004; Blaesse *et al.*, 2009). Ils jouent un rôle dans divers aspects du développement neuronal, de la plasticité et des traumatismes via leur activité régulatrice de la concentration interne en ions chlorure (Payne *et al.*, 2003). Les CCC consistent en une série de protéines transmembranaires qui transportent les ions chlorure en parallèle aux ions Na^+ ou/et K^+ . Ils fonctionnent comme transporteurs actifs secondaires qui utilisent l'énergie des gradients transmembranaires de Na^+ et K^+ générée par la pompe Na/K -ATPase pour faire entrer ou sortir les ions Cl^- (Kaila, 1994; Payne *et al.*, 2003). La fonction des CCC est électriquement neutre et le transport d'ions ne change pas le potentiel transmembranaire (Mercado *et al.*, 2004). D'autres protéines de transport actif secondaire jouent un rôle dans l'homéostasie des ions Cl^- : ce sont les échangeurs dépendants ou indépendants de Na^+ qui échangent Cl^- contre HCO_3^- (Grichtchenko *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 1997).

À ce jour, neuf gènes des CCC ont été identifiés chez les rongeurs et l'humain : un cotransporteur Na^+-Cl^- (NCC), deux cotransporteurs $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC), quatre cotransporteurs K^+-Cl^- (KCC) et deux protéines dont la structure est proche des CCC (CCC8 aussi appelée CIP, protéine d'interaction avec les CCC et CCC9) mais dont on

ignore la fonction (Caron *et al.*, 2000; Mercado *et al.*, 2004). Toutes ces protéines ont un cœur hydrophobe contenant 12 domaines transmembranaires en hélices α flanqués par des régions N- et C-terminales hydrophiles. Le domaine central est hautement conservé alors que le domaine N-terminal est le plus variable parmi ces protéines (Delpire et Mount, 2002; Mercado *et al.*, 2004). Leur poids moléculaire oscille entre 120 et 200 kDa. Les 2 sous-catégories majeures des CCC, les NKCC et les KCC, ont des rôles physiologiques opposés dans la régulation du volume cellulaire et l'homéostasie intracellulaire en ions chlorure. En effet, dans les conditions cellulaires normales, les NKCC accumulent les Cl^- dans la cellule alors que les KCC abaissent la concentration intracellulaire en ions Cl^- (voir sections suivantes; Russell, 2000; Payne *et al.*, 2003; Mercado, 2004; Gamba, 2005). Le tableau en annexe résume les fonctions et la distribution de chacun des cotransporteurs cation-chlorure.

Plusieurs substances inhibent les CCC. Le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ est sensible au thiazide alors que les NKCC et les KCC sont sensibles au furosémide et à la bumétanide (Lytle et Forbush, 1992). Le furosémide a une affinité similaire pour les NKCC et les KCC alors que la bumétanide a une affinité 500 fois supérieure pour les NKCC que pour les KCC (Payne *et al.*, 2003) et peut donc servir comme inhibiteur spécifique à de faibles concentrations.

Les CCC ont différents types de régulations cinétiques. Les études classiques du cotransport de type NKCC dans les cellules non neuronales ont montré que leur activité est enclenchée par une diminution de taille de la cellule, une faible concentration intracellulaire en ions Cl^- ainsi que des agents qui stimulent l'activité kinase intracellulaire ou réduisent l'activité phosphatase. Au contraire, le cotransport de type KCC est stimulé par une augmentation de taille de la cellule et des agents qui stimulent l'activité phosphatase ou réduisent l'activité kinase (Lauf et Adragna, 2000, Flatman, 2002). La régulation cinétique des CCC est donc impliquée dans le contrôle du volume cellulaire. Lors d'un gonflement de la cellule, le cotransport KCC est activé et provoque un efflux des ions Cl^- et K^+ , ce qui a pour conséquence d'abaisser l'osmolarité intracellulaire d'où le rôle dans la diminution

du volume cellulaire. Suite à une réduction du volume cellulaire, le cotransport de type NKCC est activé et provoque un influx des ions, ce qui augmente l'osmolarité intracellulaire et augmente le volume de la cellule. L'activation des NKCC et des KCC par la tonicité du milieu nécessite respectivement une phosphorylation ou une déphosphorylation de la protéine (Lytle et Forbush, 1992). De tous les cotransporteurs KCC, seul KCC2 est actif dans des conditions isotoniques alors que tous les autres sont activés en milieux hypotoniques (Song *et al.*, 2002; Gamba, 2005). Ceci implique qu'en comparaison aux autres KCC, KCC2 est le moins à même à participer dans la régulation du volume cellulaire.

La phosphorylation directe a été démontrée pour NKCC1 et KCC2 (Lytle et Forbush, 1992; Watanabe *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Trois sites de phosphorylation de NKCC1 et plusieurs sites consensus pour les tyrosine et thréonine kinases chez KCC2 ont été identifiés (Strange *et al.*, 2000; Darman et Forbush, 2002). D'autres kinases interagissant avec les CCC ont aussi été identifiées, dont SPAK (*Ste20-related proline-alanine-rich kinase*), OSR1 (*oxidative stress response 1*), la famille des WNK kinases et des CKB (*braintype creatin kinase*). Les kinases SPAK et OSR1 phosphorylent NKCC1 mais pas KCC2. En plus de la phosphorylation, l'activité des CCC est influencée par leur structure quaternaire. La formation des hétéro- et des homo-oligomères a été démontrée pour pratiquement tous les cotransporteurs (Blaesse *et al.*, 2006).

Un changement dans la concentration intracellulaire en ions Cl⁻ affecte les réponses des récepteurs au GABA et à la glycine, la mise en place de l'excitabilité cellulaire, la régulation du pH intracellulaire, la régulation du volume cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire (Kaila et Ransom, 1998; Russell, 2000, Payne *et al.*, 2003), mais c'est surtout son rôle dans le développement de l'inhibition dont nous discuterons dans ce mémoire. Le lien entre la concentration intracellulaire en ions Cl⁻ et la mise en place de l'inhibition neuronale repose sur deux cotransporteurs en particulier : KCC2 et NKCC.

1.4.2 KCC2, un cotransporteur cation-chlorure spécifiquement exprimé par les neurones

KCC2 (*K⁺-Cl⁻ cotransporter type 2*) est un cotransporteur membranaire d'un poids moléculaire d'environ 140kDa, exprimé de façon spécifique par les cellules nerveuses du système nerveux central (Mercado *et al.*, 2004). KCC2 fait entrer ou sortir les ions K⁺ et Cl⁻ selon les conditions du milieu (tonicité, concentration relative en ions K⁺). En effet, les propriétés fonctionnelles des CCC, soit les constantes d'affinité à leurs ions respectifs et leurs inhibiteurs, leur activation par la tonicité du milieu ainsi que l'effet des inhibiteurs kinase/phosphatase ont été étudiées (revue par Gamba, 2005). Une conclusion intéressante porte sur la comparaison des constantes d'affinités. KCC2 a la plus grande affinité pour les ions K⁺ parmi les KCC. Dans les neurones où KCC2 est spécifiquement exprimé, en conditions normales, [K⁺]_e est faible et KCC2 permet l'efflux des ions Cl⁻ et abaisse la [Cl⁻]_i. Cependant dans certaines conditions d'activité neuronale intense ou dans des conditions physiopathologiques, [K⁺]_e est élevée. Une augmentation de [K⁺]_e résulte en un renversement de la direction de transport de KCC2 et dans la recapture des K⁺ extracellulaires, aux dépens de l'accumulation des Cl⁻ dans la cellule (Payne, 1997, Jarolimek *et al.*, 1999). Ceci intensifierait l'activité du réseau en réponse à une dépolarisation induite par les ions K⁺ et aussi parce que l'inhibition hyperpolarisante rapide GABAergique est basée sur une faible [Cl⁻]_i dans les neurones.

Récemment, Li *et al.* (2007) et Horn *et al.* (2010) ont démontré un rôle pour KCC2 dans la formation des épines dendritiques. En effet, KCC2 ne se retrouve pas qu'au niveau des synapses inhibitrices, on les retrouve également à proximité des synapses excitatrices. Li *et al.* ont montré que la maturation des épines est altérée dans les neurones corticaux de souris KCC2-déficientes : les cellules développent de longues protusions dendritiques fortement mobiles (Li *et al.*, 2007). Ce rôle morphogénique est indépendant du rôle de transport des ions Cl⁻ par KCC2 : c'est la liaison entre le domaine C-terminal de KCC2 à une protéine associée au cytosquelette, 4.1N, qui jouerait ce rôle (Li *et al.*, 2007). Ainsi, l'augmentation de l'expression des KCC2 au cours du développement agit à la fois sur la maturation des

synapses excitatrices (via son rôle morphogénique) et sur la maturation des synapses GABAergiques et glycinergiques inhibitrices (via son rôle de cotransporteur d'ions Cl⁻). KCC2 pourrait synchroniser le développement des synapses excitatrices et inhibitrices (Li *et al.*, 2007).

Dans le système nerveux mature, KCC2 est exprimé en grande quantité et son expression est restreinte aux neurones. De nombreuses régions du cerveau expriment KCC2 (hippocampe, cervelet, bulbe olfactif, rétine, tronc cérébral, moelle épinière) (Lu *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 1999; Vu *et al.*, 2000; Gulyas *et al.*, 2001; Kanaka *et al.*, 2001; Mikawa *et al.*, 2002; Mercado *et al.*, 2004) mais KCC2 n'est ni détecté dans les voies de la matière blanche ni dans le SNP ni dans les structures non neuronales (Payne *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Kanaka *et al.*, 2001). KCC2 est exprimé au niveau de la membrane plasmique dans la région des corps cellulaires et des dendrites (incluant les épines dendritiques) mais pas dans les axones (Williams *et al.*, 1999; Gulyas *et al.*, 2001; Hübner *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2007).

1.4.2.1 Isoformes de KCC2

Uvarov *et al.* (2007) ont démontré que le gène codant pour KCC2 (Slc12a5) génère 2 ARNm, KCC2a et KCC2b, par épissage alternatif du promoteur et du premier exon. La différence entre KCC2a et KCC2b réside dans la partie N-terminale, une séquence unique de 40 acides aminés dans KCC2a qui inclut une séquence de liaison potentielle avec la Kinase Ste20-related proline alanine rich (SPAK). Les souris *KO* pour l'isoforme KCC2b survivent jusqu'à 3 semaines après la naissance (annexe 1) alors que les souris *KO null* pour les deux isoformes meurent immédiatement à la naissance. Ceci suggère que KCC2a aurait un rôle important dans les fonctions vitales des structures les plus postérieures du cerveau. En effet, en règle générale, l'expression de KCC2 suit la maturation neuronale du SNC; chez le rat et la souris, KCC2 est d'abord détectée dans les neurones postmitotiques de la moelle épinière et dans le tronc cérébral puis dans les structures encéphaliques

antérieures (Li *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2004). Uvarov *et al.* (2007) ont montré chez la souris postnatale que l'expression d'ARNm des KCC2a était relativement constante tandis que les KCC2b est fortement régulée positivement dans le cortex. Dans un article récent Uvarov *et al.* (2009) montrent que les isoformes KCC2a et KCC2b ont un patron d'expression similaire dans le cerveau néonatal de souris et sont colocalisés dans la plupart des neurones dans les aires non corticales des régions encéphaliques postérieures. Les expériences de coimmunoprécipitation et de coexpression suivies de l'analyse des gels non dénaturants indiquent que des hétéromères KCC2a-KCC2b sont formés *in vitro* et pourraient être formés *in vivo*. Dans le cerveau de la souris néonatale, une partie substantielle des oligomères KCC2 pourrait être sous forme d'hétéromères alors que chez un animal mature, ce serait plutôt des homomères KCC2b qui prédomineraient. Le tronc cérébral du nouveau-né (Balakrishnan *et al.*, 2003) et les neurones rétiniens (Zhang *et al.*, 2006) expriment KCC2 mais cette protéine est non fonctionnelle dans ces structures. Ceci peut être expliqué par le fait que les canaux KCC2 ne sont pas transportés (Zhang *et al.*, 2006) ou oligomérisés (Blaesse *et al.*, 2006) à la membrane plasmique des neurones ou qu'ils requièrent une transformation additionnelle comme des phosphorylations (Khirug *et al.*, 2005). Selon Uvarov *et al.* (2009), qui ont trouvé que les KCC2a pouvaient se lier à SPAK, il est possible qu'il existe une régulation différente pour les KCC2a et les KCC2b.

1.4.2.2 Profil développemental des KCC2

Durant le développement du cerveau, KCC2 est régulé positivement dans la plupart des régions encéphaliques, selon un gradient caudo-rostral correspondant au gradient de maturation de ces régions (Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2004). Si on considère le cerveau dans sa totalité, la quantité d'ARNm est multiplié par 7 à 10 fois de la naissance à l'âge adulte et le nombre de protéines exprimées est multiplié par 4 (Lu *et al.*, 1999).

Selon une étude de Hübner *et al.* (2001b), l'ARNm des KCC2 est détecté dès E11.5-12.5 dans la moelle épinière ventrale de la souris et envahit les régions dorsales vers E18.5, ceci est confirmé par Li *et al.* (2002) en immunohistochimie. Récemment, Delpy *et al.* (2008) ont étudié l'ontogénie de KCC2 (et NKCC1) dans la moelle épinière de souris par immunohistochimie. Leurs résultats indiquent que KCC2 est détecté dans la partie ventrale de la moelle épinière dès E11.5 (âge le plus précoce étudié), ce qui confirme les résultats obtenus par les études de Hübner *et al.* (2001b) et Li *et al.* (2002). Aucun marquage n'a pu être détecté dans la zone marginale et les parties dorsales de la moelle épinière à E11.5 mais le marquage pour KCC2 s'étend dorsalement par la suite. À E12.5, la partie médio-latérale de la région dorsale de la moelle épinière exprime KCC2 mais la zone marginale n'est toujours pas marquée. À E13.5, le marquage envahit la zone médiane de la partie dorsale de la moelle épinière. Un jour plus tard, à E14.5, toute la zone dorsale exprime KCC2. Après E14.5, l'expression de KCC2 semble stable. À partir d'E13.5, dans la zone marginale, KCC2 est exprimé par des prolongements (très probablement dendritiques) qui rayonnent dans la future matière blanche. Finalement, en utilisant un double marquage pour KCC2 et Islet1/2 (un marqueur spécifique de certains motoneurones), ils ont observé que KCC2 est exprimé par l'ensemble des pools de motoneurones dès E13.5. En observant à fort grossissement ces motoneurones, ils ont constaté une diminution du marquage pour KCC2 au niveau de la membrane au cours du développement alors que l'intensité de marquage reste stable au niveau du cytoplasme. Selon ces auteurs, dans la moelle épinière de la souris, l'expression de KCC2 suit un gradient ventrodorsal et cette protéine serait exprimé très précocement dans les motoneurones.

Stil *et al.* (2009) ont étudié l'ontogénie de KCC2 dans la moelle épinière du rat. La quantification par Western blot dans cette étude montre que l'expression de KCC2 augmente au cours du développement de la moelle épinière pour atteindre un pic vers P15 puis se stabiliser. Afin de détecter des différences régionales dans l'expression des KCC2, ces auteurs ont analysé et quantifié les résultats obtenus par immunohistochimie au niveau de la corne ventrale où se situent les motoneurones et la matière blanche ventrale. Des dendrites s'étendant dans la matière blanche aussi observés chez la souris sont retrouvées

dès E17 chez le rat. Le marquage pour KCC2 est très faible à E17 dans la corne ventrale; il devient très intense dans la région des motoneurones à P5. Au niveau des motoneurones à P10, le marquage de KCC2 forme une bande nette délimitant le contour des MN qui semble être associée avec la membrane plasmique des MN. L'intensité de marquage pour KCC2 augmente d'E17 à P5 à la fois dans les zones de la corne ventrale et de la matière blanche que ces auteurs ont choisies pour faire leur analyse. Ils ont ensuite observé une baisse d'intensité de marquage pour KCC2 dans ces deux régions entre P5 et P10 puis, après P10, l'intensité reste stable dans la corne ventrale alors qu'elle continue de diminuer dans la matière blanche. Au niveau du gris médian, où se trouvent les interneurones des CPG, et dans les parties les plus superficielles de la corne dorsale, le marquage pour KCC2 est très faible à E17 et P0 et il augmente jusqu'à P5-P10. Les ratios d'intensité entre zone de la corne ventrale/zone de la matière blanche, zone de la corne ventrale/zone de la corne dorsale, diminuent avec l'âge, les auteurs en déduisent que l'expression de KCC2 dans la moelle épinière de rat suit des gradients latéromédian et ventrodorsal. L'expression de KCC2 dans la moelle épinière ventrale et le gris médian depuis E17 suggère une expression de KCC2 par les motoneurones et les interneurones des CPG.

