

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

**Université de Montréal**

**Expression de la connexine 36 dans la moelle épinière au cours  
du développement postnatal de l'opossum *Monodelphis  
domestica***

**par  
Maxime Lemieux**

**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**

**Mars, 2009**

© Maxime Lemieux, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures



Ce mémoire intitulé:

Expression de la connexine 36 dans la moelle épinière au cours du développement postnatal de l'opossum *Monodelphis domestica*

présenté par  
Maxime Lemieux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Michel Anctil  
président-rapporteur

Thérèse Cabana  
Codirectrice de recherche

Jean-François Pflieger  
Codirecteur de recherche

Stéphane Molotchnikoff  
Membre du jury

## Résumé

Nous utilisons l'opossum *Monodelphis domestica* comme modèle d'étude développementale des systèmes moteurs mammaliens. Les membres antérieurs du nouveau-né sont capables de mouvements rythmiques et alternés qui sont probablement sous contrôle spinal alors que les membres postérieurs ne commencent à bouger que durant la seconde semaine. À cause du peu de synapses chimiques démontrées dans les renflements spinaux de l'opossum néonatal, nous posons l'hypothèse que les synapses électriques permettent la communication neuronale responsable des premiers mouvements. Nous avons analysé par immunohistochimie la présence d'une protéine des jonctions gap neuronales, la connexine 36 (Cx36), dans les renflements spinaux de l'opossum postnatal. À la naissance, l'immunoréactivité de Cx36 est modérée dans la matière grise présomptive des renflements spinaux et diminue graduellement dans la corne ventrale mais augmente dorsalement jusqu'à un niveau élevé entre P10 et P20. Dans la corne ventrale, les puncta de Cx36 sont localisés près des interneurones ventraux ou des dendrites des motoneurones plutôt que sur leurs somas. L'immunoréactivité de Cx36 est à peine détectable dans la corne dorsale à P30. Cx36 est détectée dans la matière blanche présomptive à la naissance et diminue par la suite, à l'exception de la partie dorsale du funicule latéral où elle demeure élevée entre P10 et P20, avant de disparaître. La présence de Cx36 dans les renflements spinaux de l'opossum néonatal suggère l'existence de synapses électriques qui peuvent contrôler les premiers mouvements. Sa diminution postnatale suit l'augmentation des synapses chimiques dans la moelle et la maturation de la locomotion.

**Mots-clés :** connexine, connexine 36, développement, mammifère, moelle épinière, opossum, système nerveux, synapses électriques.

## Abstract

We use opossums *Monodelphis domestica* as a model to study the development of mammalian motor systems. The forelimbs of newborn opossums perform rhythmic and alternate movements that are likely of spinal control, and the hindlimbs only start moving in the second week. In view of the scarcity of chemical synapses demonstrated in the spinal enlargements of neonatal opossums, we hypothesize that electrical synapses (gap junctions) could mediate the neuronal communication responsible for the first limb movements. We have investigated by immunohistochemistry the presence of the neuronal gap junction protein Connexin36 (Cx36) in the spinal cord enlargements of postnatal opossums. At birth, Cx36 immunoreactivity is moderate in the presumptive gray matter in both enlargements. Thereafter, Cx36 expression gradually decreases in the ventral horn, but increases dorsally up to a high level between P10 and P20 in both enlargements. In the ventral horn, Cx36 puncta are located near ventral interneurons or on dendrites of motoneurons rather than on their somas. Immunoreactivity for Cx36 is barely detectable in the dorsal horn by P30. Cx36 immunoreactivity is detected in the presumptive white matter at birth, but decreases thereafter, except for the dorsal part of the lateral funiculi where it is very high between P10 and P20, before it vanishes by P30. The presence of the neuronal gap junction protein Cx36 in the spinal enlargements of neonatal opossums suggests the existence of electrical synapses, which could control the early limb movements. Its postnatal decrease parallels the increase in chemical synapses in the spinal cord and the maturation of locomotion.

**Key words:** connexin, connexin36, development, electrical synapses, mammals, nervous system, opossum, spinal cord.

## Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT .....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
LISTE DES ANNEXES .....	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 SYSTÈME LOCOMOTEUR MAMMALIEN .....	2
1.2 SYNAPSES .....	5
<i>Synapses chimiques</i> .....	5
<i>Synapses électriques</i> .....	6
<i>Jonctions gap</i> .....	11
<i>Connexine 36</i> .....	13
1.3 DÉVELOPPEMENT DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .....	16
1.4 DÉVELOPPEMENT DE L'OPOSSUM <i>MONDELPHIS DOMESTICA</i> .....	18
1.5 OBJECTIF ET HYPOTHÈSES .....	22
<b>2. MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>24</b>
2.1 DISSECTION ET IMMUNOHISTOCHEMIE .....	24
2.2 ANALYSE DES DONNÉES .....	26
<b>3. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT AU COURS DE CE TRAVAIL .....</b>	<b>42</b>
Lemieux M, Cabana T, Pflieger J-F. Postnatal development of the neuronal gap junction protein Connexin36 in the spinal cord of opossums, <i>Monodelphis domestica</i>	
<b>4. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>67</b>
<i>Aspect méthodologique</i> .....	67
<i>Décours temporel</i> .....	68
<i>Expression dans la corne ventrale</i> .....	70
<i>Expression dans la corne dorsale</i> .....	71
<i>Relation avec la synaptogenèse chimique</i> .....	73
<i>Expression dans la portion dorsale du funicule latérale</i> .....	74
<b>5. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>X</b>

## Liste des figures

Figure 1 Segments de la moelle épinière.....	28
Figure 2 Anatomie de la moelle épinière .....	30
Figure 3 Synapses chimiques et électriques.....	32
Figure 4 Structure des synapses électriques .....	34
Figure 5 Opossum <i>M. domestica</i> à la naissance.....	36
Figure 6 Coupe histologique de la moelle épinière à la naissance.....	38
Figure 7 Synaptogenèse chimique chez l’opossum <i>M. domestica</i> .....	40

## Liste des abréviations

BMPs	Bone morphogenetic proteins (protéines morphogénétiques de l'os)
BSA	Bovine serum albumine (albumine du sérum bovin)
CPG	Central pattern generator (générateur de patron central)
C	Cervical
Cx	Connexin (connexine)
E	Jour embryonnaire
FRIL	Freeze-fracture replica immunogold labeling (immunomarquage avec particules d'or sur réplique de cryodécapage)
IPL	Inner plexiform layer (couche plexiforme interne)
IZ	Intermediate zone (zone intermédiaire)
MZ	Marginal zone (zone marginale)
NeuN	Neuronal Nuclei protein (protéine des noyaux neuronaux)
NGS	Natural goat serum (sérum naturel de chèvre)
OPL	Outer plexiform layer (couche plexiforme externe)
P	Jour postnatal
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampon phosphate salin)
Shh	Sonic Hedgehog
TBST	Tris buffer saline and triton (Tampon Tris salin et Triton X-100)
VZ	Ventricular zone (zone ventriculaire)

## Liste des annexes

Annexe 1 Protocole pour Cx36 et NeuN.....	x
---	---

## Remerciements

Je tiens à remercier mes codirecteurs de maîtrise, Jean-François Pflieger et Thérèse Cabana, pour m'avoir guidé à travers mon projet, que ce soit dans l'élaboration du protocole, dans la présentation des résultats ou dans la manière de les partager au reste de la communauté scientifique. Ils sont, chacun à leur manière, un exemple inspirant qui a su me confirmer ma vocation pour la science.