L'expression de KCC2 suit le développement des neurones (Stein *et al.*, 2004) et peut donc servir d'indicateur de maturation. Il existe aussi une corrélation entre l'expression croissante des KCC2 et la synaptogenèse (Gulyas *et al.*, 2001; Takayama et Inoue, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

1.4.2.3 Régulation de l'expression et de la fonction des KCC2

Karadsheh et Delpire (2001) suggèrent que l'expression restreinte des KCC2 aux neurones est liée à un *neuronal-restrictive silencing element* (NRSE). Cet élément lie un facteur de transcription appelé le *neuronal-restrictive silencing factor* (NRSF) qui rend la transcription de ce gène « silencieuse » dans les cellules non neuronales. Le NRSE ne serait pas le seul élément empêchant l'expression des KCC2 dans les neurones. En effet, Uvarov

et al. (2005) ont montré que la souris transgénique qui ne possède pas de NRSE démontre une expression des KCC2 spécifique au SNC et une régulation positive des KCC2 au cours du développement comme pour le type sauvage.

L'une des premières hypothèses avancées sur la régulation des KCC2 durant le développement fut l'hypothèse de l'autorégulation par le GABA. Ganguly *et al.* (2001) ont étudié les changements des réponses GABAergiques de dépolarisation à hyperpolarisation en relation avec les KCC2 sur des cellules embryonnaires d'hippocampe en culture. Ils ont montré que lorsque l'on bloquait les récepteurs GABA_A avec de la bicuculline, le passage des réponses GABAergiques de dépolarisation à hyperpolarisation était retardé et l'expression des KCC2 diminuée. Cet effet a été relié à l'élévation de la concentration interne en ions calciques, indépendamment des décharges neuronales. Le blocage des récepteurs GABA_A par la bicuculline a été répété dans les cellules rétiniennes de la tortue en développement dans une étude par Leitch *et al.* (2005). Les résultats obtenus sont semblables, avec une baisse de l'expression des KCC2 et une augmentation de l'activité spontanée. Toutefois, des études subséquentes sur des cultures de neurones et des expériences *in vivo* (Ludwig *et al.*, 2003; Titz *et al.*, 2003) démontrent que le blocage de la transmission GABAergique n'affecte ni l'expression des KCC2 ni un changement dans le potentiel d'inversion de la réponse au GABA.

Le GABA est présent et fonctionnel très tôt dans le SNC des mammifères, bien avant la formation des synapses. Le GABA pourrait supporter plusieurs rôles incluant la prolifération des cellules progénitrices, la migration neuronale, la croissance axonale et la formation des synapses (Represa et Ben-Ari, 2005). Durant la période embryonnaire et périnatale, les dépolarisations entraînées par l'activation des récepteurs GABA peuvent générer des potentiels d'action qui en retour activeraient des canaux voltage-dépendants Ca²⁺. En plus de cela, lorsque les récepteurs GABA et les synapses glutamatergiques sont coactivés durant des patrons d'activité, la dépolarisation GABA-dépendante peut supprimer le bloc par les ions Mg²⁺ des récepteurs NMDA (Ben-Ari *et al.*, 1997). L'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire résultant de l'activation des canaux voltage-dépendants Ca²⁺ et des récepteurs NMDA provoquerait une série de mécanismes Ca²⁺ - dépendants impliqués dans

différents processus développementaux. L'importance des dépolarisations qui dépendent de la concentration en ions Cl^- dans la cellule a été récemment vérifiée en exprimant prématurément les KCC2 dans les neurones en développement, ce qui rend l'action de la glycine inhibitrice plus tôt que la normale (Reynolds *et al.*, 2008). Ces auteurs ont surexprimé KCC2 dans des embryons de poissons zèbres, ce qui a eu pour effet de rendre la glycine hyperpolarisante dans tous les neurones. Parallèlement, ils ont observé une diminution du nombre des neurones présentant de l'activité spontanée et une activité motrice perturbée par rapport aux animaux contrôles. Ils ont également observé une diminution du nombre de motoneurones et d'interneurones. Ces résultats suggèrent donc que l'excitation médiée par les ions chlorure joue un rôle crucial dans la neurogenèse aux stades les plus précoces du développement.

Le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité neuronale et dans la plasticité synaptique dépendante de l'activité (Schinder et Poo, 2000). Le BDNF est aussi impliqué dans la genèse de l'activité épileptique (Binder *et al.*, 2001) et dans la baisse de l'expression des KCC2 liée à une augmentation de l'excitabilité neuronales (douleurs neuropathiques) après des lésions spinales (Coull *et al.*, 2005). Le BDNF peut réguler l'expression des KCC2 dans deux directions différentes selon le degré de maturité de l'animal ou l'association à des pathologies. Tôt durant le développement, le BDNF augmente l'expression des KCC2 comme le montre l'utilisation d'embryons transgéniques surexprimant le BDNF (Aguado *et al.*, 2003). D'autres études montrent que le BDNF diminue l'expression des KCC2 via l'activation d'un récepteur TrkB (Rivera *et al.*, 2002; Boulenguez *et al.*, 2010) ce qui affecte l'extrusion des ions Cl^- hors des cellules neuronales et par conséquent, affecte l'inhibition. Cette décroissance rapide des KCC2 serait due au retrait rapide des KCC2 de la membrane plasmique (Rivera *et al.*, 2002; 2004).

1.4.3 NKCC1 et ses fonctions dans le système nerveux

NKCC1 (*Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter type1*) est un cotransporteur membranaire d'un poids moléculaire d'environ 195kDa qui accumule les ions Cl⁻ dans la cellule grâce au gradient de Na⁺ généré par la pompe Na⁺-K⁺-ATPase (Russell, 2000). NKCC1 est exprimé de manière ubiquitaire, dans les cellules épithéliales sécrétrices et les cellules non épithéliales (Haas et Forbush, 2000; Russell, 2000). Dans les cellules épithéliales, NKCC1 est exprimé dans la membrane basolatérale et alimente la cellule en ions Cl⁻ qui sont sécrétés à travers la membrane apicale (Evans *et al.*, 2000; Shillingford *et al.*, 2002; Bachmann *et al.*, 2003). NKCC1 est aussi exprimé par certaines cellules non épithéliales dont les neurones et les cellules gliales (Hübner *et al.*, 2001a, Marty *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2002). On retrouve NKCC1 dans les neurones centraux, les oligodendrocytes, la membrane apicale des cellules du plexus choroïdien et dans les ganglions de la racine dorsale (Sung *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2004; Dzhalala *et al.*, 2005). Dans la plupart des cellules étudiées, ce transporteur s'avère particulièrement important dans le maintien du volume cellulaire (Russell, 2000).

1.4.3.1 Profil développemental des NKCC1

Dans le cerveau de la souris, l'ARNm de NKCC1 est détectable dès E12.5 dans la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire latérale de la région subcorticale (Li *et al.*, 2002). De plus, un signal très fort est observé au niveau du plexus choroïde tout au long du développement (Li *et al.*, 2002). À E14.5, l'expression des ARNm de NKCC1 augmente significativement dans les éminences ganglionnaires. Au niveau du cortex, ce sont les zones ventriculaires qui expriment en premier lieu NKCC1 puis NKCC1 n'est plus exprimé par la zone ventriculaire (vers E17-20), mais par les zones plus corticales à un moment qui correspond à la fin de la neurogenèse (Li *et al.*, 2002). Dans les cellules du cortex, il y a relocalisation de NKCC1 qui présentent une expression somatique vers E17 qui devient dendritique vers P0 (Li *et al.*, 2002). Toutefois, NKCC1 n'est pas le seul accumulateur de

Cl⁻ dans certaines régions du cerveau comme l'olive supérieure latérale, où NKCC1 n'est pas détecté bien que la concentration en Cl⁻ soit élevée et que des réponses dépolarisantes au GABA soient enregistrées (Balakrishnan *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2007) ont également bloqué ou supprimé NKCC1 dans des cellules ganglionnaires et amacrine de la rétine immature sans y affecter la forte concentration interne en Cl⁻.

Il semble que NKCC1 soit exprimé par les glies radiaires et les cellules neuronales précurseurs mais ce cotransporteur ne semble plus être exprimé par les cellules postmitotiques en migration et les neurones en différenciation aux alentours d'E14.5 (Li *et al.*, 2002). NKCC1 jouerait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire neuronal (Li *et al.*, 2002) via son rôle dans le contrôle du volume cellulaire.

Delpy *et al.* (2008) ont utilisé l'immunohistochimie pour localiser NKCC1 au niveau de la moelle épinière de souris embryonnaire en développement (d'E11.5 à P0) et effectué des expériences pharmacologiques avec la bumétanide à faible concentration pour bloquer NKCC1. NKCC1, comme KCC2, est détecté dès E11.5 dans cette étude. Néanmoins, un marquage très dense est observé dans toute la matière grise présomptive (zone intermédiaire). La zone marginale exprime NKCC1 mais pas KCC2. À E12.5, le marquage pour NKCC1 dans la partie ventrale reste stable mais envahit la zone latérodorsale de la future matière grise de la moelle épinière. Un jour plus tard, à E13.5, toute la partie dorsale de la matière grise de la moelle exprime NKCC1. D'E14.5 à P0, le marquage pour NKCC1 reste fort dans la partie ventrale de la moelle mais il est encore plus dense dans la partie dorsale. Finalement, ces auteurs ont observé que NKCC1 montre un marquage ponctiforme dans la matière grise et la matière blanche dans la zone ventrale où se situent les motoneurones. En observant à fort grossissement ces motoneurones, d'E13.5 à P0, ils ont remarqué que l'intensité de marquage pour NKCC1 diminue au niveau du cytoplasme et qu'elle reste stable au niveau de la membrane des cellules. Dans la moelle épinière de souris en développement, NKCC1 suit un gradient ventrodorsal.

Stil *et al.* (2009) ont étudié la distribution de NKCC1 dans la moelle épinière du rat en développement (d'E17 à P20) en utilisant l'immunohistochimie sur des coupes de moelle

au niveau lombaire. À E17, toute la région de la future matière blanche exprime NKCC1. Le marquage est plus faible au niveau de la future matière grise. La quantification de l'intensité du marquage pour les NKCC1 montre que l'expression de NKCC1 décroît avec l'âge quelle que soit la région étudiée (corne ventrale, matière blanche ventrale, gris médian, corne dorsale). Afin de déterminer si NKCC1 est exprimé au niveau des membranes des MN, les auteurs ont effectué un double marquage pour NKCC1 et la synaptophysine, un marqueur d'éléments présynaptiques. Le marquage pour NKCC1 forme une bande à l'extérieur de la bande réactive pour la synaptophysine à P10. Ces résultats suggèrent qu'après la naissance, NKCC1 n'est pas associé à la membrane cytoplasmique des MN mais que ce cotransporteur serait plutôt exprimé par les cellules gliales ou les afférences (primaires ou d'interneurones spinaux) qui entourent les MN.

Une étude récente de Gonzalez-Islas *et al.*, (2009) dans la moelle épinière en développement de poulet a montré que NKCC1 n'est pas le seul accumulateur de Cl⁻ au niveau des motoneurones. En effet, ils ont montré qu'une accumulation de Cl⁻ dans les motoneurones persistait après application d'un bloqueur des NKCC1. L'échangeur d'anions AE3 serait responsable de cette accumulation résiduelle de Cl⁻ dans les motoneurones.

Certaines études suggèrent que l'expression ou la fonctionnalité de NKCC1 décroît avec le temps (Yamada *et al.*, 2004; Stil *et al.*, 2008) alors que d'autres études indiquent que NKCC1 est de plus en plus exprimé au cours du développement (Clayton *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2001; Mikawa, 2002).

1.4.3.2 Détection de NKCC1 : des résultats discordants

Un grand nombre d'études porte sur la localisation de l'ARNm de NKCC1 et son expression sous forme protéique dans le SN adulte et en développement chez les rongeurs. Cependant, les informations qui en résultent sont relativement contradictoires. Durant le développement embryonnaire, l'ARNm est retrouvé en quantité importante au niveau de la zone ventriculaire des éminences ganglionnaires alors que des niveaux plus modestes sont

retrouvés au niveau de la zone ventriculaire du néocortex. Ceci suggère que NKCC1 pourrait être impliqué dans la prolifération neuronale (Hübner *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2002). Ce résultat est en contradiction avec une étude précédente (Clayton *et al.*, 1998) dans laquelle l'ARNm de NKCC1 se retrouve au niveau de la plaque corticale mais est absent de la zone ventriculaire. Durant le développement postnatal, certaines études rapportent une diminution générale de l'ARNm et de l'expression protéique des NKCC1 avec la maturation neuronale dans les parties antérieures du cerveau et le cervelet (Plotkin *et al.*, 1997b; Yamada *et al.*, 2004). D'autres études montrent qu'il y aurait plutôt une augmentation des ARNm et protéines de NKCC1 (Clayton *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2001) dans le cervelet (Mikawa *et al.*, 2002) et l'hippocampe (Wang *et al.*, 2002). L'expression de NKCC1 est très forte dans le plexus choroïde où il serait impliqué dans la circulation du liquide cébrospinal et la régulation du volume avec KCC1, KCC3 et KCC4 (Kanaka *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Le Rouzic *et al.*, 2006). Dans le cerveau mature, une expression faible à modérée de NKCC1 est détectée dans le tronc cérébral, les bulbes olfactifs, le thalamus, le cortex, l'hippocampe et le cervelet, bien que l'information sur les quantités ne se recoupe pas toujours (Plotkin *et al.*, 1997a; Clayton *et al.*, 1998; Kanaka *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Cette disparité dans les résultats pourrait être expliquée par l'emploi de différents anticorps générés pour reconnaître spécifiquement NKCC1. La plupart des études publiées utilisent un anticorps monoclonal anti-NKCC1, T4 (Lytle *et al.*, 1995). Les T4 semblent être un outil valable pour les immunoblots (Zhang *et al.*, 2006; Blaesse *et al.*, 2009) mais l'interprétation des données semble être plus hasardeuse en ce qui concerne l'immunohistochimie (Hübner *et al.*, 2001a; Kanaka *et al.*, 2001). Les résultats obtenus par immunohistochimie sur l'expression de NKCC1 par les neurones et les cellules gliales dans les tissus sont en effet contradictoires (Li *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006 et 2007).

Pour ces raisons, nos résultats d'immunohistochimie obtenus pour NKCC1 doivent être interprétés avec prudence.

1.4.4 KCC2, NKCC1 et inhibition au cours du développement

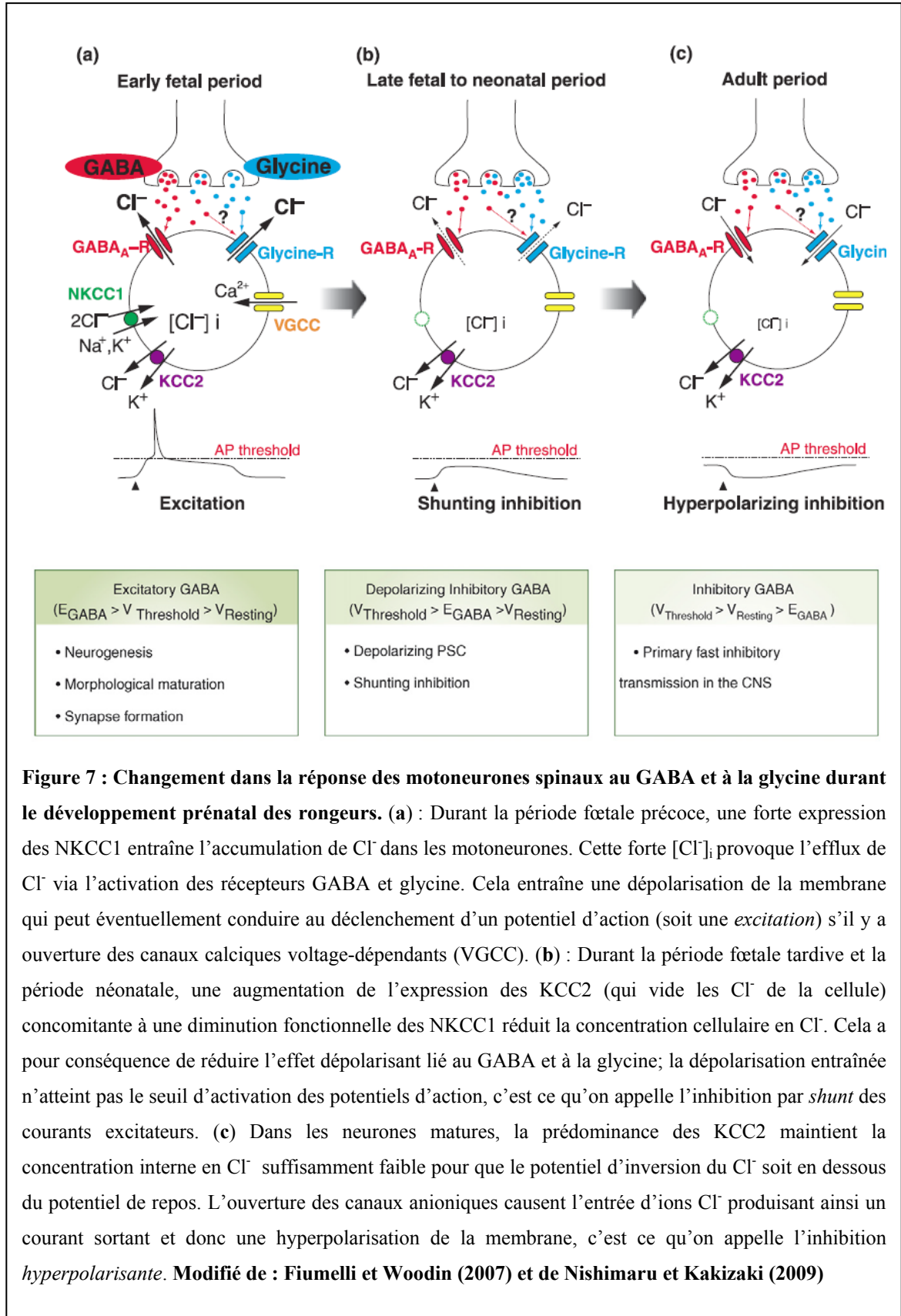
L'organisation et les propriétés de la moelle épinière immature sont souvent différentes de celles retrouvées aux stades matures mais dans le cas de l'inhibition, ces différences sont considérables. À ce titre, le GABA et la glycine exercent une action dépolarisante (excitatrice) aux stades embryonnaires et au début de la vie postnatale alors qu'elle est hyperpolarisante (inhibitrice) seulement aux stades plus matures. Ce passage d'excitation à inhibition fonctionnelle est observé dans de nombreuses régions du cerveau et dans la moelle épinière chez le rat et la souris (revue dans Ben-Ari, 2001, 2002 et dans Sibilla et Ballerini, 2009; Nishimaru et Kakizaki, 2009). Chez la souris, le passage d'excitation à inhibition dans les motoneurones a lieu autour de E15.5, soit avant la naissance (Delpy *et al.*, 2008), alors que chez le rat, on observe ce changement durant la première semaine postnatale (Stil *et al.*, 2009).