Je remercie James I. Nagy, sans qui ce projet aurait pu s'éterniser, ainsi que Louise Pelletier et Stéphanie Lamoureux pour leur soutien technique. Je remercie mes collègues et amis, Annie Lavallée, Syndia Champagne, Alexe Vigneaut-Pinard et Ha Loan Phan avec qui j'ai partagé non pas un mais deux laboratoires au cours de ces deux dernières années. Je remercie Aurélie Beauregard et Nicolas Ah-Son qui ont contribué à mon projet dans le cadre de stage d'initiation à la recherche.

Je remercie mes amis, avec lesquels j'ai partagé tant d'idées, Guillaume Desrochers, Raymond Wong, Bilal Azakir, Abdellatif Nemri, Narcis Ghisovan et Frédéric Cyr. Finalement, je remercie mes parents qui m'ont supporté au cours de mon parcours académique et sans qui ce mémoire n'existerait pas.

# 1. Introduction

La locomotion est une fonction essentiellement spinale contrôlée par un groupe de neurones situés dans chacun des renflements de la moelle épinière et appelé générateur de patron central (CPG : central pattern generator; Grillner & Zangger, 1975) qui agit directement ou indirectement sur les neurones effecteurs, c'est-à-dire les motoneurones innervant les muscles des membres ou du tronc. Pour que la locomotion, comme tout acte moteur, soit appropriée, les neurones du CPG doivent être informés du contexte périphérique, par exemple, la surface de locomotion (rugosité, pente, obstacles, etc.) et doivent recevoir de l'information des centres moteurs du cerveau. Dans le système nerveux adulte, la communication entre les motoneurones, le CPG et autres interneurones spinaux, les afférences primaires et les projections descendantes du cerveau s'effectue essentiellement par l'intermédiaire des synapses chimiques. Cependant, en début de développement, la communication par voie de synapses électriques prévaut (Kandler & Katz, 1995). Chez les mammifères, le remplacement des synapses électriques par les synapses chimiques au cours du développement n'a pas été étudié de manière approfondie.

Ce sujet du présent mémoire s'inscrit dans le cadre général d'une étude sur le développement de la motricité utilisant un marsupial, l'opossum *Monodelphis domestica*, dont le développement des systèmes moteurs s'effectue presque entièrement après la naissance (revue par Cabana, 2000). Nous avons étudié les changements développementaux dans l'expression d'une protéine essentielle des synapses électriques neurales au cours du développement. Avant de décrire les travaux effectués chez l'opossum postnatal qui nous ont amenés à postuler la présence de synapses

électriques dans la moelle épinière, nous effectuerons une revue de l'organisation du système locomoteur et une revue de la synapse électrique.

### **1.1 Système locomoteur mammalien**

Les motoneurones somatiques, c'est-à-dire ceux qui innervent la musculature striée squelettique, sont les effecteurs centraux du système moteur. Ils agissent sur la posture et l'équilibre ainsi que sur la locomotion en innervant les muscles axiaux et des membres. Chez les mammifères quadrupèdes, la locomotion repose sur l'alternance de l'activité des muscles fléchisseurs et extenseurs agissant au niveau d'une articulation, sur l'alternance des muscles homonymes disposés de chaque côté du corps et sur la coordination des ceintures pectorale (membres antérieurs) et pelvienne (membres postérieurs). C'est au niveau des renflements cervical et lombaire de la moelle épinière que se trouvent les circuits locomoteurs responsables de faire décharger les motoneurones de manière coordonnée et appropriée au comportement (Floeter, 2003). L'activité des CPG est modulée par les afférences primaires médiant l'information sensorielle provenant des membres et les différentes voies descendantes des centres supérieurs (Grillner, 2006).

Tel qu'illustré à la figure 1, la moelle épinière se divise en segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés, caractérisés par leur position au sein de la colonne vertébrale et les régions du corps qu'ils innervent. Lorsque coupée transversalement, la moelle épinière présente, autour du canal épendymaire et en forme de papillon, une région centrale de matière grise contenant les corps cellulaires des neurones, bordée par une région de matière blanche contenant les projections ascendantes et descendantes.

La matière grise est divisée en corne ventrale, corne dorsale et une zone intermédiaire bordant le canal épendymaire et s'étendant médiolateralement entre les deux cornes, et la matière blanche en funicules dorsal, latéral et ventral. La racine ventrale est formée par les axones des motoneurones fournissant l'innervation motrice des muscles alors que la racine dorsale contient les prolongements centraux des cellules ganglionnaires, aussi appelées afférences primaires, qui fournissent à la moelle les informations sensorielles.

Les plus gros neurones de la moelle épinière, les motoneurones somatiques, sont localisés dans la corne ventrale. Les motoneurones innervant les muscles du tronc essentiels à la posture forment une colonne longitudinale en position médiane que l'on retrouve sur toute la longueur de la moelle. Les motoneurones qui innervent les muscles des membres forment une colonne longitudinale en position latérale que l'on retrouve seulement aux niveaux des renflements cervical et lombaire. Le CPG locomoteur est localisé dans chacun des renflements et est formé des interneurones situés dans la corne ventrale, dispersés entre les colonnes motrices, qui coordonnent l'activité des motoneurones. Des interneurones se trouvant dans la portion médiane de la zone intermédiaire de la moelle épinière permettraient l'alternance et la coordination nécessaire à la locomotion (voir Floeter, 2003).

La corne dorsale est divisée en trois régions qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle: le nucleus proprius, la substantia gelatinosa et la zone marginale (figure 2). Le nucleus proprius contient les plus gros neurones de la corne dorsale, relayant les influx somatosensoriels précis (toucher, proprioception). La substantia gelatinosa, ainsi dénommée parce qu'elle contient un grand nombre de petites cellules

entourées de fibres peu ou non myélinisées qui lui donnent un aspect «gélatineux» sur coupes histologiques, reçoit des informations somatosensorielles diffuses. La zone marginale possède les neurones les plus petits de la moelle épinière et est impliquée dans la perception de la douleur et de la température (voir Hendry & Hsiao, 2003).

Les afférences primaires transmettent les stimuli sensoriels qui proviennent de la périphérie vers la corne dorsale, principalement, mais les sensations proprioceptives se terminent également dans la corne ventrale et permettent ainsi un rétrocontrôle durant le mouvement en renseignant rapidement les circuits moteurs sur le degré d'étirement des fibres musculaires et la position des articulations. Les sensations somatosensorielles telles le toucher et la pression sont relayées de la corne dorsale (essentiellement le nucleus proprius) vers le cerveau par les voies ascendantes. Les sensations nociceptives sont transmises de la corne dorsale (le noyau postéromarginal) vers le cerveau par le système antérolatéral (voir Hendry & Hsiao, 2003).

Des connexions courtes propres à la moelle (propriospinales, figure 2) relient les segments spinaux rapprochés, alors que des voies propriospinales longues ascendantes et descendantes relient les deux renflements pour coordonner les mouvements des membres. Les segments cervicaux supérieurs innervant les muscles du cou, donc contrôlant les muscles de la tête, sont également reliés aux renflements et autres segments spinaux par les voies propriospinales longues pour coordonner les mouvements des membres, du tronc, de la queue et de la tête. Pour que les centres de contrôle supérieurs situés dans l'encéphale soient renseignés sur l'état de la moelle épinière et de la périphérie, des projections issues de la moelle, dites ascendantes, innervent les noyaux des cordons dorsaux (gracile et cunéiforme), la formation

réticulée et le cervelet. Ces informations atteignent indirectement, et de façon modifiée, le système vestibulaire, le noyau rouge et le cortex qui sont les principaux centres moteurs projetant des axones à la moelle (voies descendantes), en plus de la formation réticulée. Les voies descendantes influencent de différentes façons l'activité des circuits moteurs et des motoneurones spinaux, les voies vestibulospinale et réticulospinale contrôlant la posture et les voies corticospinale et rubrospinale, le mouvement volontaire (Schieber & Baker, 2003).

## 1.2 Synapses

### *Synapses chimiques*

Chez l'adulte, tel que dit précédemment, la communication entre toutes les composantes du système nerveux décrites ci-haut repose presque entièrement sur les synapses chimiques. Brièvement, une synapse chimique (figure 3A-C) comprend des éléments présynaptique et postsynaptique séparés par un espace extracellulaire de 20 à 40 nm appelé la fente synaptique. L'élément présynaptique se trouve à l'extrémité de l'axone et contient sur sa membrane plasmique des zones actives. Celles-ci sont formées de canaux calciques entourés de vésicules synaptiques, des sphères lipidiques contenant des neurotransmetteurs et couvertes de protéines interagissant avec les complexes exocytotiques, également dispersés sur la membrane plasmique de part et d'autres des canaux calciques. Un potentiel d'action généré au niveau du soma neuronal se propage le long de l'axone et arrive à la terminaison présynaptique où il déclenche l'entrée de calcium aux zones actives qui va permettre la fusion à la membrane plasmique des vésicules synaptiques, résultant alors en libération de

neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'élément postsynaptique est, règle générale, une épine dendritique et se caractérise par des récepteurs et des canaux ioniques alignés avec les zones actives de l'élément présynaptique.

Les neurotransmetteurs se lient à des récepteurs spécifiques sur la membrane dite postsynaptique. Les récepteurs sont qualifiés d'ionotropiques lorsqu'ils ouvrent directement les canaux ioniques et de métabotropiques s'ils activent une voie intracellulaire pour ouvrir les canaux ioniques. Selon leur nature, les neurotransmetteurs génèrent dans l'élément postsynaptique des courants dépolarisants s'ils consistent en entrée de sodium ou de calcium ou de sortie de chlore, et des courants hyperpolarisants s'ils permettent la sortie de potassium ou l'entrée de chlore. La transmission synaptique se fait généralement au niveau de la dendrite et les courants générés se propagent vers le soma où ils peuvent déclencher un potentiel d'action dans l'axone. Le neurone postsynaptique peut ainsi propager l'activité vers une nouvelle cible. La transmission synaptique dure minimalement 300  $\mu$ sec mais peut durer jusqu'à quelques secondes (Kandel & Siegelbaum, 2000).

### *Synapses électriques*

La synapse chimique s'avère ainsi une structure complexe qui nécessite une maturation, et ne peut être présente très tôt au cours du développement du système nerveux. Cela ne veut toutefois pas dire que les neurones immatures ne communiquent pas entre eux. Ils le font par une structure plus simple, la synapse électrique, qui permet un couplage électrotonique grâce à la continuité cytoplasmique entre deux neurones, la jonction gap (figure 3D). Les jonctions gap ne sont pas l'apanage du système nerveux immature, étant largement répandues dans l'organisme, elles jouent notamment un rôle

important dans le fonctionnement normal du cœur (voir Kumar & Gilula, 1996). Une jonction gap est composée d'un connexon, structure protéinique formant un pore dans la membrane d'une cellule, qui s'associe avec un connexon d'une cellule adjacente pour permettre la communication cytoplasmique entre les deux cellules (Dermietzel & Spray, 1993). Comme chaque jonction ne laisse passer qu'une très faible quantité de courant, il faut un ensemble plus ou moins grand de ces jonctions pour former une synapse électrique, définie physiologiquement. Les synapses électriques (figure 4A) sont majoritairement dendrodendritiques et axodendritiques (revue par Nagy et al., 2004) mais aussi axosomatiques, et somatodendritiques (Rash et al., 1998) ainsi que somatosomatiques (Hinrichsen & Larramendi, 1968; Matsumoto et al., 1988) et axoaxoniques (Shiosaka et al., 1989).

Chez les vertébrés, chaque connexon est formé par l'assemblage de six protéines appelées connexines (Cx). Un connexon est dit homomérique si les connexines qui le composent sont identiques, ou hétéromérique si elles sont différentes. Une jonction gap homotypique est composée de douze connexines (des deux connexons) identiques alors qu'une jonction gap hétérotypique est composée d'un connexon formé de six connexines d'un ou plusieurs types et d'un autre connexon de six connexines différentes. Il faut toutefois spécifier que les jonctions hétérotypiques n'ont été observées que *in vitro*, jamais *in vivo* à cause de difficultés techniques (Kumar & Gilula, 1996).

Dans le système nerveux, la première preuve expérimentale convaincante de la transmission électrique n'est pas venue des mammifères ou même des vertébrés, mais d'un invertébré, l'écrevisse. En étudiant la synapse motrice géante de l'écrevisse,

Furshpan & Potter (1959) ont observé qu'un courant dépolarisant se propageait orthodromiquement (i.e., dans le sens normal de propagation du potentiel d'action) entre l'élément « présynaptique » et l'élément « postsynaptique » de la synapse alors qu'un courant hyperpolarisant se propageait antidromiquement (i.e., dans le sens inverse de propagation du potentiel d'action). Cette observation était incohérente avec le mode de transmission chimique qui est purement orthodromique, et ils ont émis l'hypothèse d'une « synapse rectifiante », aux propriétés particulières : bidirectionnelle mais asymétrique, les courants générés par une hyperpolarisation orthodromique et une dépolarisation antidromique ne peuvent la traverser. L'analyse en microscopie électronique de la synapse motrice géante de l'écrevisse montrait une apposition et une fusion des membranes pré- et postsynaptiques non caractéristiques des synapses chimiques, ce qui suggérait qu'un contact direct entre les deux cellules était le support de la synapse rectifiante.