On distingue deux types d'inhibition possibles : l'inhibition *hyperpolarisante* et l'inhibition par *shunt*. L'inhibition via les récepteurs GABA_A et GlyR est liée au fonctionnement des canaux Cl⁻. De ce fait, le gradient de concentration en Cl⁻ au travers de la membrane détermine la nature de l'effet inhibiteur. Le gradient de concentration en Cl⁻ est déterminé par un équilibre entre l'activité des NKCC qui pompent les Cl⁻ dans des cellules et les KCC qui pompent les Cl⁻ hors des cellules. Le potentiel d'inversion synaptique des courants liés aux récepteurs GABA_A et GlyR varie au cours du développement. Si le potentiel d'inversion synaptique se situe en dessous du potentiel de repos de la cellule, l'inhibition sera *hyperpolarisante* (fig. 7). C'est ce qui a lieu dans des cellules matures lorsque les KCC2 maintiennent la concentration intracellulaire en Cl⁻ faible. Au contraire, si le potentiel d'inversion synaptique se situe entre le potentiel de repos et le seuil d'activation des potentiels d'action, les synapses GABAergiques auront un effet de *shunt* (Gulledge et Stuart, 2003) car la conductance synaptique court-circuite les courants qui sont générés par les synapses excitatrices voisines. Si une synapse inhibitrice par *shunt* est activée, la résistance d'entrée diminue localement et l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs subséquents sera réduite. Enfin, si le potentiel d'inversion

synaptique se situe au dessus du seuil de potentiel d'action, les synapses GABAergiques peuvent être excitatrices comme c'est le cas durant les étapes les plus précoces du développement (fig. 7, revue dans Ben-Ari, 2002). En effet, tôt durant le développement, les NKCC sont prédominants et maintiennent la concentration intracellulaire en Cl⁻ forte. Les KCC sont ensuite de plus en plus exprimés jusqu'à être prédominants à l'état mature.

Pour que KCC2 soit exprimé de façon fonctionnelle, des mécanismes régulant l'expression de son ARNm, sa synthèse en protéines, son transport cellulaire, son insertion membranaire ainsi que son activation enzymatique sont requis. Dans les parties antérieures du cerveau (néocortex et hippocampe), l'expression de KCC2 est concomitante à un shift du potentiel d'inversion du GABA_A vers des valeurs plus négatives (Lee *et al.*, 2005). Dans cette région du cerveau, l'expression des KCC2 limite donc le développement du système nerveux. En revanche, dans d'autres régions du cerveau comme la rétine, la moelle épinière et le tronc cérébral auditif (Vu *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Balakrishnan *et al.*, 2003), il semble que cela soit les systèmes de régulation de la localisation de KCC2 (Vu *et al.*, 2000), de sa phosphorylation et de son oligomérisation (Blaesse *et al.*, 2006) qui limitent la maturation de l'activité inhibitrice. L'expression des KCC2 demeure cependant importante dans le développement de l'inhibition car chez les souris KCC2-KO, le potentiel d'équilibre des Cl⁻ reste dépolarisé au niveau des motoneurones (Hübner *et al.*, 2001b).

La baisse de concentration en ions Cl⁻ au cours du développement est actuellement expliquée par une baisse de l'expression et de la fonctionnalité des NKCC1 en parallèle à une expression accrue des KCC2 (Li *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 1999; Payne *et al.*, 2003; Delpy *et al.*, 2008; Stil *et al.*, 2009).



1.5 Problématique générale

Jusqu'à présent, aucune étude n'a porté sur l'expression de KCC2 et de NKCC1 dans la moelle épinière de notre modèle, l'opossum *M. domestica*. Celui-ci, malgré son immaturité à la naissance est capable d'effectuer des mouvements alternés des membres antérieurs qui lui permettent de se déplacer jusqu'à une tétine à sa sortie du cloaque. Cela suggère que les mécanismes permettant l'inhibition sont déjà mis en place à la naissance. Une grande partie du développement de l'opossum étant soumise à des contraintes extérieures très différentes de l'environnement utérin; il est possible que les patrons d'expression au cours du développement de KCC2 et de NKCC1 soient différents de ceux observés chez les rongeurs comme le rat ou la souris. En utilisant l'opossum comme modèle, nous espérons apporter des éléments permettant de résoudre la question de l'influence respective des KCC2 et des NKCC1 sur l'apparition de l'inhibition dans les réseaux moteurs de la moelle épinière. Nous sommes conscients qu'un projet de maîtrise doit être réalisé dans un temps relativement court, centré autour d'un projet circonscrit. Ainsi, les résultats obtenus par immunohistochimie sur des coupes de moelle épinière d'opossums en développement, qui font l'objet de la présente étude, constituent une première étape nécessaire dans la description du développement de l'inhibition chez l'opossum. Des expériences d'électrophysiologie sont requises afin de compléter cette étude et de tirer des conclusions sur la fonctionnalité de ces deux cotransporteurs cation-chlorure.

2. Matériel et méthodes

2.1 Animaux et préparation du tissu

La distribution de KCC2 et de NKCC1 a été étudiée grâce aux techniques d'immunohistochimie employées sur des coupes des renflements spinaux chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Dans certaines expériences, l'immunohistochimie a été précédée d'un traçage rétrograde des motoneurones. Les animaux proviennent d'un élevage entretenu à l'animalerie du Département de Sciences biologiques de l'Université de Montréal, selon les méthodes de Fadem *et al.* (1982) et Kraus et Fadem (1987). Cette recherche répond aux normes établies par le Conseil Canadien de protection des animaux et utilise un protocole approuvé par le Comité d'éthique animale de l'Université de Montréal.

10 opossums adultes et un total de 31 opossums âgés entre P0 jour de la naissance et P60 ont été utilisés pour l'immunohistochimie (P0 n=3, P5 n= 10, P12 n=5; P15 n=6, P25 n=1, P30 n=2, P40 n=2, P50 n=1; P60 n=1). Les opossums âgés de P20 ou plus sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (en surdose) avant de subir une perfusion transcardiaque immédiate avec une solution de saline suivie par une solution de fixation (paraformaldéhyde 4% dans du tampon phosphate salin 0.1M (PBS 0.1M)). Les renflements cervicaux et lombaires sont disséqués et isolés puis postfixés dans la même solution fixatrice pendant 4h minimum, à 4°C. Les animaux plus jeunes que P20 sont anesthésiés par hypothermie jusqu'à absence de réflexes, puis décapités et éviscérés dans du PBS 0.1M. Une laminectomie est effectuée pour exposer la moelle épinière avant immersion des tissus dans la solution fixatrice. Les renflements cervicaux et lombaires sont laissés dans les carcasses des animaux plus jeunes que P15 mais ils sont retirés des carcasses chez des animaux plus âgés. Dans tous les cas, les tissus sont ensuite transférés dans une solution cryoprotectrice de sucrose 30% dans du PBS 0.1M toute une nuit à 4°C. Les tissus sont ensuite embloqués dans du Tissue-Tek OCT Compound (Miles Scientific) solidifié avec de la glace sèche en poudre. Les tissus sont ensuite sectionnés à l'aide d'un

cryostat (CM3050S Leica) en coupes de $16\mu\text{m}$ d'épaisseur qui sont montées sur des lames Superfrost (Fisher).

2.2 Immunohistochimie

Les protocoles suivants ont été élaborés suivant des techniques usuelles d'immunohistochimie (Delpy *et al.*, 2008; Stil *et al.*, 2009 pour la fluorescence, Lamoureux *et al.*, 2005 pour le DAB) et adaptés au laboratoire aux tissus utilisés.

Les coupes sont lavées 20 min dans du tampon Tris 0.05M avec du NaCl 1.5% et du Triton X-100 0.3%, pH 7.4 (TBST) et sont incubées à 4°C, toute une nuit avec l'anticorps primaire, soit un anticorps polyclonal anti-KCC2 fait chez le lapin (1 :400, Millipore) soit un anticorps monoclonal anti-NKCC1 obtenu avec des lymphocytes T4 (1:400, Hybridoma Bank, Université de l'Iowa). Les sections sont ensuite rincées trois fois dans du TBST (30 min) avant d'être incubées durant 2h à température de la pièce avec l'anticorps secondaire, chèvre anti-lapin ou chèvre anti-souris couplés à de l'Alexa-Fluor488 (1:400, Invitrogen) dans du TBST avec 3%NGS utilisé comme bloc. Les coupes sont ensuite rincées une fois dans du TBST et deux fois dans du tampon Tris 0.05M + HCl. Les lames sont ensuite recouvertes de lamelles en utilisant du Fluoromount (SouthernBiotech) comme milieu de montage. Des contrôles ont été effectués en omettant soit l'anticorps primaire, soit l'anticorps secondaire. La figure 8 montre des coupes adjacentes traitées avec (fig. 8A) ou sans (fig. 8B) l'anticorps primaire anti-KCC2. Les photos sont prises au même temps d'exposition afin de mettre en évidence l'absence de marquage après omission de l'anticorps. Un résultat similaire a été obtenu après omission de l'anticorps anti-NKCC1 ou des anticorps secondaires (non illustré).

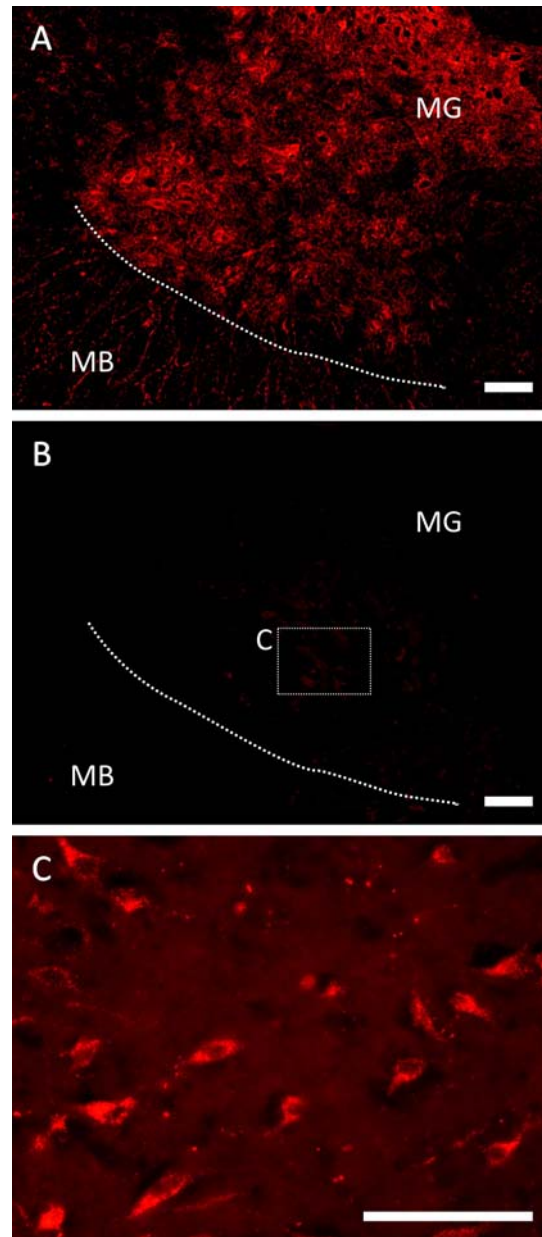


Figure 8 : Expériences contrôles pour l'anticorps anti-KCC2. Microphotographies de la portion ventrale de coupes transversales du même renflement cervical de la moelle épinière d'un opossum adulte après traitement avec l'anticorps primaire anti-KCC2 (A) ou son omission (B). A et B sont prises au même temps d'exposition. Les lignes pointillées en A et B indiquent la limite entre matière grise (MG) et matière blanche (MB) ; le cadre en B représente la microphotographie en C. Les neurones sur les coupes non traitées avec l'anticorps primaire montrent des granules fluorescents dans leur cytoplasme (C). Pour chaque figure, dorsal est vers le haut et latéral vers la gauche. Échelles = 100 μ m.

L'immunohistochimie avec les tissus d'opossums adultes est problématique. En effet, chez ces derniers, les neurones montrent une fluorescence intrinsèque sous la forme de granules cytoplasmiques au niveau des corps cellulaires (fig. 8C) qui pourrait interférer avec le marquage en immunofluorescence à ce niveau. Nous avons donc vérifié les résultats obtenus en immunofluorescence en réalisant le même type d'expérience mais avec précipitation au DAB, visible sans recours à la fluorescence.

Après avoir effectué les coupes au cryostat comme décrit précédemment, les coupes sont lavées trois fois dans du PBS pour une durée totale 30 minutes entre chaque étape. Afin de réduire le marquage non spécifique, une solution de bloc est appliquée (1% NGS, 3% BSA, 0.2% Triton X-100 dans du PBS 0.1M) pour 30 minutes. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, soit un anticorps polyclonal anti-KCC2 fait chez le lapin (1:400, Millipore) soit un anticorps monoclonal anti-NKCC1 obtenu avec des lymphocytes T4 (1:400, Hybridoma Bank, Université de l'Iowa), à 4°C, toute une nuit. Après lavage, les sections sont incubées avec un anticorps secondaire, un anticorps IgG biotinylé fait chez le cheval, anti-lapin et anti-souris (dilué au 1 :200, Vector Kit, Vector Lab) pendant 1h à la température de la pièce. Les complexes anticorps-antigène sont révélés grâce à la précipitation des diaminobenzidines sous l'effet des peroxidases selon les instructions de la compagnie (DAB Kit, Vector Lab). La réaction de coloration est observée entre 2 et 5 minutes après application. Après les lavages finaux nécessaires pour ralentir la réaction de précipitation des peroxydases, les coupes sont laissées à sécher toute une nuit à l'air puis déshydratées progressivement dans des solutions de plus en plus concentrées d'éthanol (80%, 90%, 100%) et de toluène. Finalement, les lames sont couvertes avec des lamelles en utilisant de l'Eukitt (EMS) comme milieu de montage. Comme précédemment, les contrôles sont effectués en omettant soit l'anticorps primaire, soit l'anticorps secondaire.

2.3 Spécificité des anticorps

L'anticorps NKCC1 est généré contre un fragment d'une protéine de fusion comprenant les 310 derniers résidus de l'extrémité C-terminale (S760-S1212) du NKCC du côlon humain. Il reconnaît à la fois les isoformes de NKCC1 et NKCC2 (Lytle *et al.*, 1995). Les anticorps monoclonaux T4 ont été obtenus auprès de l'Université de Iowa (Development Studies Hybridoma Bank). NKCC2 ne semble être ni présent dans le cerveau (Gamba *et al.*, 1994; Delpire et Mount, 2002) ni dans la moelle épinière (Becker *et al.*, 2003; Delpire et Mount, 2002; Gamba *et al.*, 1994). De plus, Delpy *et al.* (2008) ont observé que les résultats en immunohistochimie obtenus avec l'anticorps monoclonal T4 et un anticorps polyclonal de lapin sur la moelle épinière de souris en développement étaient similaires. Le marquage obtenu dans nos expériences avec cet anticorps monoclonal représente donc très probablement NKCC1 et nous interpréterons nos résultats dans cette optique.

Il aurait été souhaitable d'effectuer des contrôles supplémentaires par saturation des deux anticorps utilisés (NKCC1 et KCC2) avec leurs antigènes correspondants mais ceux-ci n'étaient pas disponibles sur le marché.

2.4 Traçage rétrograde des motoneurones

Afin de déceler l'expression des cotransporteurs spécifiquement par les motoneurones, ceux-ci ont été identifiés dans certaines expériences en effectuant un traçage rétrograde au Texas-Red couplés à des dextrans aminés (TRDA, 3000MW, Invitrogen) préalablement au traitement immunohistochimique. Après anesthésie, et éviscération, la peau et les muscles sont retirés dorsalement. Une laminectomie et une crâniotomie sont effectuées afin d'exposer le tissu nerveux. Les spécimens sont ensuite décérébrés par transection complète en arrière au niveau du mésencéphale caudal et placé dans un Pétri à dissection rempli de solution physiologique (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, dextrose 15 mM, oxygénée avec 95% O₂/5% CO₂; pH 7.4).