Eckert (1963) rapporta la présence d'une interaction électrotonique entre les cellules unipolaires des ganglions segmentaires de la sangsue. Un courant dépolarisant mais sous le seuil d'un potentiel d'action dans une cellule déclenchait un potentiel d'action synchrone dans l'autre cellule et l'hyperpolarisation d'une des deux cellules empêchait le déclenchement d'un potentiel d'action dans l'autre cellule, indiquant la transmission de l'effet hyperpolarisant à cette seconde cellule. Ce type de synapse électrique n'était donc pas sélectif à une direction du courant dépolarisant ou hyperpolarisant, signifiant que certaines synapses électriques pouvaient être non rectifiantes. Bennett et al. (1963) rapportèrent ce même type de transmission électrique non rectifiante dans les neurones spinaux de mormyres ou poissons électriques, où les

courants dépolarisants et hyperpolarisants se déplaçaient aussi bien orthodromiquement qu'antidromiquement. Ils montrèrent par microscopie électronique que dans certaines régions dendritiques, les membranes cytoplasmiques se fusionnaient pour donner une plaque dont l'épaisseur était de 14 nm, ce qui est inférieur à l'espace minimal de 20 nm de la fente synaptique de la synapse chimique.

Le couplage électrotonique chez les Mammifères fut démontré pour la première fois entre les motoneurones spinaux du renflement lombaire chez le chat adulte. Nelson (1966) enregistrait la réponse intracellulaire d'un motoneurone à une stimulation électrique de la racine dorsale pour évoquer une réponse réflexe mais observa aussi une interaction facilitatrice suite à la stimulation antidromique de motoneurones voisins. Cette interaction facilitatrice diminuant de 30% le seuil du potentiel d'action était efficace lorsque l'intervalle entre la stimulation antidromique de la racine ventrale et la stimulation orthodromique de la racine dorsale était de 1 ms, intervalle trop court pour être attribué à l'activation de collatérales. Seules des interactions électriques pouvaient expliquer ce résultat. Cette démonstration était indirecte et il faudra attendre Baker & Llinàs (1971) pour une démonstration plus robuste de couplage électrotonique chez les mammifères. Après stimulation du nerf trijumeau, ils mirent en évidence une composante avec dépolarisation à courte latence entre des neurones du noyau mésencéphalique. Cette dépolarisation à courte latence ne pouvait être attribuable à la synapse chimique de par sa courte latence (180  $\mu$ sec), l'absence de variation ou d'échec, et par son insensibilité aux variations de potentiel membranaire. Selon les auteurs, seule la synapse électrique expliquait cette dépolarisation à courte latence et l'apposition des membranes de ces neurones, telle que décrite en microscopie

électrotonique par Hinrichsen & Larramendi (1968), et qui offrait le support anatomique pour les synapses électriques somasomatiques.

Gogan et al. (1977) mirent à jour une composante de dépolarisation à courte latence (200-700  $\mu$ sec) entre les motoneurones spinaux lombaires chez le chat adulte par stimulation antidromique. Contrairement aux résultats de Nelson (1966), les racines dorsales étaient coupées et cette dépolarisation variant de 0,2 à 2,0 mV dans le motoneurone devait provenir des autres motoneurones activés antidromiquement. Gogan et al. (1977) déplorait toutefois l'absence d'une démonstration anatomique des synapses électriques entre motoneurones mais envisageaient que ce couplage électrotonique était dendrodendritique.

La présence en microscopie électronique des jonctions gap dans la région ventrolatérale de la moelle lombaire a été rapportée chez des souris et des rats néonataux et adultes (Motorina, 1989). Des jonctions gap ont été également observées entre des dendrites enchevêtrés des motoneurones dorsolatéraux innervant le muscle ischio-caverneux chez le rat (Matsumoto et al., 1989), ce qui fut par la suite rapporté entre des motoneurones innervant le muscle soleus chez le rat (van der Want et al., 1998).

Par rapport aux synapses chimiques, les synapses électriques présentent comme différence fonctionnelle majeure une transmission pratiquement instantanée et bidirectionnelle des courants ioniques. Ces propriétés permettent de synchroniser un ensemble de neurones qui peuvent, par exemple, répondre très rapidement à certains stimuli (Kandel & Siegelbaum, 2000). Le couplage électrotonique n'est toutefois pas approprié dans la majorité des réseaux neuronaux où l'inhibition et l'excitation sont

requises. Les synapses chimiques conviennent alors à ces mécanismes largement répandus puisque la transmission au niveau de celles-ci peut aussi bien être excitatrice qu'inhibitrice en plus d'être modulable à différentes étapes. On ne peut toutefois exclure un rôle des synapses électriques dans le fonctionnement des réseaux où la synapse chimique domine, surtout si l'on considère la capacité des synapses électriques à transmettre des courants ioniques sous le seuil d'un potentiel d'action qui joue sans doute un rôle dans le fonctionnement de réseaux neuronaux.

### *Jonctions gap*

L'étude des jonctions gap chez les mammifères adultes est très difficile car elles sont très petites et peu abondantes. Le cryodécapage et l'immunomarquage avec des particules d'or (FRIL, «freeze-fracture replica immunogold labeling») facilite cette étude et permet de détecter une synapse électrique ne contenant que 6 connexons dans le plan tangentiel de la membrane plasmique (Rash et al., 1998). C'est avec cette technique que Kamasawa et al. (2006) ont pu démontrer que dans le système nerveux, les jonctions gap des synapses électriques peuvent former l'une ou l'autre de cinq configurations ultrastructurelles, présentées à la figure 4B. Les plus communes sont appelées plaques cristallines, où les nombreux connexons sont voisins sans ménager d'espace entre eux, et plaques non cristallines, où l'on retrouve entre les jonctions gap de la synapse des espaces chacun de la dimension (diamètre) d'un canal jonctionnel (donc, diamètre d'un connexon). Dans une synapse électrique dite réticulaire, des grands espaces de la taille de 10 à 100 connexons se retrouvent entre les groupes de jonctions gap. On retrouve en plus faible proportion des synapses en corde («string») composées de 1 à 30 jonctions gap alignées l'une derrière l'autre et des synapses en

ruban où ce sont des paires de jonctions gap qui s'alignent. La densité des jonctions gap est régulée par la synthèse protéique sous l'influence des hormones, de la matrice extracellulaire ou du cycle cellulaire (revue par Rozental et al., 2000).

L'étude des jonctions gap a été facilitée par la découverte des connexines qui forment, comme nous l'avons mentionné plus tôt, les connexons (revue par Dermietzel & Spray, 1993). Une connexine est une protéine composée de quatre domaines transmembranaires (M1 à M4) dont les N- et C-terminaux sont du côté cytoplasmique (figure 4D), deux boucles extracellulaires (E1 et E2) et une boucle intracellulaire. M3 est amphipathique et permet l'alignement du canal dans la membrane, et les deux boucles extracellulaires permettent l'interaction avec le connexon d'une autre cellule (voir Kumar & Gilula, 1996). Il existe différents types de connexines dans l'organisme et dans le système nerveux d'une même espèce. Elles demeurent des protéines structurales relativement semblables, avec une homologie de 50% dans la séquence des acides aminés, et possèdent toutes trois cystéines en positions identiques dans les boucles extracellulaires (revue par Rozental et al., 2000). Ces trois cystéines maintiennent probablement la structure tertiaire rigide nécessaire à l'amarrage des deux connexons qui forment un canal jonctionnel (Kumar & Gilula, 1996).