Les nerfs des plexus brachial et lombaire sont isolés d'un côté ou des deux côtés de la moelle épinière. Les spécimens sont ensuite retirés de la solution physiologique pour permettre un séchage partiel des tissus, le tissu nerveux étant régulièrement hydraté. Les nerfs des plexus sont sectionnés près de la colonne vertébrale et des cristaux de TRDA sont ensuite appliqués sur l'extrémité proximale des nerfs sectionnés. Après 3 à 4 minutes pour permettre la capture des cristaux, les spécimens sont épinglés face dorsale vers le haut dans un bain de solution physiologique oxygéné. Le bain est laissé à l'obscurité entre 4 à 6h selon l'âge du spécimen pour permettre le transport du traceur vers les corps cellulaires des motoneurones dans la moelle épinière. Les tissus nerveux sont ensuite isolés et traités pour l'immunohistochimie par fluorescence tel que décrit dans les sections précédentes.

2.5 Observation et microphotographies

Les lames sont analysées avec un microscope à fluorescence (Olympus) équipé de filtres spécifiques pour la FITC (fluorescence dans le vert, excitation 450-490nm, émission 520nm) et la Rhodamine (fluorescence dans le rouge, excitation 510-560nm, émission 590nm). Les photographies digitales sont obtenues à l'aide d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'images (Image-ProPlus 7.0, Media Cybernetics) et d'une caméra couleur (Qimaging) montée sur le microscope. Lorsque nécessaire, le contraste, la luminosité ainsi que le gamma ont été ajustés avec ImagePro. Les figures ont été réalisées sur un logiciel de dessin (CorelDraw v.12).

2.6 Quantification de la fluorescence obtenue pour KCC2 et NKCC1 à l'échelle des motoneurones

Afin de déterminer l'évolution de la distribution des deux cotransporteurs à l'échelle cellulaire, nous avons tenté de procéder à des mesures d'intensité normalisées (Image-ProPlus 7.0) pour le marquage obtenu à différents âges. Nous n'avons pas obtenu des

résultats concluants, ils ne font donc pas partie de ce compte-rendu. Il serait souhaitable à l'avenir d'avoir recours à l'imagerie confocale pour obtenir une précision supérieure à nos résultats obtenus par imagerie photonique simple.

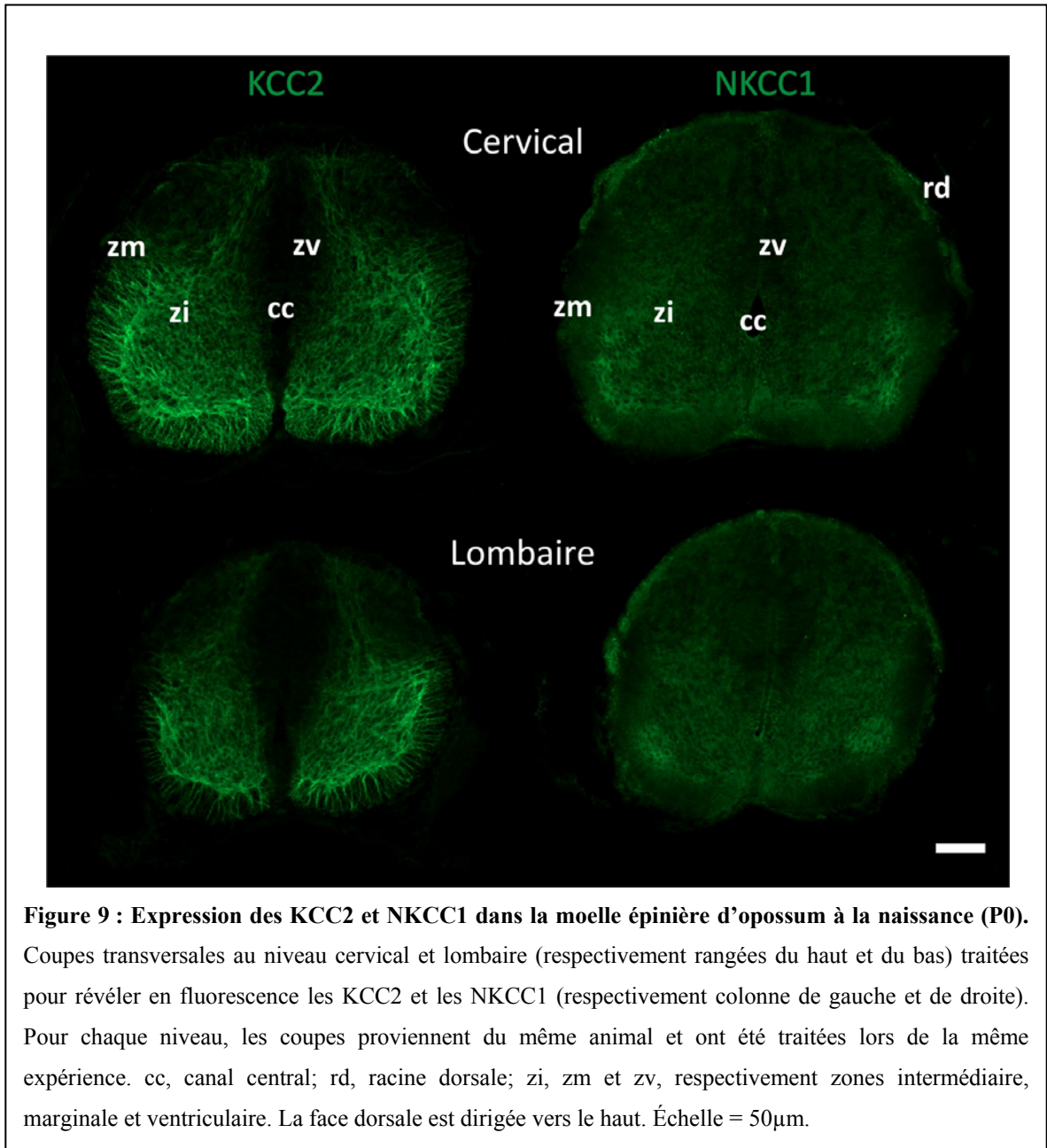
3. Résultats

Nous avons étudié par immunohistochimie la distribution des KCC2 et des NKCC1 dans les renflements cervical et lombaire de la moelle épinière chez l'opossum *Monodelphis domestica* postnatal, soit de P0 à l'âge adulte. Afin de déterminer l'expression de ces cotransporteurs par les motoneurons au cours du développement, nous avons combiné les expériences d'immunohistochimie au marquage préalable des neurones au TRDA.

3.1 Immunolocalisation des KCC2 et des NKCC1 dans la moelle épinière d'opossum au cours du développement et chez l'adulte

La présence de KCC2 et NKCC1 est observable dès la naissance (P0) dans les coupes cervicales et lombaires, en particulier dans les portions ventrales et intermédiaires de la moelle épinière (fig. 9). L'immunoréactivité pour KCC2 (KCC2-ir) est prédominante dans les zones intermédiaire et marginale (respectivement zi et zm; fig. 9 en haut à gauche) des régions ventrales ainsi que dans la portion médiane de la moelle dorsale. La zone ventriculaire (zv) montre une très faible KCC2-ir. KCC2 est absent de la portion latérale de la zi et de la zm. Là où elle est présente, la KCC2-ir découpe la moelle en un treillis de fibres, probablement des dendrites car KCC2 est spécifique aux neurones et n'est pas exprimé au niveau des axones (voir plus loin). Ces dendrites sont particulièrement nettes au niveau de la zm, ventralement et latéralement, et dans la portion médiane de la zi dorsale où elles sont alignées dorsoventralement. Au niveau de la zi ventrale et intermédiaire, il est plus difficile de distinguer les fibres individuellement car la KCC2-ir est plus importante,

probablement à cause de son expression au niveau des corps cellulaires. Nous reviendrons là-dessus dans la section 3.2.



En contraste avec la KCC2-ir, l'immunoréactivité pour NKCC1 (KCC1-ir) est plus diffuse, elle souligne moins les structures cellulaires. Elle est présente dans les zi et zm de la région ventrale (fig. 9, colonne de droite), ainsi que dans la zi de la région intermédiaire.

Au niveau de la zi en région ventrale, la NKCC1-ir est d'intensité maximale en portion latérale et ventrale, là où se situent les pools de motoneurones. On retrouve une NKCC1-ir assez forte dans la racine dorsale (rd sur fig. 9, en haut à droite). NKCC1 est aussi présente, mais moindrement exprimée, dans l'ensemble de la zv et dans la zi dorsalement. L'expression de NKCC1 est la plus faible dans la portion dorsale de la zm intermédiaire.

Une comparaison entre les patrons respectifs d'expression de KCC2 et NKCC1 entre les niveaux cervicaux et lombaires ne montre que des différences mineures malgré la différence notable de diamètre (fig. 9, rangées du haut et du bas). Les différences principales sont (1) KCC2 est légèrement plus exprimé dans la région dorsale au niveau cervical en comparaison au niveau lombaire (2) l'expression de NKCC1 est légèrement plus forte au niveau des pools de motoneurones au niveau cervical en comparaison au niveau lombaire. Cela suggère un léger retard dans l'expression de ces cotransporteurs au niveau lombaire qui néanmoins semble peu significatif. Aux environs de P10, il ne subsiste plus de différence appréciable entre les deux renflements quant aux patrons d'expression respectifs de ces cotransporteurs. Ainsi, comme l'expression des deux cotransporteurs est presque similaire aux âges étudiés, seuls les niveaux cervicaux seront décrits ultérieurement.

La figure 10 illustre le développement des patrons d'expression de KCC2 et NKCC1 à partir de coupes transversales de la moelle au niveau cervical entre P0 et l'âge adulte. Pour chaque âge, un photomontage est donné sur lequel la portion gauche de la coupe représente le patron de KCC2-ir alors que la portion droite représente la NKCC1-ir. Nous avons parlé précédemment des patrons d'expression à P0, nous n'y reviendrons donc pas; la coupe à P0 est présentée pour faciliter la comparaison avec les âges subséquents.

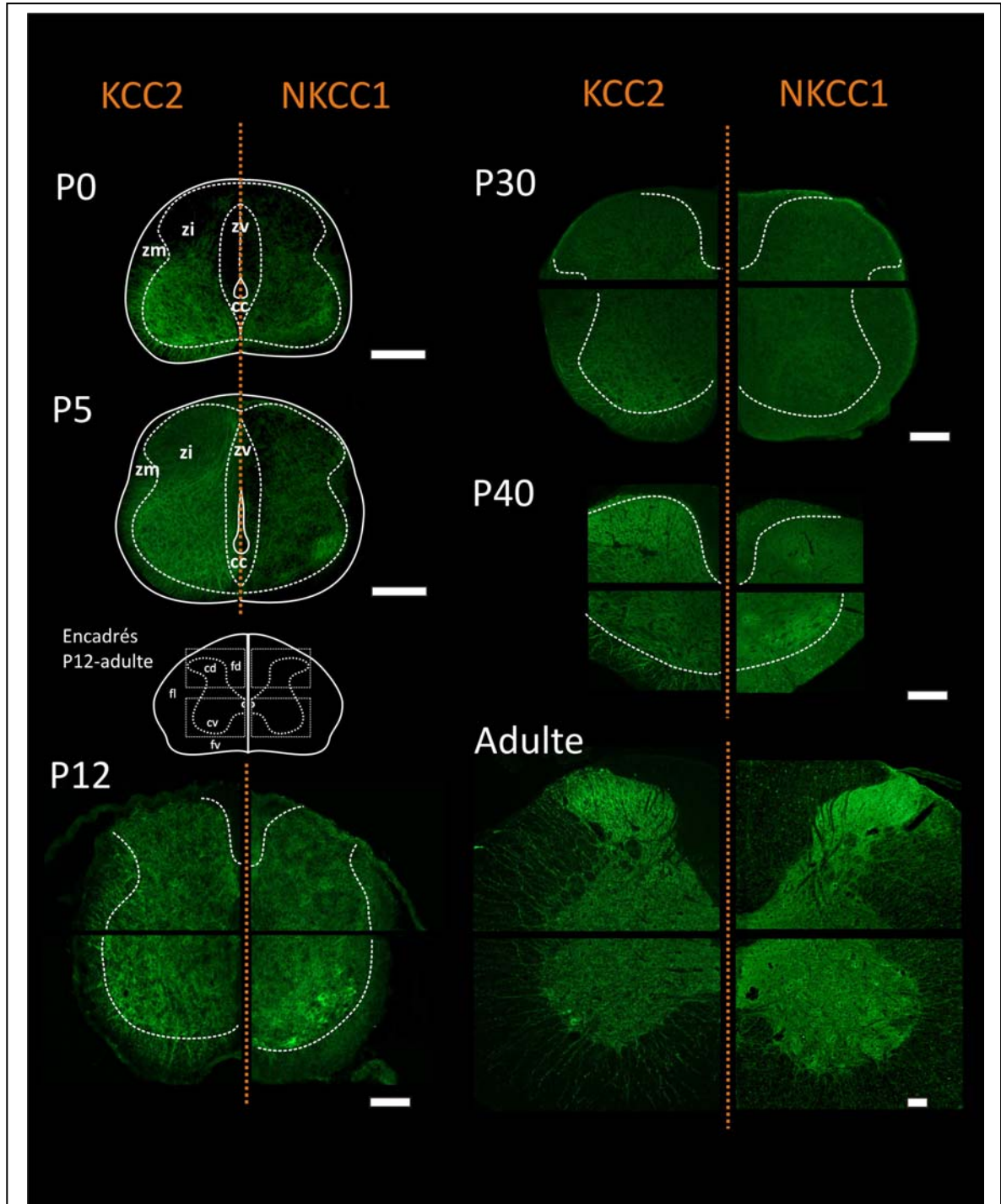


Figure 10 : Développement de l'immunoréactivité pour KCC2 et NKCC1 dans la moelle épinière de l'opossum entre P0 et l'âge adulte. Les pointillés blancs délimitent la matière grise et la matière blanche sur chaque coupe. Les encadrés sur le schéma de la moelle indiquent approximativement la localisation des microphotographies pour P12, P30, P40 et Adulte. cc, canal central ; cd, corne dorsale ; cv, corne ventrale ; fd, fl et fv, respectivement funicules dorsal, latéral et ventral ; zi, zm, zv, respectivement zones intermédiaire, marginale et ventriculaire. Échelle = 100 μ m.

Le marquage pour KCC2 et NKCC1 s'intensifie dans les jours qui suivent la naissance (fig. 10). La KCC2-ir augmente dans la moelle ventrale au niveau de la zi et de la zm et le treillis observé à P0 devient plus important à P5, en particulier à proximité de la zv (fig. 10, colonne de gauche). La portion dorsolatérale de la zm exprime maintenant KCC2 alors que ce cotransporteur était absent de cette région à P0. La KCC2-ir est encore fortement visible en portion médiane de la zi dorsale et semble légèrement présente dans la portion latérale. Il y a peu de KCC2-ir au niveau de la zm dorsale, on peut cependant y distinguer quelques fibres. Les cellules immunoréactives à NKCC1 sont distribuées de façon plus homogène : on les retrouve dans la zv, la zi et la zm au niveau ventral comme dorsal (fig. 10, colonne de droite). Les portions ventrale et latérale de la zm expriment toujours de façon plus importante NKCC1 par rapport à la portion dorsale. La zi ventrolatérale où se situent les pools de motoneurones exprime très fortement les NKCC1. On observe également une augmentation des cellules marquées au NKCC1 dans la région dorsale au niveau des zv, zi et zm.

Aux alentours de P12, quand la distinction entre matière grise et matière blanche devient évidente, KCC2 et NKCC1 sont exprimés à travers toute la moelle épinière, ventrale et dorsale (fig. 10). KCC2 est exprimé dans les cornes dorsales et ventrales de façon répartie (fig. 10, colonne de gauche). La matière blanche est entrecoupée de dendrites exprimant KCC2 qui rayonnent médiolatralement, au niveau des funicules ventral et latéral et de façon beaucoup moins importante au niveau du funicule dorsal. NKCC1 est exprimé de façon ubiquitaire dans la matière grise et la matière blanche par les neurones et les cellules gliales (fig. 10, colonne de droite). Le marquage pour NKCC1 dans la zone ventrale latérale, là où se situent les motoneurones, est d'intensité maximale tandis qu'au niveau de la matière grise intermédiaire et dorsale ainsi que la matière blanche, NKCC1 est d'intensité uniforme.

Vers P30, le marquage pour les deux cotransporteurs est retrouvé de façon homogène à travers la moelle épinière. La zone ventrale semble exprimer légèrement plus les KCC2 et NKCC1 que les zones intermédiaire et dorsale (fig. 10). Le patron d'expression mature (retrouvé chez l'adulte) des deux protéines semble être atteint entre P30 et P40 quand les

cellules exprimant KCC2 et NKCC1 deviennent plus abondantes dans les parties superficielles de la corne dorsale (fig. 10, en comparant P30-P40 à Adulte). Alors que les cellules gliales et les dendrites du funicule dorsal (fd) (dont les corps cellulaires se trouvent probablement dans la corne dorsale) expriment clairement NKCC1, ces structures n'expriment pas du tout KCC2 à P40 (figs. 11A1 et A2). En effet, dans le fd, seules quelques dendrites issues de la matière grise dorsale expriment KCC2, elles disparaissent aux âges ultérieurs. Au niveau de la corne ventrale, la localisation cellulaire de l'expression des deux cotransporteurs par les motoneurones semble plus claire qu'aux âges plus jeunes (fig. 11B1, B2, C1, C2). KCC2 semble être exprimé principalement au niveau des contours des motoneurones et dans une moindre mesure dans leur cytoplasme (fig. 11C1, plusieurs motoneurones sont situés entre les flèches). Pour NKCC1, il semble que le cytoplasme des motoneurones contient plus de NKCC1 que les contours cellulaires (fig. C2). Les figures 11B1, B2 montrent que KCC2 n'est pas exprimé au niveau de la racine ventrale contrairement à NKCC1 qu'on retrouve au niveau de cette structure, quel que soit l'âge étudié.

Après P40, l'expression des KCC2 comme des NKCC1 semble stable même si la moelle subit encore quelques changements morphologiques (fig. 10).

L'expression des deux cotransporteurs chez l'adulte a été étudiée en immunofluorescence (fig. 10, Adulte) et par précipitation du DAB, visible en champ clair (fig. 12). Les résultats obtenus avec les deux techniques sont similaires, nous décrivons les patrons d'expression des deux cotransporteurs à partir de la figure 12. La présence de KCC2 est détectable dans la matière grise et dans les cornes ventrale et dorsale, formant un treillis de dendrites et de cellules nerveuses fortement marquées (fig. 12A1-5). Le marquage pour KCC2 est particulièrement fort dans la partie superficielle de la corne dorsale (fig. 12A1, A2). NKCC1 est détecté dans toute la matière grise ventrale et dorsale où il est exprimé à la fois par les cellules et leurs projections dendritiques et axoniques (fig. 12B1-5). NKCC1 est aussi plus fortement exprimé par la corne dorsale superficielle (figs. 12B1, B2). Dans la matière blanche, les dendrites exprimant KCC2 retrouvées aussi aux âges plus jeunes sont nettement visibles dans les funicules ventral et latéral (figs. 12A3,

A4, une dendrite est indiquée par une flèche verte) mais sont absentes au niveau du funicule dorsal. Ces mêmes fibres n'expriment pas NKCC1 (figs. 12B3, B4). Les MN (identifiés grâce à leur taille et leur position) expriment à la fois KCC2 et NKCC1 (figs. 12A3-5 et B3-5, les motoneurones sont indiqués par les flèches oranges). À l'échelle cellulaire, le marquage pour KCC2 (fig. 12A5) colore le cytoplasme des MN et délimite fortement les contours cellulaires. NKCC1 est aussi retrouvé dans les somas des MN (fig. 12B5) et dans une moindre mesure autour des cellules.

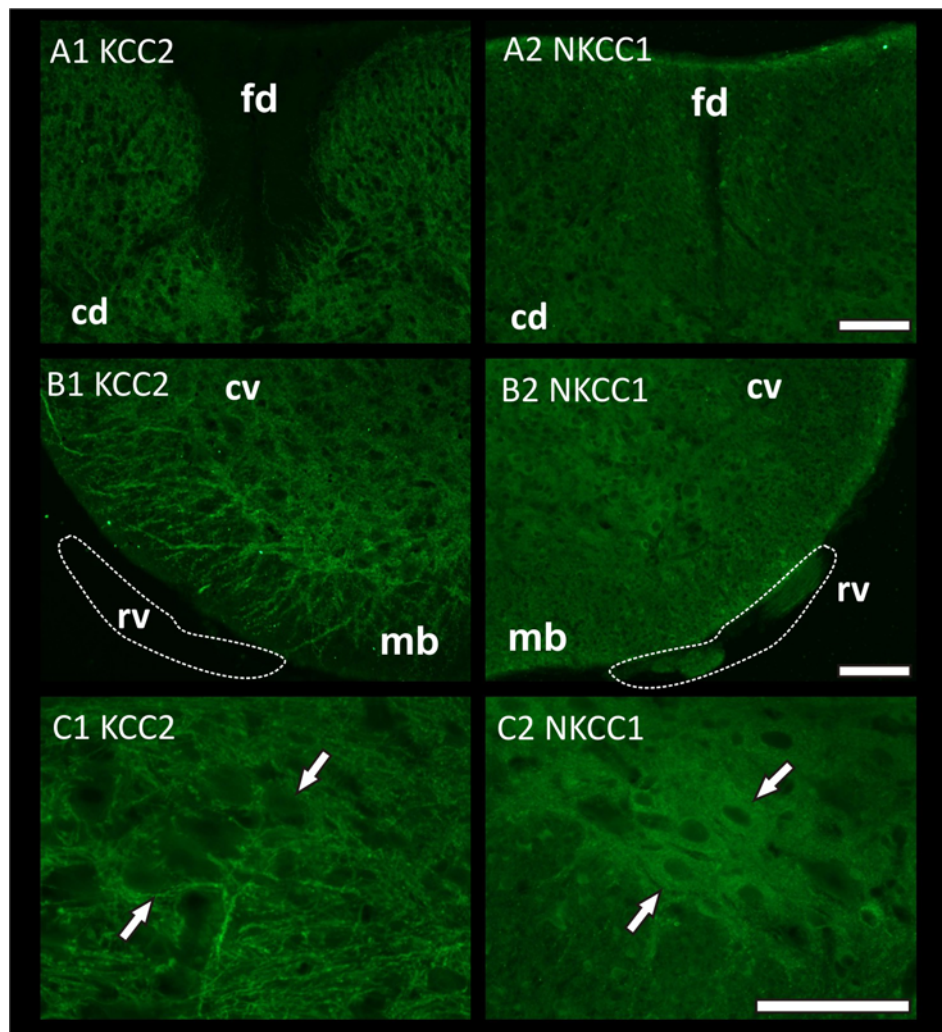
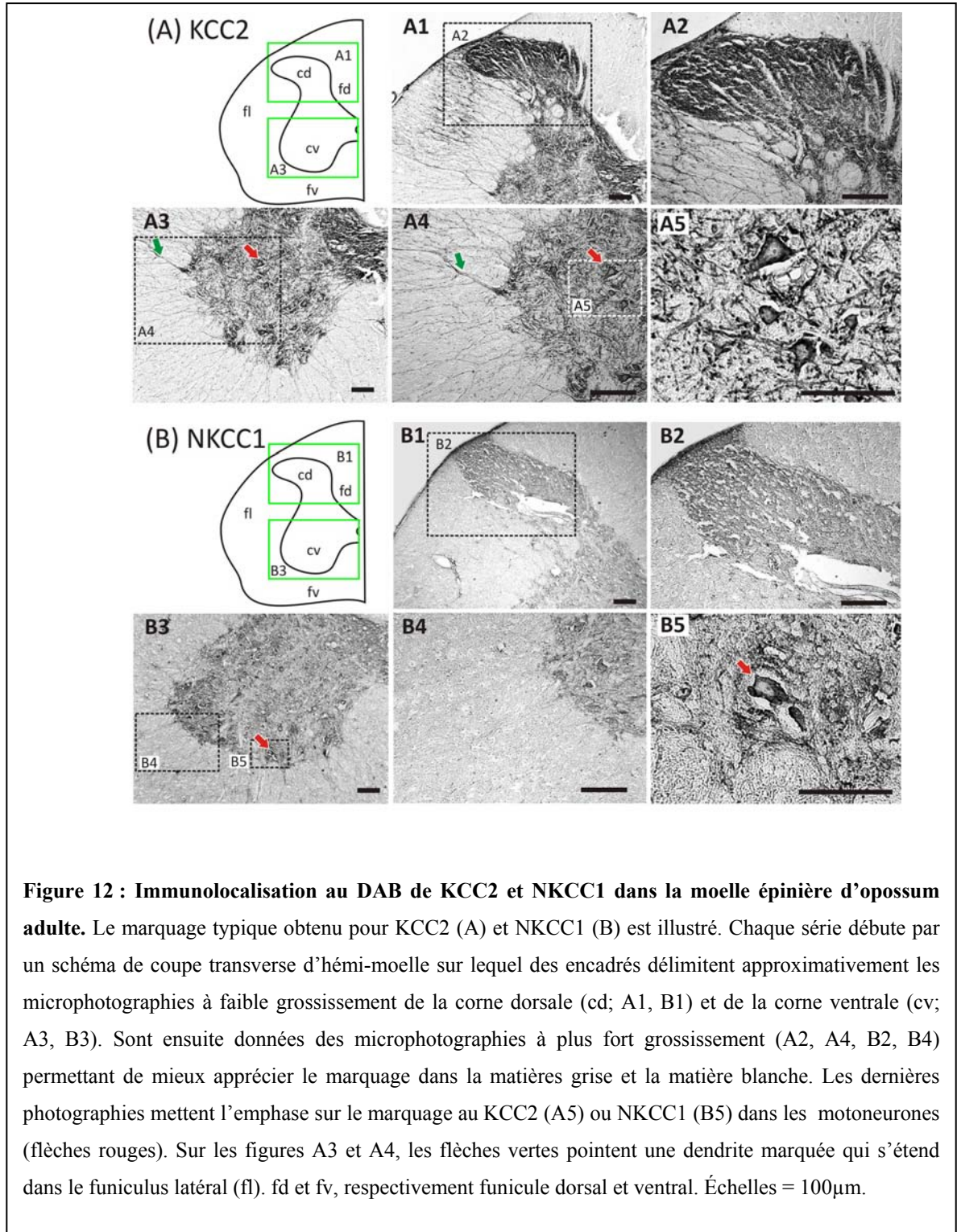


Figure 11 : KCC2- et NKCC1- ir dans la moelle épinière de l'opossum à P40. (A) : Dans la région dorso-médiane de la moelle KCC2 (A1) et NKCC1 (A2) sont exprimés dans la corne dorsale (cd). Par contre, seules quelques dendrites expriment KCC2 dans le funicule dorsal (fd) alors que NKCC1 est exprimé par des corps cellulaires et des prolongements. (B) : Dans la région ventrolatérale, KCC2 (B1) fortement plus exprimé que NKCC1 (B2) dans la corne ventrale (cv). KCC2-ir souligne des dendrites s'étendant médiolateralement dans la matière blanche (mb), mais aucune KCC2-ir n'est présente dans la racine ventrale (rv). Par revanche, NKCC1 marque des corps cellulaires et des fibres dans la matière blanche ainsi que dans la racine ventrale; (C) : Dans la région des pools de motoneurones, KCC2-ir délimite clairement les motoneurones présomptifs (entre les flèches sur C1) dans la cv alors que NKCC1-ir est plus exprimé dans dans les somas des motoneurones présomptifs (entre les flèches sur C2) que les membranes. Échelles = 100 μ m.



3.2 Traçage neuronal au TRDA

Dans le but de mieux apprécier les changements développementaux survenant spécifiquement dans l'expression de KCC2 et NKCC1 par les motoneurones, des expériences de traçage rétrograde des motoneurones ont été réalisées chez des animaux de P0 (n=4) et P12 (n=2). Des cristaux de TRDA ont été appliqués sur la portion proximale des nerfs au niveau du plexus brachial avant que les tissus ne soient traités pour révéler KCC2 ou NKCC1 (voir section 2.4). Des essais préliminaires n'ont pas permis de marquer correctement les motoneurones au niveau lombaire à P0 par application de TRDA au niveau du plexus lombaire, probablement à cause du faible développement des nerfs innervant les membres postérieurs à cet âge (Barthélemy et Cabana, 2005). Toutefois, le peu de différence entre les renflements quant aux patrons d'expression respectifs des deux cotransporteurs permet de penser que les résultats obtenus pour le renflement cervical s'appliquent au niveau lombaire.

Les figures 13A1 et B1 montrent le résultat d'une telle application de TRDA sur des coupes transversales au niveau cervical d'une moelle d'opossum nouveau-né. On peut déceler la présence de ce traceur dans les fibres au niveau du nerf périphérique (n sur la fig. 13A1), dans les somas des cellules sensorielles du ganglion spinal (g sur les figs. 13A1, B1), dans les fibres des racines ventrales et dorsales (respectivement rv et rd sur la figure 13B1), ainsi qu'au niveau des somas des motoneurones (flèches sur les figs. 13A1, B1). À cet âge, les motoneurones sont de petite taille et forment des pools très compacts (mn sur les figs. 13A1, B1). Les motoneurones marqués appartiennent le plus souvent à la colonne latérale (motoneurones qui innervent les membres) mais sur certaines coupes, des motoneurones de la colonne médiane (qui innervent le tronc) sont parfois marqués au TRDA (non illustré). Les arborisations dendritiques de ces neurones sont relativement bien développées (têtes de flèche évidées sur les figs. 13A1, B1) mais elles sont rarement bien remplies par le traceur, elles ressortent donc mal sur les microphotographies. Les axones des motoneurones peuvent parfois être identifiés, surtout dans la zm près de la sortie des racines ventrales (têtes de flèche pleines sur les figs. 13A1, B1).

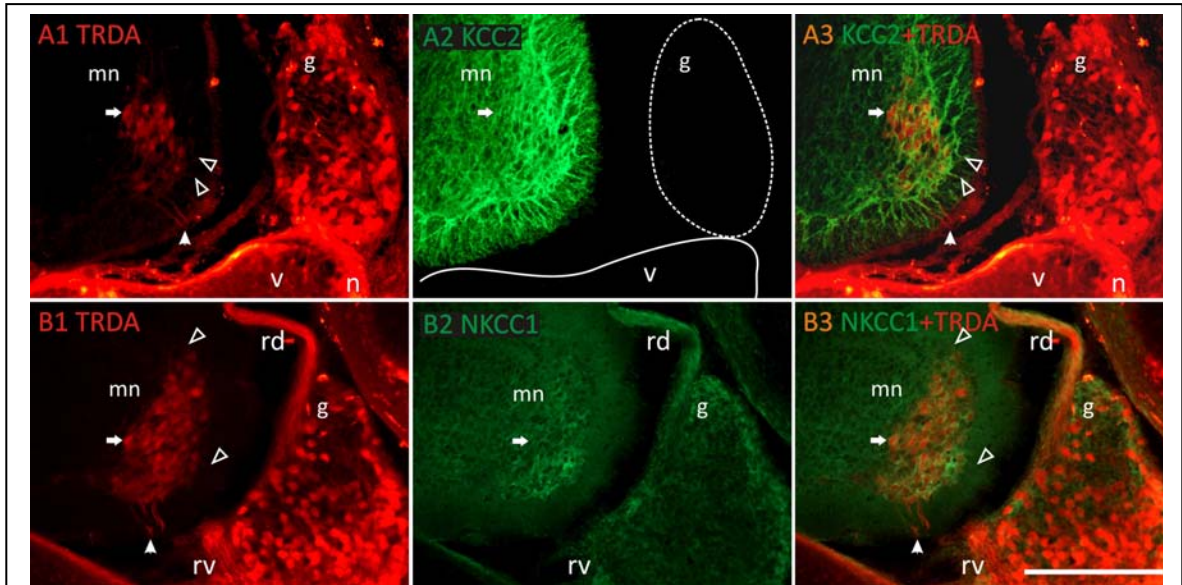


Figure 13 : Marquage au TRDA couplé à l'immunohistochimie des KCC2 et NKCC1 chez un opossum à P(0). Les microphotographies montrent des coupes transversales de moelle cervicale avec tissus associés après application de TRDA (en rouge) au niveau du plexus brachial, ce qui résulte en un marquage du nerf périphérique de ce segment (n) et des racines ventrales (rv) et dorsales (rd) associées, des pools de motoneurones (mn) et des cellules du ganglion sensoriel (g). La rangée du haut (A1-3) montre une coupe traitée au TRDA vue avec filtre laissant passer la lumière rouge (A1) et traitée pour révéler KCC2 (en vert) vue avec un filtre laissant passer la lumière verte (A2) puis la superposition des deux images (A3). Même principe pour la rangée du bas (B1-3), mais sur une coupe adjacente traitée pour révéler NKCC1 (en vert). Comme les cellules ganglionnaires n'expriment pas KCC2, un trait pointillé a été ajouté pour situer le ganglion en A2. Le trait plein délimite la vertèbre (v). Sur chaque série de photos, les flèches indiquent la position d'un motoneurone identifié afin de permettre une meilleure comparaison entre les images. Les têtes de flèches pleines en A2, A3 et B2, B3 pointent vers des axones de motoneurones marqués au TRDA, à la sortie de la racine ventrale. Les têtes de flèches évidées en A1, A3 et B1, B3 pointent vers des dendrites de motoneurones marqués au TRDA. Échelle = 100 μ m.