Un neurone peut exprimer plusieurs types de connexines, le choix phénotypique dépendant de l'âge de l'individu, de la population cellulaire et du lieu de couplage (Nagy et al., 2004). Différentes connexines confèrent différentes propriétés fonctionnelles aux synapses électriques en ce qui a trait à la perméabilité des jonctions gap les composant, à la conductance unitaire et à la sensibilité au voltage (Rozental et al., 2000).

À l'heure actuelle, il semble que les gènes de connexines mammaliennes soient complètement identifiés (Willecke et al., 2002). Dans le système nerveux mature et en développement, on retrouve les Cx26, Cx32, Cx36, Cx43, Cx45 et Cx47 (Nagy et al., 2004). Les Cx29, Cx30, Cx31, Cx37 et Cx57 sont exprimées seulement de manière transitoire lors du développement du système nerveux (voir plus loin). Parmi ces connexines, Cx36 est la seule exprimée exclusivement par les neurones (Condorelli et al., 1998; Rash et al., 2000) et c'est celle qui a été mise en évidence dans notre étude sur l'opossum.

### *Connexine 36*

Cx36 a été découverte simultanément par Söhl et al. (1998) et Condorelli et al. (1998). Elle a un poids moléculaire de 36 kDa et est l'orthologue de Cx35 exprimée chez la raie. Elle diffère légèrement des autres connexines au niveau de la boucle intracellulaire et du domaine carboxy-terminal. Condorelli et al. (1998) ont démontré que Cx36 était absente de l'hippocampe après injection intrapéritonéale d'acide iboténique qui détruit spécifiquement les neurones mais pas les glies, supportant une expression de Cx36 spécifique par les neurones. Sa spécificité neuronale fut confirmée par une étude immunohistochimique en microscopie électronique (Rash et al., 2000). Bien que Cx36 soit reconnue comme exclusivement neuronale dans le système nerveux central, elle est également exprimée de manière transitoire dans les myotomes, les muscles des membres et ceux des yeux, le pancréas et le foie durant le développement du poulet (Berthoud et al., 2004).

Les jonctions gap formées par Cx36 présentent une insensibilité au voltage pour des potentiels membranaires entre -60 mV et 60 mV (Al-Ubaidi et al., 2000; Teubner et

al., 2000). Cx36 ne peut se lier à un autre type de connexine, et forme ainsi des jonctions homomériques et homotypiques (Al-Ubaidi et al., 2000). Par conséquent, Cx36 ne peut permettre la communication intercellulaire qu'entre neurones l'exprimant. De plus, Cx36 ne peut former d'hémicanaux car les connexons formés de Cx36 communiquant avec le milieu extracellulaire sont non fonctionnels (Al-Ubaidi et al., 2000), différant en cela de son orthologue Cx35 qui peut aussi bien former des jonctions intercellulaires que des hémicanaux (White et al., 1999). La conductance unitaire d'un pore formé par Cx36 est d'environ 15 pS, soit la conductance la plus faible de toutes les connexines, ce qui conférerait aux neurones plus de flexibilité à réguler le couplage électrotonique (Srinivas et al., 1999). Cx36 est, comme toute connexine, perméable aux ions inorganiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.), à certains messagers secondaires (AMPc, ATP, IP3) et aux molécules hydrophiles dont le diamètre est inférieur à 1,5 nm (Loewenstein, 1981). Sa perméabilité à des messagers secondaires (par exemple l'IP3) favorise des interactions à la fois électriques et biochimiques entre les neurones (Rozental et al., 2000). Sa conductance est diminuée par différents facteurs, dont l'acidification du milieu intracellulaire (Spray et al., 1981) et l'augmentation du calcium intracellulaire (Loewenstein, 1981).

Chez les rongeurs adultes, l'ARN messager de Cx36 se trouve exprimé le plus fortement dans les bulbes olfactifs, la rétine, les régions CA3/CA4 de l'hippocampe, la glande pinéale, l'olive inférieure et plusieurs autres noyaux du tronc cérébral (Condorelli et al., 1998), modérément dans le cortex cérébral, le striatum, l'hypothalamus, le mésencéphale, le cervelet et la moelle épinière, moins encore dans les ganglions de la base (sauf le striatum), les collicules supérieurs et inférieurs et les

ganglions de la racine dorsale (Condorelli et al., 2000), et finalement est absent du thalamus à l'exception du noyau réticulaire (Condorelli et al., 1998). Belluardo et al. (1999) rapportent que l'ARN messager est exprimé par les neurones de toutes les régions de la moelle épinière cervicale chez l'humain adulte, avec la plus forte concentration dans les motoneurones. Cx36 est également présente au niveau thoracique de la moelle épinière du rat adulte, où on retrouve la protéine sur les motoneurones sympathiques préganglionnaires et somatiques, tel que démontré par immunohistochimie (Marina et al., 2008).

Cx36 est exprimée dans des régions pour lesquelles on attribue aux synapses électriques un rôle de synchronisation des décharges neuronales, tel l'hippocampe (MacVicar & Dudek, 1981, Hormuzdi et al., 2001), l'olive inférieure (Llinàs & Sasaki, 1989) et la rétine (Hansen et al., 2005). On attribue également aux synapses électriques dans les réseaux spinaux adultes, où l'on retrouve l'ARNm (Chang et al., 1999; Yates et al., 2008), un rôle dans la génération des rythmes oscillatoires. Les rythmes oscillatoires induits par des agents pharmacologiques, enregistrés au niveau des racines ventrales, persistent en présence de TTX et disparaissent après l'inhibition des jonctions gap (Kiehn & Tresch, 2002). De plus, la mise en évidence d'une population d'interneurones excitateurs impliqués dans la locomotion au niveau lombaire qui sont électriquement couplés (Hinckley & Ziskind-Conhaim, 2006) suggère que ce rythme oscillatoire serait généré par les synapses électriques entre les interneurones des CPG locomoteurs. Toutefois, les souris knockout pour Cx36 se développent normalement et ne présentent pas de déficit moteur (Deans et al., 2001), ce qui suggère que Cx36 n'est

pas vitale ou que son rôle peut être compensé par un autre type de jonctions gap formant des synapses électriques.

### 1.3 Développement de la moelle épinière

Des jonctions gap relient les cellules dès le début du développement du système nerveux, soit dans la plaque neurale (Warner, 1973) formée à partir de l'ectoderme par l'effet inducteur de la notochorde sous-jacente. Au cours de la neurulation, les bords de la plaque neurale se replient vers la ligne médiane et fusionnent, formant le tube neural et la crête neurale. Le tube neural, un épithélium pseudostratifié cylindrique entourant le neurocoele, est initialement formé de trois vésicules (proscéphale, mésencéphale et rhombencéphale) qui formeront le cerveau et d'une mince portion caudale qui deviendra la moelle épinière sur laquelle nous nous concentrerons.