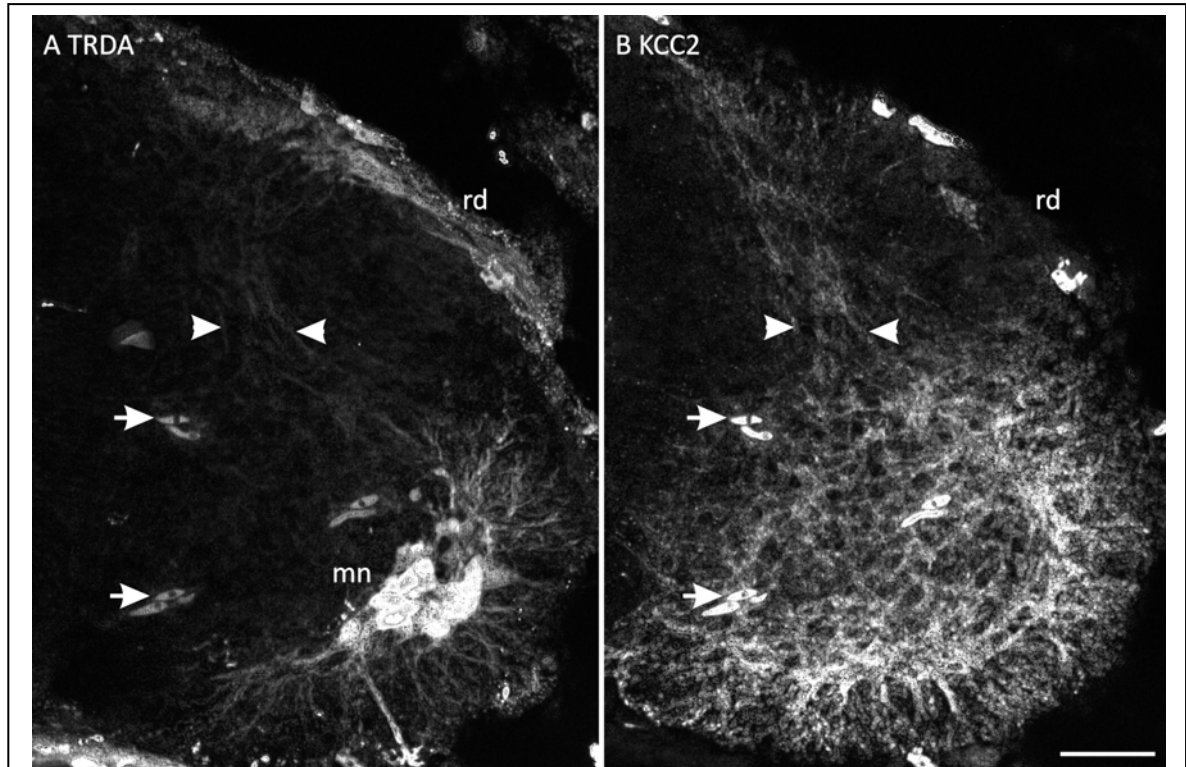


Figure 14 : Les afférences primaires segmentaires se superposent sur des neurites exprimant KCC2 chez les jeunes opossums. Coupe transversale d'hémi-moelle d'opossum à P0 après application de TRDA au niveau des nerfs et traitement pour révéler KCC2. Les microphotographies ont été prises avec un apotome (Zeiss). (A) Le marquage au TRDA met en évidence les motoneurons (mn), et des afférences primaires formant la racine dorsale (rd) ainsi qu'un faisceau dirigé dorsoventralement dans la portion médiane de la moelle dorsale (entre les têtes de flèches). (B) Les KCC2 sont fortement exprimés ventralement mais aussi par un faisceau de neurites dans la moelle dorsale, à un emplacement qui correspond à celui du faisceau d'afférences primaires (entre les têtes de flèches). Notez les fibres au bout des pointes des têtes de flèches, qui montrent du marquage pour le TRDA et de la KCC2-ir. Notez l'absence de KCC2-ir au niveau de la racine dorsale en B. Les flèches pointent des vaisseaux sanguins. Échelle = 30 μ m.

Lorsque l'application de TRDA est combinée avec un traitement pour révéler KCC2 (figs. 13A2, A3), il apparaît clairement que cette protéine est spécifiquement exprimée au niveau de la moelle épinière. En effet, aucune KCC2-ir n'est visible au niveau du ganglion (g sur les figures 13A2, A3), des racines ventrale et dorsale, et du nerf (n sur les figs. 13A2,3). À l'inverse, une forte KCC2-ir est visible dans la portion ventrale de la moelle, au

niveau des pools de motoneurones (mn sur les figs. 13A2, A3). Cette KCC2-ir correspond à ce qui a été précédemment décrit pour P0, elle forme une sorte de treillis assez marqué et assez dense autour des motoneurones (flèches sur figs. 13A1, A3). Malgré l'intensité de l'immunoréactivité et le faible remplissage des dendrites par le TRDA, il est possible d'observer parfois une superposition entre la KCC2-ir et ces dernières (têtes de flèches évidées sur les figs. 13A1-3). Les axones identifiables ne montrent pas une telle relation avec la KCC2-ir.

Au niveau dorsal de la moelle épinière, il est possible de suivre les afférences primaires segmentaires sur une courte distance après qu'elles aient quitté la racine dorsale (rd sur la fig. 14A). À leur entrée dans la moelle, celle-ci se positionnent latéralement à la zv, en un faisceau médian orienté selon l'axe dorso-ventral (entre les têtes de flèches sur la fig. 14A) mais elles ne s'arborescent pas dans la région dorsale superficielle de la zi à cet âge (P0). Au niveau intermédiaire de la moelle, elles bifurquent latéralement pour aller rejoindre les dendrites dorsolatérales des pools de motoneurones (mn sur fig. 14A). Un point notable concernant le trajet des afférences primaires dans la portion dorsale de la moelle est que le faisceau médian qu'elles forment se superpose au faisceau médian des neurites exprimant KCC2 visible à cet endroit (entre les têtes de flèches sur la fig. 14B). Des fibres montrant du marquage au TRDA et de la KCC2-ir sont parfois observées (pointes des têtes de flèches sur les figs. 14A, B). Comme les afférences primaires n'expriment pas KCC2 (noter l'absence de marquage dans la racine dorsale sur la fig. 14A ou dans le ganglion spinal sur la fig. 13A2), il peut être exclu qu'il s'agisse des mêmes fibres. Les fibres exprimant KCC2 sont probablement des dendrites (les axones n'expriment pas KCC2) mais les cellules auxquelles ces dendrites appartiennent ne peuvent être localisées avec certitude sur ces coupes. Ce ne sont probablement pas des dendrites de motoneurones car celles-ci demeurent ventrales (voir fig. 14A). Cette relation entre afférences primaires et neurites KCC2-ir a été aussi observée à P5. Toutefois, avec le développement de la KCC2-ir dorsalement au cours du développement, il est difficile de faire la même observation chez des animaux plus âgés.

L'application de TRDA combinée avec un traitement pour révéler NKCC1 (figs. 13B2, B3) montre une situation différente à plusieurs niveaux. Premièrement, la NKCC1-ir est visible dans le nerf, dans les racines ventrale et dorsale (respectivement rv et rd sur les figs. 13B2, B3) ainsi qu'au niveau du ganglion spinal (g sur figs. 13B2, B3), où elle se superpose parfois sur le soma des cellules ganglionnaires. Tel que décrit précédemment, le patron d'expression de NKCC1 est plus diffus que celui de KCC2 au niveau des pools de motoneurones (mn sur les figs. 13B2, B3). Néanmoins, la NKCC1-ir est assez forte et semble plutôt restreinte au niveau des corps cellulaires des motoneurones (flèche sur figs. 13B2, B3). Quand ils sont identifiables individuellement, les dendrites et axones des motoneurones, tout comme les afférences primaires, ne montrent pas de relation particulière avec la NKCC1-ir.

Le traçage rétrograde des motoneurones permet de mettre en évidence une variation dans l'expression de KCC2 et NKCC1 par ces cellules. À P0, les pools de motoneurones sont assez compacts et autant la KCC2-ir que la NKCC1-ir est assez fortement exprimée autour des motoneurones (figs. 15A, B). À P12, l'expression des KCC2 demeure assez forte autour des motoneurones (fig. 15 C) alors que la NKCC1-ir devient moins présente et semble plus internalisée dans les cellules (fig. 15D). Ceci est à mettre en relation avec le patron d'expression respectif de chaque cotransporteur dans la moelle mature, avec une expression principalement périphérique pour les KCC2 et cytoplasmique pour les NKCC1. Avec les moyens techniques dont nous disposons, il s'est révélé impossible de déterminer la localisation exacte des deux cotransporteurs (membranaire ou extramembranaire).

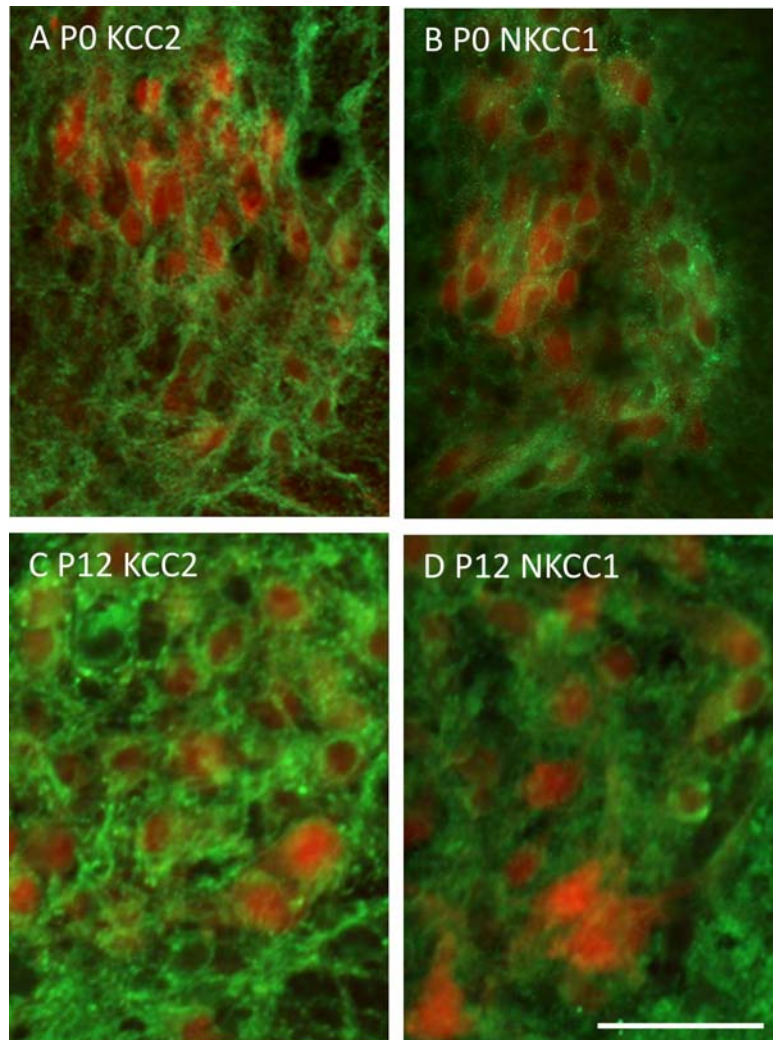


Figure 15 : Expression des cotransporteurs KCC2 et NKCC1 au niveau des motoneurones identifiés par traçage rétrograde au TRDA. Les photomicrographies montrent des pools de motoneurones marqués au TRDA (en rouge) sur des coupes transverses de moelle épinière cervicale d’opossum à P0 (A, B) et P12 (C, D). Les coupes ont été traitées pour révéler en vert les KCC2 (A, C) ou les NKCC1 (B, D). Echelle = 50µm.

4. Discussion et conclusion générale

Les résultats de l'étude présente montrent que la maturation de l'expression de KCC2 et de NKCC1 dans les renflements de la moelle épinière de l'opossum suit des gradients ventrodorsal et médiolatéral. Un léger gradient rostrocaudal est aussi observé. Dès la naissance, KCC2 et NKCC1 sont fortement exprimés dans les régions ventrale et intermédiaire de la moelle épinière mais peu au niveau dorsal. Avec l'âge, ces deux cotransporteurs deviennent fortement exprimés dans la portion superficielle de la corne dorsale. Les patrons d'expression matures sont atteints entre P30 et P40. KCC2 est exprimé au niveau des corps cellulaires et dendrites des neurones centraux. On observe également des dendrites exprimant KCC2 s'insérant dans la matière blanche. KCC2 n'est pas observé dans les racines ni dans le ganglion spinal. NKCC1 a une expression plus répartie et semble principalement exprimé au niveau des corps cellulaires des neurones mais aussi de cellules gliales. Enfin, on retrouve NKCC1 au niveau des racines et ganglions spinaux. À l'échelle des motoneurones, KCC2 et NKCC1 semblent localisés au contour des cellules à la naissance mais avec l'âge, alors que KCC2 conserve une localisation essentiellement péricellulaire retrouvée chez l'adulte, NKCC1 semble se relocaliser dans le cytoplasme. Aux jeunes âges postnataux (P0-P5), le marquage des KCC2 suit de près le trajet emprunté par les afférences primaires qui pénètrent la moelle épinière.

Ontogénie des KCC2 et NKCC1 dans la moelle épinière de l'opossum et développement de l'inhibition

KCC2 et NKCC1 sont clairement exprimés dans la moelle épinière ventrale dès la naissance ce qui indique que ces deux cotransporteurs ont commencé leur maturation avant la naissance chez l'opossum. Ces deux cotransporteurs sont exprimés en périphérie des neurones, ce qui suggère une insertion dans la membrane des neurones, indice de leur fonctionnalité potentielle. Ces observations suggèrent que l'inhibition pourrait déjà être mise en place au niveau de la ceinture pectorale et que KCC2 serait fonctionnel.

L'expression plus forte de NKCC1 dans la région dorsale de la moelle suggère que la maturation de NKCC1 est légèrement plus avancée que celle des KCC2. En revanche, l'expression importante de KCC2 dès la naissance permet de penser qu'il contrebalance partiellement l'effet de NKCC1, ce qui contribuerait à abaisser la $[Cl^-]_i$ de manière favorable à l'inhibition tel qu'observé chez les rongeurs (souris : Delpy *et al.*, 2008; rat : Stil *et al.*, 2009). Durant une vingtaine de jours après la naissance, KCC2 et NKCC1 sont de plus en plus exprimés et leur expression suit un gradient ventrodorsal et médiolatéral. La région des pools de motoneurones et des interneurones présomptifs des CPG exprime KCC2 de façon plus importante qu'à la naissance. De plus, à l'échelle cellulaire, il semble que KCC2 conserve une expression principalement périphérique, probablement en association avec la membrane des neurones, alors que NKCC1 développe une expression plutôt cytoplasmique. NKCC1 semble donc être internalisé au cours du développement, indice de sa perte de fonctionnalité, tandis que KCC2 resterait exprimé aux membranes pour devenir le cotransporteur prédominant aux âges postnataux, permettant ainsi la maturation de l'inhibition. Cette relocalisation de NKCC1 ainsi que la persistance de KCC2 au niveau membranaire des motoneurones ont également été observés chez la souris (Delpy *et al.*, 2008). La localisation préférentielle de KCC2 au niveau de la membrane des motoneurones chez l'opossum et les rongeurs est en accord avec le fait qu'un cotransporteur, pour être fonctionnel dans sa fonction de transport, doit être inséré dans la membrane plasmique (Zhang *et al.*, 2006). De nombreuses études identifient KCC2 comme principal acteur dans la baisse de concentration intracellulaire en ions chlorure dans différents systèmes matures (revus dans Ben-Ari, 2001 et Blaesse *et al.*, 2009). Ceci devrait être valable pour la moelle épinière bien qu'une perte de fonctionnalité des NKCC1 couplée à cette augmentation de KCC2 comme le suggèrent Delpy *et al.* (2008) ne soit pas exclue comme cause de passage vers des réponses inhibitrices. Toutefois, les moyens techniques employés pour la présente étude ne nous permettent pas de conclure quant à la localisation exacte et la fonctionnalité de ces cotransporteurs sur la base de nos résultats. Des études plus approfondies, utilisant la microscopie confocale (ou électronique) et l'électrophysiologie sont nécessaires.