Les cellules de la zone ventriculaire (ou germinale) bordant le neurocoele prolifèrent rapidement et épaississent l'épithélium. Les cellules qui se divisent en synchronie sont reliées par des jonctions gap (Cheng et al., 2004) et le découplage d'une cellule de la population devenant postmitotique précéderait son départ de la zone de prolifération (Cai et al., 1997). Les cellules qui migrent hors de la zone germinale, vers la périphérie, forment ainsi la zone intermédiaire, selon un gradient rostrocaudal le long de la moelle et ventrodorsal (Fujita, 1964). La différenciation neuronale, l'émission du prolongement qui deviendra l'axone puis des prolongements qui deviendront les dendrites, s'effectue selon des gradients d'influence de facteurs ventralisant (*Sonic Hedgehog*, Shh), sécrétés par la plaque ventrale (*floor plate*), et dorsalisant (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), sécrétés par la plaque dorsale (*roof*

*plate*). Les neurones les plus soumis à l'influence de Shh vont se différencier en motoneurones et différents types d'interneurones ventraux; ceux plus soumis à l'influence des BMPs deviendront des interneurones dorsaux à fonction plutôt sensorielle (Jessell & Sanes, 2000).

Les différentes régions du système nerveux, dont la moelle épinière, commencent à montrer de l'activité bien avant que la synaptogenèse (des synapses chimiques) ne soit complétée. Ce fonctionnement est possible grâce à l'établissement des jonctions gap formant les synapses électriques déjà décrites, plus précoces que les synapses chimiques. Par exemple, Fulton et al. (1980) ont enregistré dans les motoneurones spinaux du rat néonatal, en faisant des stimulations orthodromiques et antidromiques, des potentiels synaptiques antidromiques insensibles aux variations de potentiel membranaire, et résistants à une déplétion en calcium qui est absolument essentiel au fonctionnement de la synapse chimique, mais pas de la synapse électrique. Ils ont ainsi attribué ces potentiels à un couplage électrotonique entre les motoneurones. Par la même approche, Walton & Navarrete (1991) ont montré un couplage électrotonique entre les motoneurones lombaires n'impliquant qu'entre trois et cinq motoneurones du même groupe fonctionnel durant le développement du rat. Ce couplage entre motoneurones a diminué de moitié à la fin de la deuxième semaine postnatale. Chang & Balice-Gordon (2000) rapportent une réapparition des jonctions gap lors de la régénération axonale après axotomie chez l'adulte, supportant un rôle de ces jonctions entre les motoneurones durant le développement. La transmission électrique entre neurones permettrait la génération et la propagation de l'activité spontanée, activité qui présente un patron et qui serait essentielle à la maturation des

circuits neuronaux avant même la complétion des synapses chimiques (Feller, 1999; Hanson & Landmesser, 2003).

Chez les rats embryonnaires de E12 à E18, le tube neural exprime fortement Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45, qui sont principalement localisées sur le soma des neurones (Chang et al., 1999). Les motoneurones spinaux n'expriment plus Cx43 à partir du jour de la naissance, Cx40 disparaît de la moelle épinière à P7 et Cx45 à P14. Une autre étude réalisée chez le rat postnatal mentionne une forte réduction de Cx36 dans la corne ventrale entre P7 et P16 (Belluardo et al., 2000).

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

Tel que mentionné précédemment, ce projet de maîtrise portant sur la transmission électrique par voie de jonctions gap composées de Cx36 dans la moelle épinière s'inscrit dans le cadre de l'étude ontogénique des systèmes moteurs, particulièrement de la locomotion, entreprise chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Nous avons postulé l'existence de la transmission électrique dans la moelle épinière de l'opossum postnatal à cause de sa très grande immaturité comportementale à la naissance qui est observable à l'œil nu ainsi que de la très grande immaturité de sa moelle épinière observée en coupes histologiques et démontrée par une série d'expériences portant sur les motoneurones, la synaptogenèse et la croissance de diverses voies axonales dans les renflements spinaux. Nous allons relater ici ces études en fonction des intérêts propres à la présente recherche sur la transmission électrique.

L'opossum *M. domestica* naît après 14 jours de gestation, mesurant environ 10 mm et pesant environ 100 mg. L'immaturité du nouveau-né peut être constatée sur la

figure 5, alors qu'il est totalement dépourvu de poils, que ses yeux ne sont que des vésicules optiques en formation et que les cavités optiques sont fermées. Les membres antérieurs sont à peine articulés aux niveaux de l'épaule, du coude, du poignet et des doigts et les membres postérieurs sont quant à eux très immatures, n'ayant aucune articulation et étant totalement immobiles (voir Cabana, 2000).

Le décours d'apparition des réflexes a été étudié chez cette espèce (Cassidy et al., 1994). Les réflexes purement spinaux tels le retrait ou l'agrippement apparaissent vers P15, avant ceux dépendant des centres supraspinaux comme le redressement du corps ou le placement visuel. Les réflexes apparaissent selon un gradient rostrocaudal et proximodistal. De plus, les réflexes simples apparaissent avant les réflexes complexes, c'est-à-dire que ceux ne nécessitant qu'une seule articulation apparaissent avant ceux nécessitant toute la ceinture, et ceux nécessitant la coordination entre les ceintures, tel le redressement du corps ou la locomotion, apparaissent en dernier.

La capacité de l'opossum à se mouvoir spontanément a aussi été étudiée (Pflieger et al., 1996). À la naissance (P0), les membres antérieurs présentent une activité rythmique et alternée alors que les membres postérieurs, comme déjà mentionné, sont immobiles. Ce mouvement des membres antérieurs permet au nouveau-né de se hisser sur le ventre de la mère jusqu'à une mamelle où il s'accrochera pendant environ trois semaines, durant lesquelles ils continuent ce mouvement avec graduellement plus de force et que les membres postérieurs commencent à bouger dans la deuxième semaine. Lorsqu'un jeune est détaché de la mère et posé sur une surface avant P10, il ne peut supporter son poids et tombe sur le côté, mais après P10 les membres antérieurs peuvent supporter le poids de l'animal alors que les membres

postérieurs en sont incapables, ce qui résulte en mouvement de pivotement sur l'arrière-train. Vers P20, les membres postérieurs sont capables de supporter le poids du corps et la locomotion quadrupède commence, lentement, pour de courtes périodes et sans bonne coordination entre les membres antérieurs et postérieurs avant environ P30, alors que s'ouvrent les yeux. L'opossum se détache du mamelon aux alentours de P20 mais n'est pas sevré avant P50-P60, quand la locomotion devient mature.

La moelle épinière à la naissance (figure 6) mesure environ 500  $\mu\text{m}$  de diamètre et se caractérise par une grande zone ventriculaire allongée dorsoventralement, une épaisse zone intermédiaire contenant une forte densité de cellules non différenciées et une zone marginale mince. Les motoneurones sont localisés ventrolatéralement et leur taille est légèrement supérieure à celle des autres neurones, ce qui permet leur identification sur les coupes histologiques. Les motoneurones sont probablement tous produits (postmitotiques) à la naissance mais tous n'ont pas acquis leur phénotype cholinergique ni ne sont fragmentés en groupes fonctionnels avant environ la quatrième semaine postnatale (Barthélemy & Cabana, 2005). Le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine est présent dans les membres antérieurs du nouveau-né, mais beaucoup moins dans les membres postérieurs, et il augmente selon des gradients rostrocaudal et proximodistal, suggérant que les axones moteurs croissent dans les muscles dès qu'ils se forment (Barthélemy & Cabana, 2001). Les fibres des motoneurones ne commencent à se myéliniser qu'au cours de la deuxième semaine (Leblond & Cabana, 1997).

Des afférences primaires ont déjà pénétré les régions superficielles de la corne dorsale à la naissance et certaines commencent à s'arboriser dans la corne ventrale à

P7, donc l'innervation sensorielle de la moelle se produit principalement postnatalement (Knott et al., 1999; Kitchener et al., 2006).

Les longues projections propriospinales descendant des segments cervicaux au renflement lombaire se développent surtout postnatalement (Cassidy & Cabana, 1993) de même que les projections ascendantes du renflement lombaire, propriospinales comme supraspinales (voir Cabana, 2000). Des afférences primaires vestibulaires innervent déjà les noyaux vestibulaires et des axones du noyau vestibulaire latéral sont présents dans la moelle dès la naissance, faisant que la voie impliquant l'utricule, le noyau vestibulaire latéral et la moelle cervicale serait fonctionnelle pour contrôler les mouvements des membres antérieurs (Pflieger & Cabana, 1996). Des axones de la formation réticulée médullaire sont aussi présents dans la moelle de l'opossum nouveau-né. Le reste des projections encéphalospinales, soit la majeure partie, se développe postnatalement et il est important de noter que les projections néocorticales arrivent à C1 autour de P22 sans jamais croître plus caudalement ni pénétrer de manière significative la matière grise, attribuant ainsi un rôle indirect du néocortex sur la moelle épinière (Wang et al., 1992; Cabana, 2000).

À la lumière de ce qui vient d'être décrit de la croissance des différentes voies nerveuses dans la moelle, même si l'on peut présumer que les projections propriospinales courtes (intra et intersegmentaires), qui n'ont pas été étudiées, sont de formation plus précoce que les voies plus longues, on ne peut s'étonner qu'à la naissance, il y ait très peu de synapses chimiques dans la matière grise présomptive des renflements, et surtout le renflement lombaire (figure 7). La synaptogenèse, telle qu'étudiée par la démonstration immunohistochimique de protéines synaptiques et en

microscopie électronique, se déroule grandement durant la vie postnatale chez l'opossum et suit des gradients rostrocaudal, ventrodorsal et latéromédian (Gingras & Cabana, 1999; voir aussi Kitchener et al., 2006). Malgré le peu de synapses chimiques dans la matière grise présomptive à la naissance, les neurotransmetteurs acides aminés (GABA, glycine et glutamate) sont présents en faible abondance dans les renflements spinaux du nouveau-né, pour augmenter postnatalement (Soza et al., 2003), et il est à prévoir qu'il en soit de même pour les neurotransmetteurs monoaminergiques (sérotonine, noradrénaline et dopamine) en cours d'étude. La myélinisation, dernière étape de la maturation du système nerveux, commence à P11 dans le renflement cervical et à P14 dans le renflement lombosacré (Lamoureux et al., 2005).

### **1.5 Objectif et hypothèses**

Ainsi, la majeure partie de la formation des systèmes moteurs se déroule postnatalement chez l'opossum *M. domestica*. Les membres antérieurs du nouveau-né, on l'a vu, sont toutefois capables de mouvements rythmiques et alternés, impliquant que malgré l'apparence embryonnaire de la moelle épinière, il existe une communication entre les motoneurones et les interneurones du CPG. Le peu de synapses chimiques dans la matière grise à la naissance nous a amenés à postuler l'existence de couplage électrique entre les neurones spinaux, donc de jonctions gap, ce que nous avons vérifié en démontrant l'expression de Cx36 dans les renflements cervical et lombaire.

Nous supposons que l'expression de Cx36 commence avant la naissance dans la moelle cervicale mais possiblement postnatalement dans la moelle lombaire, vu

l'apparition de la motilité des membres postérieurs seulement dans la deuxième semaine, et qu'elle augmente postnatalement selon un double gradient rostrocaudal et ventrodorsal, soit le gradient général de développement de la moelle épinière. Étant donné que les rats naissent après 20-21 jours de gestation et que l'expression de Cx36 commence à diminuer à P7, nous supposons que l'expression de Cx36 chez *M. domestica*, qui naît après 14-15 jours de gestation, augmente au moins jusqu'à P14 et diminue par la suite. Il est fort probable que l'augmentation continue un peu au-delà de cet âge car le développement des opossums est en général plus lent que celui des rongeurs. Si Cx36 joue un rôle dans la communication nerveuse avant et pendant la synaptogenèse (chimique), on devrait observer une diminution inversement proportionnelle à la progression de la synaptogenèse. Les synapses électriques responsables du couplage électrotonique pourraient alors sous-tendre les premiers rythmes locomoteurs présents à la naissance de l'opossum *M. domestica*.

## 2. Méthodologie

Afin de suivre l'expression de Cx36 au cours du développement de l'opossum *Monodelphis domestica* en relation avec le développement locomoteur, nous avons opté pour une révélation de la protéine par immunohistochimie en épifluorescence dans les renflements cervical et lombaire. Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués selon les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et selon un protocole approuvé par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal.

### 2.1 Dissection et immunohistochimie

Pour cette étude, 47 opossums ont été utilisés (Tableau 1 de l'article). Les animaux entre P0 et P20 ont été profondément anesthésiés au métofan puis rapidement éviscérés et laminectomisés dans du tampon phosphate 50mM salin (NaCl 0.9%) puis fixés par immersion, tandis que les animaux plus âgés que P20 ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de somnotol et perfusés de manière intracardiaque avec du tampon phosphate salin pour évacuer le sang, suivi du fixateur. Initialement 10 animaux d'âges variés ont été fixés avec du paraformaldéhyde 4%, fixateur remplacé par le formaldéhyde 1% et acide picrique 0.2% dilué dans un tampon phosphate 160 mM (pH 7.35). De ces 37 derniers, 13 spécimens ont été fixés pour une durée de 24 à 72 heures avant que ce temps ne soit raccourci à 2 à 4 heures, toujours suivi par une cryoprotection dans du tampon phosphate 25 mM salin additionné de sucrose 10% de 15 à 18 heures (après dissection du névraxe de la carcasse à partir de P20).

Pour marquer rétrogradement les motoneurons de la colonne motrice latérale, 4 opossums (P4, n=2; P14, n=2) ont été utilisés. Après la dissection telle que décrite précédemment, les spécimens ont été placés sur le dos dans un bain de liquide physiologique à concentration de calcium réduite de moitié (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, dextrose 15 mM) et les nerfs des plexus brachiaux de chaque côté du corps ont été dégagés des tissus les recouvrant. Les spécimens ont ensuite été sortis du liquide et asséchés le plus possible au niveau des membres tout en humectant le tissu nerveux. Les nerfs ont été coupés bilatéralement et des cristaux de Texas Red (3,000 MW, Invitrogen) ont été appliqués sur les portions proximales des nerfs du plexus brachial d'un seul côté du corps, l'autre côté servant de contrôle. Après 3-4 minutes nécessaires au bon captage des cristaux par les axones sectionnés, les spécimens ont été remis dans le bain perfusé par du liquide physiologique avec concentration complète de calcium (CaCl<sub>2</sub> 2 mM) et oxygéné (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Le bain a été conservé à l'abri de la lumière pendant 3 à 6 heures, selon l'âge de l'animal, pour permettre le transport du Texas Red. Les spécimens ont été fixés et cryoprotégés tel que décrit précédemment.