Le développement au moins partiel de l'inhibition, suggéré par la forte expression de KCC2 dans les régions ventrale et intermédiaire dans la moelle cervicale à la naissance (où se trouvent les motoneurones mais aussi les interneurones présomptifs du CPG), pourrait expliquer que le nouveau-né soit capable d'effectuer des mouvements alternés des membres antérieurs (Pflieger *et al.*, 1996). En effet, le développement de l'inhibition est crucial pour l'apparition et la maturation de l'alternance entre membres d'une même ceinture et entre muscles antagonistes au sein d'une même articulation durant la locomotion (Jean-Xavier *et al.*, 2006). Étant donné le peu de retard dans la maturation entre les segments cervicaux et lombaires, le développement de l'inhibition commencerait sensiblement aux mêmes âges au niveau lombaire mais cela peut difficilement être mis en évidence sur le plan comportemental à cause de l'immaturité anatomique des membres postérieurs. En revanche, lorsque les membres postérieurs ont atteint une maturité suffisante pour se mouvoir (entre P15 et P20), ils démontrent déjà une alternance (Pflieger *et al.*, 1996). Le patron mature d'expression de KCC2 et NKCC1 dans les renflements spinaux de l'opossum est atteint entre P30 et P40, ce qui correspond à un âge où l'opossum démontre une locomotion pratiquement mature (Pflieger *et al.*, 1996). Il est peu probable que l'activité spontanée soit responsable de l'alternance des membres observée à la naissance : le nombre de cellules actives est trop faible pour générer des mouvements aussi importants (Lavallée et Pflieger, 2009). L'inhibition précoce par *shunt* à la naissance de l'opossum n'est pas exclue ; chez le rat, celle-ci est observée durant la première semaine postnatale à une période où les KCC2 ne sont pas assez exprimés pour permettre une inhibition hyperpolarisante (Jean-Xavier *et al.*, 2007). Néanmoins, les résultats de la présente étude ne peuvent pas apporter de réponses précises à cette hypothèse : il est nécessaire d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques cellulaires. Enfin, il est possible que le passage vers l'inhibition hyperpolarisante par l'action des KCC2 soit accéléré par l'inactivation très rapide des NKCC1 comme le montre Delpy *et al.* (2008) chez la souris, où une chute brusque de E_{Cl} est observée entre E15.5 et E16.5, alors que l'expression des deux cotransporteurs est concomitante. Cette inactivation pourrait se produire juste avant la naissance chez l'opossum.

Il existe un gradient rostrocaudal très léger dans la maturation des patrons d'expression de KCC2 et NKCC1 lorsque l'on examine qualitativement les segments cervicaux par rapport aux segments lombaires chez l'opossum dès la naissance. Si l'expression des KCC2 et des NKCC1 semble légèrement plus importante ventralement au niveau des segments cervicaux par rapport aux segments lombaires, ces différences s'estompent très rapidement dans les jours qui suivent la naissance, la différence ne réside pas tant dans le patron d'expression mais plutôt dans la différence de taille de la moelle épinière et donc du nombre de cellules observée entre les segments cervicaux et lombaires. Ces différences mineures sont surprenantes lorsque l'on considère l'importance d'autres gradients de maturation rostrocaudaux précédemment observés dans la moelle épinière de l'opossum, en termes de maturation musculo-squelettique (Martin et McKay, 2003; Barthélemy et Cabana, 2005), de formation des pools de motoneurones (Champagne *et al.*, 2008), de synaptogenèse et de myélinogenèse (Gingras et Cabana, 1999; Leblond et Cabana, 1997; Lamoureux *et al.*, 2005). Le retard des segments lombaires sur les segments cervicaux varie entre 3 et 7 jours pour ces phénomènes. Une quantification stricte de l'expression des KCC2 et des NKCC1 devrait être effectuée afin de définir avec précision l'importance du gradient rostrocaudal les concernant.

Comparaisons interspécifiques dans le développement des patrons d'expression des KCC2 et NKCC1

Les gradients développementaux ventrodorsal et médiolatéral de KCC2 et NKCC1 au niveau de la moelle épinière sont similaires chez les opossums, les rats et les souris. En effet, KCC2 apparaît en premier au niveau de la moelle ventrale, dans la matière grise présomptive, dès E11.5-12.5 chez les rats (Li *et al.*, 2002) et chez les souris (Hübner *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2004; Stil *et al.*, 2009). Chez les souris âgées d'E11.5, aucun marquage pour KCC2 n'est détecté dans la zone dorsale de la moelle épinière ni dans la zone marginale (Stil *et al.*, 2008). L'expression de KCC2 suit ensuite des gradients ventrodorsal et médiolatéral. Chez l'opossum nouveau-né, des fibres rayonnant dans la matière blanche présomptive ainsi qu'un regroupement de fibres exprimant KCC2

retrouvée dans la moelle dorsale sont clairement visibles. Ces fibres sont très probablement des dendrites comme KCC2 ne semble pas être exprimé au niveau des axones (Hübner *et al.*, 2001b; Szabadics *et al.*, 2006). Les dendrites retrouvées dans la matière blanche présomptives apparaissent à E13.5 chez la souris (Hübner *et al.*, 2001b; Szabadics *et al.*, 2006) et probablement avant E17 chez les rats (pas de données disponibles avant E17, Stil *et al.*, 2008). Chez les souris âgées de E14.5, la moelle épinière dans sa totalité est marquée par KCC2 (Delpy *et al.*, 2008). Ce stade est atteint chez les opossums âgés de P10. Le marquage pour KCC2 s'intensifie dans la moelle épinière de l'opossum après P10, en particulier dans la partie superficielle de la corne dorsale. NKCC1 est détecté aussi tôt que E11.5 dans la moelle épinière de souris (Delpy *et al.*, 2008) et son expression suit un gradient ventrodorsal pour envahir totalement la moelle épinière à partir de E14.5. Chez l'opossum, ce stade semble être atteint entre P0 et P5. Si les périodes de développement du système nerveux sont comparables entre les rongeurs et l'opossum, il est légitime de penser que KCC2 et NKCC1 ont commencé à être exprimés avant la naissance chez l'opossum. Le patron d'expression mature de KCC2 et NKCC1 apparaît après quelques jours chez le rat et la souris aux alentours de la naissance alors que le développement de l'expression de KCC2 et NKCC1 est plus longue chez l'opossum où le patron d'expression mature apparaît environ 5 semaines après la naissance.

L'opossum *M. domestica* naît dans un état très immature, après 14-15 jours de gestation (Fadem *et al.*, 1982). À la naissance, l'état général de maturation de son système nerveux correspond approximativement à celui d'un rat âgé de E13-14 ou celui d'une souris âgée de E12-13 (discuté dans Smith, 2006; Lavallée et Pflieger, 2009). Toutefois, le degré d'expression des cotransporteurs, particulièrement celui de KCC2, chez l'opossum nouveau-né semble légèrement plus avancé que pour un embryon de rongeur d'âge comparable. Par ailleurs, des études d'induction de la locomotion fictive (*i.e.*, sans contraction musculaire) sur des préparations *in vitro* de moelle épinière d'embryons de souris et de rat ont montré que l'alternance entre les deux côtés de la moelle lombaire apparaît aux environs de E18.5 (Nishimaru et Kudo, 2000; Branchereau *et al.* 2000). Le développement de l'alternance au niveau cervical n'est pas connu mais même en supposant

une maturation plus précoce d'un ou deux jours, cela suggère que l'inhibition s'installe plus précocement chez l'opossum. Il est possible qu'un développement plus précoce des KCC2 dans la moelle d'opossum soit une adaptation aux besoins fonctionnels engendrés par la naissance précoce de ce marsupial, chez qui les mouvements des membres antérieurs pour parvenir à la tétine sont une question de survie.

Relation entre les afférences primaires et des dendrites exprimant KCC2

Un résultat inattendu de notre étude est la relation spatiale entre les neurites exprimant KCC2 et les afférences sensorielles primaires tracées au TRDA dans la région médiane de la moelle dorsale chez l'opossum nouveau-né. Des neurites exprimant KCC2 mais non identifiables de façon précise se superposent au trajet emprunté par les afférences primaires qui pénètrent dorsalement la moelle épinière en direction des parties ventrales de la moelle. Ceci est observé à partir de la naissance jusqu'aux environs de P5 mais pas à des âges plus avancés lorsque le marquage à KCC2 se développe fortement dans les régions dorsales et lorsqu'il devient alors plus difficile d'identifier les afférences primaires. Les dendrites exprimant KCC2 n'appartiennent pas aux afférences primaires car KCC2 n'est pas retrouvé au niveau des cellules ganglionnaires et des racines dorsales. Nous n'avons pas réussi à localiser avec certitude les cellules dont sont issues ces dendrites. Il est peu probable que ces fibres soient des dendrites de motoneurons innervant les membres car ces derniers s'arborescent de manière prédominante dans le tiers ventrolatéral de la moelle ventrale à ces jeunes âges (voir Knott *et al.*, 1999; Barthélemy et Cabana, 2005). D'autres études sont nécessaires pour identifier précisément les cellules à l'origine de ces dendrites. Il demeure que cette relation spatiale suggère une interaction entre ces dendrites exprimant KCC2 et les afférences primaires. Le cadre le plus probable d'éventuelles interactions serait la croissance neuritique : les dendrites serviraient alors de support pour la croissance des afférences primaires ou vice-versa. Il est peu probable que KCC2 joue un rôle direct dans la croissance axonique et son expression est plus probablement une manifestation de l'état de maturation plus avancé des cellules à l'origine des dendrites. Toutefois, KCC2 a été identifié comme un des promoteurs de la croissance des épines dendritiques dans les

cellules en culture de cortex de souris (Li *et al.*, 2007). Ce rôle est indépendant de son rôle de cotransporteur (Li *et al.*, 2007, Horn *et al.*, 2010), il est lié à une interaction avec une protéine du cytosquelette. Une autre hypothèse spéculative sur la superposition des afférences primaires aux dendrites exprimant KCC2 est que ces afférences sensorielles auraient un rôle régulateur sur l'expression des KCC2, permettant ainsi l'établissement des circuits sensori-moteurs.

Perspectives

Il semble que l'inhibition soit mise en place avant la naissance chez l'opossum *Monodelphis domestica* d'après les observations faites des nouveau-nés qui démontrent des mouvements rythmiques et alternés des membres antérieurs d'une part, et d'autre part, d'après la forte expression de KCC2 dans les renflements de la moelle épinière dès la naissance. Les patrons d'expression de KCC2 et NKCC1 chez l'opossum sont similaires à ceux retrouvés chez le rat et la souris en terme de gradients ventrodorsal et médiolatéral. La maturation de ces patrons est cependant plus longue chez l'opossum : elle s'étend jusqu'à la 5^{ème} semaine postnatale.

L'étude présente pose les bases immunohistochimiques de la caractérisation de l'apparition de l'inhibition nerveuse chez l'opossum. Des expériences électrophysiologiques pour tester la fonctionnalité des KCC2 et NKCC1 sont nécessaires afin de compléter le portrait que l'on a actuellement du patron de développement de ces deux cotransporteurs cation-chlorure. Un autre résultat important de cette étude dans le cadre du développement des réflexes sensorimoteurs spinaux est l'existence d'une relation spatiale entre les afférences primaires et les dendrites exprimant KCC2. Il serait intéressant de déterminer les cellules auxquelles appartiennent les dendrites exprimant KCC2 et de tester sur des préparations *in situ* l'influence de stimulations sensorielles sur l'expression des KCC2. Pour identifier ces cellules, des marqueurs immunohistochimiques des différents groupes d'interneurones spinaux pourraient être employés sur des coupes de moelle épinière aux jeunes âges. Pour tester l'influence du *feedback* sensoriel sur

l'expression des KCC2, des préparations *in situ* de moelle épinière avec queue attachée d'opossums nouveau-nés maintenues dans un bain de liquide physiologique oxygéné pourraient être utilisées.

Ces préparations montrent des mouvements de la queue qui ne peuvent être attribués qu'à une activité spontanée intrinsèque des motoneurons spinaux innervant la musculature caudale (Pflieger, communication personnelle). De plus, ces préparations peuvent être maintenues fonctionnelles pendant plusieurs jours *in vitro*. Les mouvements de la queue doivent résulter en une stimulation des récepteurs périphériques entraînant un *feedback* sensoriel vers la moelle. Il serait possible d'utiliser des préparations dont la queue serait laissée libre de bouger pendant quelques jours à celles dont la queue serait immobilisée par un moyen mécanique (tube de plastique) pendant la même période de temps. Une comparaison de la distribution des KCC2, étudiée par immunohistochimie, et celle des afférences primaires, révélée par application de traceurs neuroanatomiques à la base de la queue, dans chaque type de préparations permettrait d'évaluer si l'absence de *feedback* sensoriel induit des changements notables dans ces distributions. Ces expériences pourraient ensuite être reproduites en présence d'inhibiteurs des KCC2 (bumétanide, furosémide, DIOA) afin de voir si cela a un impact plus important sur la distribution des afférences primaires. Il subsiste néanmoins un certain nombre d'inconnues dans ce type d'expérience : il est en effet difficile de savoir si l'activité spontanée est suffisante pour générer un nombre et une force suffisante des mouvements de la queue pour mimer l'influence sensorielle, ces mouvements sont difficilement mesurables avec précision; il est ensuite possible que l'immobilisation de la queue ait une influence sensorielle plus forte que la queue laissée libre selon le montage, enfin, il est possible que le marquage rétrograde ne soit pas assez efficace pour pouvoir distinguer avec précision une différence dans la distribution des afférences primaires. Malgré cela, ces expériences devraient nous apporter des éclaircissements sur le développement et l'importance des KCC2 dans l'établissement de l'inhibition nerveuse et des réseaux sensori-moteurs.

5. Bibliographie

Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguiló A, Martínez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibañez CF, Soriano E (2003) BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130(7):1267-80

Bachmann O, Wuchner K, Rossmann H, Leipsiger J, Osikowska B, Colledge WH et al. (2003) Expression and regulation of the N-K-2Cl cotransporter NKCC1 in the normal and CFTR-deficient murine colon. *J Physiol* 549: 525-36

Balakrishnan V, Becker M, Lorhrke S, Nothwang HG, Guresis E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23(10):4134-45.

Barthélemy D et Cabana T (2005) Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Brain Res Dev* 115(2): 87-98

Beato M et Nistri A (1999) Interaction between disinhibited bursting and fictive locomotor patterns in the rat isolated spinal cord. *J Neurophysiol* 82(5):2029-38

Becker M, Nothwang HG, Friauf E (2003) Differential expression pattern of chloride transporters NCC, NKCC2, KCC1, KCC3, KCC4, and AE3 in the developing rat auditory brainstem. *Cell Tissue Res* 312(2):155-65

Ben Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24: 353-46

Ben Ari (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728-39

- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20(11):523-9
- Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 24:47-53
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61(6):820-38
- Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26(41):10407-19
- Blumberg MS, Freeman JF, Robinson SR (2009) *Oxford Handbook of Developmental Behavioral Neuroscience: Epigenetics, Evolution and Behavior*. Oxford University Press, 784 pages.
- Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeiffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Völkl H, Hübner CA, Jentsch TJ (2003) Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 22(20):5422-34
- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC (2004) Activity-dependant homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429: 523-30
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nature Med* 16(3):302-7

- Branchereau P, Morin D, Bonnot A, Ballion B, Chapron J, Viala D (2000) Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res Bull* 53(5):711-8.
- Cabana T (2000) The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53(5): 615-26
- Caron L, Rousseau F, Gagnon E, Isenring P (2000) Cloning and functional characterization of a cation-Cl-cotransporter-interacting protein. *J Biol Chem* 275: 32027-36
- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T (1994) The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Beha Evol* 43(4-5):244-53
- Cassidy G et Cabana T (1993) The development of the long propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*, *Dev Brain Res* 72(2):291-9
- Cazalets JR, Bertrand S, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1998) GABAergic control of spinal locomotor networks in the neonatal rat. *Ann NY Acad Sci* 860: 168-80
- Champagne S, Petrou A, Lamoureux S, Cabana T (2008) The development of the motoneuronal columns related to different muscle compartments of the limbs in opossums *Monodelphis domestica*. *Neurosci Abst* 29.20
- Chien CB (2005) Guidance of axons and dendrites. In *Developmental Neurobiology* 4th edition, eds. Rao MS and Jacobson M. Kluwers Academic/Plenum Publishers, New York.
- Clayton GH, Owens GC, Wolff JS, Smith RL (1998) Ontogeny of cation-Cl-cotransporter expression in rat neocortex. *Developmental Brain Research* 109:281-292
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, DeKoninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070):1018-21

Darman RB, Forbush B (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem* 277(40):37542-50.

Delpire E et Mount DB (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64: 803-43

Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P (2008) NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586(4):1059-75

Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11(11):1205-13.

Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand AR, Flagella M, Shull GE, Melvin JE (2000) Severe impairment of salivation in Na-K-Cl cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem* 275: 26720-26

Fadem BH, Kraus DB, Sheffet RH (1986) Nest-building in gray short-tailed opossums: temperature effects and sex differences. *Physiol Behav* 36(4):667-70

Feller MB (1999) Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22: 653-56

Fiumelli H, Woodin MA (2007) Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol* 17(1):81-6

Flatman PW (2002) Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1566(1-2):140-51

Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(1):C134-42

- Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC (1994) Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269(26):17713-22
- Gamba G (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-93
- Gammill LS et Bronner-Fraser M (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Rev Neurosci* 4, 795-805
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105(4):521-32
- Gingras J et 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
- Gonzalez-Islas C, Chub N, Wenner P (2009) NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons. *J Neurophysiol* 101(2):507-18
- Gonzalez-Islas C et Wenner P (2006) Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates AMPAergic and GABAergic synaptic strength. *Neuron* 49(4)
- Goodman CS et Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 suppl:78-98.
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, et al. (2006) V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440: 215-19
- Grichtchenko II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF (2001) Cloning, characterization and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO₃ exchanger. *J Biol Chem* 276: 8358-63

Grillner S (2006) Biological pattern generation: the cellular and computation logic of network in motion. *Neuron* 52(5):751-66

Grillner S et Wallen P (1985) Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Anny Rev Neurosci* 8:233-61

Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37(2):299-309

Gulyas AI, Sik A, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:2205-17.

Haas M et Forbush B (2000) The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Ann Rev Physiol* 62: 515-34

Hanson MG et Landmesser LT (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23: 587-600

Harder JD, Stonerook MJ, Pondy J (1993) Gestation and placentation in two New World opossums: *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *J Exp Zool* 266(5):463-79.

Horn Z, Ringstedt T, Blaesse P, Kaila K, Herlenius E (2010) Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. *Eur J Neurosci* 31(12):2142-55

Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, Fan X, Song L, Rivière JB, Prévost C, Horst J, Simonati A, Lemcke B, Welch R, England R, Zhan FQ, Mercado A, Siesser WB, George AL Jr, McDonald MP, Bouchard JP, Mathieu J, Delpire E, Rouleau GA (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 32(3):384-92. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Dec;32(4):681

Hübner CA, Lorke DE, Hermans-Borgmeyer (2001a) Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mechanisms of Development* 102:267-69

Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (2001b) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30(2):515-24

Ishihara A, Roy RR, Edgerton VR (1995) Succinate dehydrogenase activity and soma size of motoneurons innervating different portions of the rat tibialis anterior. *Neurosci* 68:813-22

Jarolimek W, Lewen A, Misgeld U (1999) A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J Neurosci* 19(12):4695-704

Jean-Xavier C, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Cattaert D, Vinay L (2007) Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(27):11477-82

Jean-Xavier C, Pflieger JF, Liabeuf S, Vinay L (2006) Inhibitory postsynaptic potentials in lumbar motoneurons remain depolarizing after neonatal spinal cord transaction in the rat. *J Neurophysiol* 96(5):2274-81.

Kaila K (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42 : 489-537

Kaila K et Ransom B (eds) (1998) pH and Brain Function. Wiley-Liss, New York

Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J (1999) Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci* 19: 2843-51

- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1, 2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104:933-46
- Kandler K et Katz LC (1995) Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5(1):98-105
- Kandel ER, Swartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science. McGraw-Hill 4e edition
- Karadsheh MF, Depire E (2001) Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol* 85:995-97
- Khirug S, Huttu K, Ludwig A, Smirnov S, Voipio J, Rivera C, Kaila K, Khiroug L (2005) Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur J Neurosci* 21(4):899-904
- Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306
- Kiehn O, Hounsgaard J, Sillar KT (1997) Basic building blocks of vertebrate central pattern generators. In *Neurons, Networks and Motor Behavior*, eds. Stein PSG, Grillner S, Selverston A, Stuart DG, 47-59. Cambridge, MA: MIT Press
- Kitchener PD, Hutton EJ, Knott GW (2006) Primary sensory afferent innervation of the developing superficial dorsal horn in the South American opossum *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 495(1):37-52
- Knott GW, Kitchener PD, Saunders NR (1999) Development of motoneurons and primary sensory afferents in the thoracic and lumbar spinal cord of the south american opossum *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol*, 414 :423-36

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

Lamoureux S, Gingras J, Cabana T (2005) Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 65: 143-156

Lamoureux S, Hartmann J, Pflieger JF, Cabana T (2008) Is glutamate transiently expressed in limb motoneurons of developing opossums *Monodelphis domestica*? *Neurosci Abst* 29.19

Lauf PK et Adragna NC (2000) K-Cl cotransport: properties and molecular mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 10(5-6):341-54

Lavallée A et Pflieger JF (2009) Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica* : an anatomical study. *Brain Res* 1282:1-9

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

Lee HH, Jurd R, Moss SJ (2010) Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride cotransporter KCC2. *Mol Cell Neurosci* 45(2):173-9

Lee H, Chen CX, Liu YJ, Aizenman E, Kandler K (2005) KCC2 in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur J Neurosci* 21:2593-99

Leitch E, Coaker J, Young C, Mehta V, Sernagor E (2005) GABA type-A activity controls its own developmental polarity switch in the maturing retina. *J Neurosci* 25(19):4801-5.

- Lemieux M, Cabana T, Pflieger JF (2010) Distribution of the neuronal gap junction protein Connexin36 in the spinal cord enlargements of developing and adult opossums, *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 75(1) :23-32
- Le Rouzic P, Ivanov TR, Stanley PJ, Beaudoin FM, Chan F, Pinteaux E, Brown PD, Luckman SM (2006) KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. *Brain Research* 1110:39-45
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci*. 16(12):2358-70
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*. 56(6):1019-33.
- Lu J, Karadsheh M, Delpire E (1999) Developmental regulation of the neuronal specific isoform of KCl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 39:558-68
- Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C (2003) Developmental upregulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci* 18:3199-3206
- Lytle C, Xu JC, Biemesderfer D, Forbush 3rd D (1995) Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am J Physiol Cell Physiol* 269:C1496-1505
- Lytle C et Forbush B 3rd (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J Biol Chem*. 267(35):25438-43
- Martin KEA et MacKay S (2003) Postnatal development of the fore- and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Anat* 202:143-52

Marty S, Wehrle R, Alvarez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotol C (2002) Postnatal maturation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 15: 233-45

McCrea DA, Rybak IA (2008) Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57(1):134-46.

Mercado A, Broumand V, Zandi-Nejad K, Enck AH, Mount DB (2006) A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K⁺-Cl⁻ cotransport. *J Biol Chem* 281:1016-26

Mercado A, Mount DB, Gamba G (2004) Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29(1):17-25.

Mikawa S, Wang C, Shu F, Wang T, Fukuda A, Kato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Developmental Brain Research* 136:93-100

Nishimaru H et Kakizaki M (2009) The role of inhibitory neurotransmission in locomotor circuits of the developing mammalian spinal cord. *Acta Physiol (Oxf)* 197(2):83-97

Nishimaru H et Kudo N (2000) Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res Bull* 53(5): 661-9

Okabe A, Ohno K, Toyoda H, Yokokura M, Sato K, Fukuda A (2002) Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter, in the rat piriform cortex. *Neurosci Res* 44(2):225-9

Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH (2000) Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter. *J Clin Invest* 105(4):441-50

- Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. An neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271:16245-52
- Payne JA (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for the K⁺ regulation. *Am J Physiol* 273: C1516-25
- Payne JA, Rivera C, Voipo J, Kaila K (2003) Cation-chloride cotransporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26: 199-206
- Pearson MM, Lu J, Mount DB, Delpire E (2001) Localization of the K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience* 103(2):481-91
- Pflieger JF et Cabana T (1996) The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat Embryo* 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
- Pflieger JF, Clarac F, Vinay L (2002) Picrotoxin and bicuculline have different effects on lumbar spinal networks and motoneurons in the neonatal rat. *Brain Res* 10;935(1-2):81-6
- Plotkin MD, Kaplan MR, Peterson LN, Gullans SR, Hebert SC, Delpire E (1997a) expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NSC2 in the nervous system. *Am J Physiol Cell Physio* 272:C173-83
- Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E (1997b) Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33:781-95.
- 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*. *Brain Res Dev* 75(1):75-90

- Ren J and Greer JJ (2003) Ontogeny of rhythmic motor patterns generated in the embryonic rat spinal cord. *J Neurophysiol* 89: 1187-1195
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28(6):278-83
- Reynolds A, Brustein E, Liao M, Mercado A, Babilonia E, Mount DB, Drapeau P (2008) Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J Neurosci* 28(7):1588-97
- Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K et al. (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159:747-52
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-55
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependant downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-91
- Romero MF, Hediger Ma, Boulpaep EL, Boron WF (1997) Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺ -HCO₃ cotransporter. *Nature* 387: 409-13
- Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80: 211-76
- Sibilla S et Ballerini L (2009) GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Prog Neurobiol* 89(1):46-60.

- Shillingford JM, Miyoshi J, Flagella M, Shull GE, Hennighausen L (2002) Mouse mammary epithelial cells express the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1: characterization, localization and involvement in ductal development and morphogenesis *Mol Endocrinol* 16: 1309-21
- Schinder AF, Poo M (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23(12):639-45
- Smith KK (2006) Craniofacial development in marsupial mammals: developmental origins of evolutionary change. *Dev Dyn* 235:1181-93
- Song L, Mercado A, Vázquez N, Xie Q, Desai R, George AL Jr, Gamba G, Mount DB (2002) Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res.* 30;103(1-2):91-105
- Soza F, Lamoureux S, Cabana T (2003) The localization of amino acids in the spinal cord enlargements of the opossum, *Monodelphis domestica*: a developmental study. *SfN Abstr* 29:707.15.
- Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN (2004) Orchestrating neuronal differentiation : patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci* 27: 415-21
- Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hubner CA (2004) Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 468(1):57-64
- Stil A, Liabeuf S, Jean-Xavier C, Brocard C, Viemari JC, Vinay L (2009) Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience.* 164(2):809-21
- Strange K, Singer TD, Morrison R, Delpire E (2000) Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3):C860-7

- Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E (2000) Abnormal GABA_A receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 20: 7531-38
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311(5758):233-5
- Takayama C, Inoue Y (2006) Developmental localization of potassium chloride cotransporter 2 in granule cells of the early postnatal mouse cerebellum with special reference to the synapse formation. *Neuroscience* 143(3): 757-67
- Titz S, Hans M, Kelsch W, Lewen A, Swandulla D, Misgeld U (2003) Hyperpolarizing inhibition develops without trophic support by GABA in cultured rat midbrain neurons 550:719-30
- Toyoda H, Yamada J, Ueno S, Okabe A, Kato H, Sato K, Hashimoto K, Fukuda A (2005) Differential functional expression of cation-Cl⁻ cotransporter mRNAs (KCC1, KCC2, and NKCC1) in rat trigeminal nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 133(1):12-8
- Uvarov P, Pruunsild P, Timmusk T, Airaksinen MS (2005) Neuronal K⁺/Cl⁻ co-transporter (KCC2) transgenes lacking neuron restrictive silencer element recapitulate CNS neuron-specific expression and developmental up-regulation of endogenous KCC2 gene. *J Neurochem* 95(4):1144-55
- Uvarov P, Ludwig A, Marjjanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C, Airaksinen MS (2007) A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem* 282(42):30570-6
- Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Soni S, Hubner Ca, Rivera C, Airaksinen MS (2009) Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain. *J Biol Chem* 284(20)13696-704

- Vigneault-Pinard A et Cabana T (2010) Ontogenesis of noradrenalin in the spinal cord enlargements of opossums, *Monodelphis domestica*. Neurosci Abst 32.24
- Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel JC, Pearlstein E, Pflieger JF (2002) Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. Brain Res Rev 40: 118-129
- Vu TQ, Payne KA, Copenhagen DR (2000) Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. J Neurosci 20(4):1414-23
- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expression in the rat brain. Developmental Brain Research 139:59-66
- Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF (1992) The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. Brain Res Dev 68(2):203-16
- Watanabe M, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2009) Clustering of neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 284(41):27980-8
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA (1999) The neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. J Biol Chem 274:12656-64
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurons is mediated by NKCC1. J Physiol 557: 829-41
- Yan Y, Dempsey RG, Sun D (2001) Expression of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. Brain Res 911:43-55

Yvert B, Branchereau P and Meyrand P (2004) Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *J Neurophysiol* 91: 2101-2109

Zhang LL, Delpire E, Vardi N (2007) NKCC1 does not accumulate chloride in developing retinal neurons. *J Neurophysiol* 98(1):266-77

Zhang LL, Fina ME, Vardi N (2006) Regulation of KCC2 and NKCC during development: membrane insertion and differences between cell types. *J Comp Neurol* 499:132-143

Zhang LI et Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4: 1207-14

Annexe

Distribution, fonctions et phénotypes KO pour différents cotransporteurs cations-chlorure (NKCC1, NKCC2, KCC1, KCC2, KCC3 et KCC4).

CCC	Distribution	Fonction
NKCC1	<p>Ubiquitaire : exprimé au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales en particulier dans le rein, l'oreille interne et la glande salivaire.</p> <p>Retrouvé en quantité faible dans le SN (bulbe olfactif, hippocampe, noyau du trijumeau, amygdale, thalamus, cortex piriforme, moelle épinière, neurones ganglionnaires, tractus de la matière blanche : corps calleux, capsule interne, pédoncule cérébral)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Accumule Cl⁻ dans la cellule 2. Régule le volume cellulaire 3. Régule et contrôle l'excitabilité neuronale 4. Sécrète au niveau épithélial Cl⁻ <p>Phénotype des souris KO « <i>shaker/waltzer</i> » :</p> <ul style="list-style-type: none"> - surdité complète - salivation réduite - pression sanguine réduite - locomotion altérée - nociception altérée - transport ionique gastro-intestinal altéré - stérilité des mâles
Réf. NKCC1	Plotkin <i>et al.</i> , 1997; Delpire <i>et al.</i> , 1999; Evans <i>et al.</i> , 2000; Haas et Forbush, 2000; Pace <i>et al.</i> , 2000; Russell, 2000; Sung <i>et al.</i> , 2000; Hubner <i>et al.</i> , 2001; Kanaka <i>et al.</i> , 2001; Okabe <i>et al.</i> , 2002; Mikawa <i>et al.</i> , 2002; Mercado <i>et al.</i> , 2004; Yamada <i>et al.</i> , 2004; Dzhala, 2005; Toyada <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005.	
NKCC2	Exprimé uniquement dans le rein	<ol style="list-style-type: none"> 1. Accumule Cl⁻ dans la cellule 2. Régule le volume cellulaire 3. Sécrète au niveau épithélial Cl⁻ <p>Pas de souris KO à ce jour</p>
Réf. NKCC2	Gamba <i>et al.</i> , 1994 Payne et Forbush, 1994	
KCC1	Distribution similaire à NKCC1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Régule le volume cellulaire, activé dans des conditions hypotoniques 2. Régule la croissance cellulaire 3. Absorbe et sécrète K⁺ <p>Pas de souris KO à ce jour</p>
Réf. KCC1	Lauf <i>et al.</i> ; Kanaka <i>et al.</i> , 2001; Okabe <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2003; Gamba, 2005; Toyada <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005.	

CCC	Distribution	Fonction
KCC2	Exclusivement exprimé dans les neurones du SNC mais absent du SNP. Exprimé fortement dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et de la couche V du cortex, dans les cellules granulaires et cellules de Purkinje du cervelet, dans les cellules granulaires du bulbe olfactif, l'amygdale, les ganglions de la base, le thalamus, les motoneurons de la moelle épinière, dans le cortex piriforme,...	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extrude K^+ et Cl^- en conditions normales 2. Contrôle l'activité neuronale : maintien d'une faible concentration intracellulaire en Cl^- requise pour l'hyperpolarisation par les récepteurs $GABA_A$ et glycine 3. Activé dans des conditions isotoniques donc rôle moins important dans le contrôle du volume cellulaire que les autres KCC <p>Phénotype des souris KO :</p> <ul style="list-style-type: none"> - meurt à la naissance à cause d'un défaut du système respiratoire. - dans les motoneurons de la moelle épinière, GABA et glycine sont excitateur à E18 comparé au type sauvage
Réf. KCC2	Payne <i>et al.</i> , 1996 ; Payne, 1997; Lu <i>et al.</i> , 1999; Riviera <i>et al.</i> , 1999; Hübner <i>et al.</i> , 2001; Kanaka <i>et al.</i> , 2001; Song <i>et al.</i> ; 2002; Okabe <i>et al.</i> , 2003; Gagnon <i>et al.</i> , 2006; Le Rouzic <i>et al.</i> , 2006; Mercado <i>et al.</i> , 2006.	
KCC3	Exprimé dans plusieurs tissus en particulier pour KCC3a : - cerveau (colonne dorsale de la moelle épinière, cortex, hippocampe, tronc cérébral, hypothalamus, cervelet, matière blanche, plexus choroïde, cortex piriforme) - rein (surtout KCC3b) - muscle - poumon - cœur	<ol style="list-style-type: none"> 1. Régule le volume cellulaire, activé dans des conditions hypotoniques 2. Régule la croissance cellulaire 3. Impliqué dans la myélinisation ? <p>Phénotype des souris KO :</p> <ul style="list-style-type: none"> - déficit locomoteur - neuropathie périphérique - gating sensorimoteur déficient - hypertension artérielle - surdité progressive
Réf. KCC3	Pearson <i>et al.</i> , 2001; Howard <i>et al.</i> , 2002; Boettger <i>et al.</i> , 2003; Mercado <i>et al.</i> , 2005; Le Rouzic <i>et al.</i> , 2006.	
KCC4	Exprimé dans plusieurs tissus : - cœur - rein - poumon Dans le SN : expression forte à la naissance mais décline durant le développement - en faible quantité dans le cerveau adulte - hautement exprimé dans les zones ventriculaires dans le cerveau embryonnaire - hautement exprimé dans les nerfs périphériques, la moelle épinière, la membrane apicale du plexus choroïdien	<ol style="list-style-type: none"> 1. Régule le volume cellulaire, activé par le gonflement de la cellule 2. Réabsorbe K^+ <p>Phénotypes des souris KO :</p> <ul style="list-style-type: none"> - souris normale à la naissance - dégénérescence des cellules ciliées de la cochlée à partir de P14 - acidose rénale
Réf. KCC4	Mount <i>et al.</i> , 1999 ; Boettger <i>et al.</i> , 2002; Karadsheh <i>et al.</i> , 2004; Gamba, 2005; Le Rouzic <i>et al.</i> , 2006.	