Les renflements cervical et lombaire ont été ensuite isolés du reste de la moelle et embloqués dans l'OCT Compound (Miles Scientific), congelés dans un bain de 2-méthylbutane refroidi par de la glace carbonique dissous dans l'éthanol, embloqués et immédiatement coupés transversalement (16 µm) à l'aide d'un cryotome (Leica CM3050S). Les coupes ont été montées sur des lames Superfrost (Fisher) idéales pour le tissu faiblement fixé et pour le traitement immunohistochimique. Les lames ont été traitées avec des anticorps primaires polyclonaux de lapins dirigés contre Cx36 (36-

4600, Zymed, 3 µg/mL) et monoclonaux de souris contre une protéine du noyau neural (Neuronal Nuclei, NeuN; Molecular Probes, 2 µg/mL). Des anticorps secondaires couplés à des fluorophores émettant dans le vert (Alexa Fluor 488) ou le rouge (Cy3) ont ensuite été utilisés pour marquer la localisation des anticorps primaires contre Cx36 et NeuN, respectivement.

## **2.2 Analyse des données**

Le marquage immunohistochimique a été observé grâce à un microscope équipé pour la fluorescence (Nikon Eclipse E600). L'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (absorption maximale 495 nm, émission maximale 643 nm) a été visualisé avec le filtre passe-long B-2A (excitation 450–490 nm, miroir dichroïque 505 nm, émission 520 nm) et celui couplé à Cy3 (absorption maximale 550 nm, émission maximale 570 nm) a été visualisé par le filtre passe-long G-2A (excitation 510–560 nm, miroir dichroïque 575 nm, émission 590 nm). Après observation initiale des lames dans l'axe rostrocaudal de la moelle épinière, trois coupes les plus représentatives ont été choisies pour chaque renflement afin d'être numérisées.

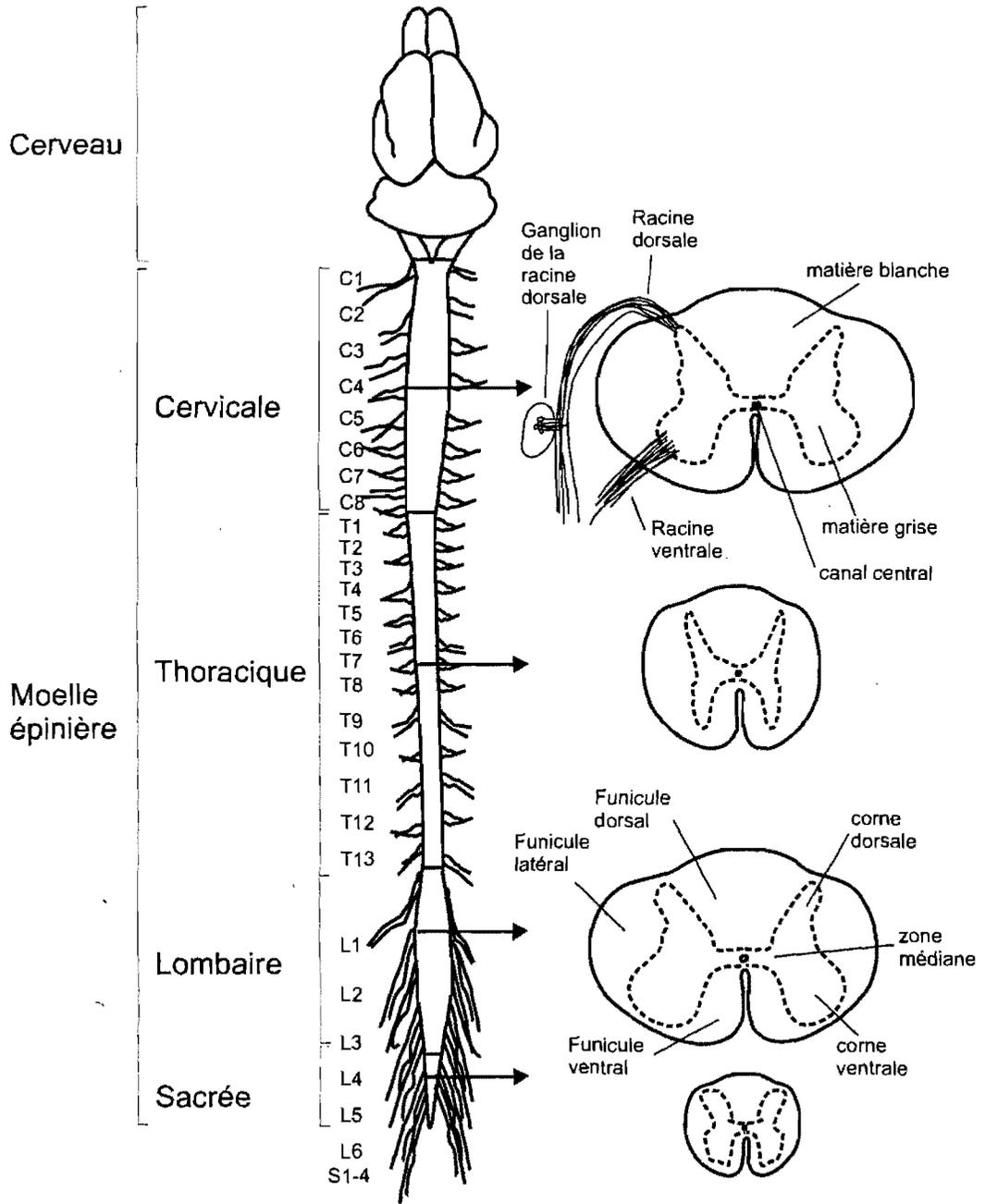
Des microphotographies couleurs (16 bits) à fort grossissement des coupes ont été prises grâce à une caméra numérique (MicroPublisher 3.3 RTV) couplée à un système d'imagerie (ImagePro Plus 5.1) sur ordinateur. Les microphotographies ont été importées dans Corel Photo-Paint (version 12), un logiciel de dessin et de retouche d'image, afin de reconstruire une hémimoelle grossie environ 200 fois, permettant de bien distinguer le marquage de Cx36 qui apparaît sous la forme de puncta dont le diamètre est généralement inférieur à 1 µm. Ceci a pour conséquence que les puncta de

Cx36 n'apparaissent pas sur les microphotographies à faible grossissement si leur densité est faible. Un point noir d'un diamètre de 10 pixels a été apposé sur chaque punctum de Cx36. Les critères permettant d'identifier les puncta comme un marquage de Cx36 sont décrits dans la section méthodologique de l'article. Lorsque tous les puncta de Cx36 ont été représentés à l'aide des points noirs, l'image couleur de l'hémimoelle a été réimportée dans ImagePro et convertie de 16 à 8 bits pour obtenir une figure en tons de gris. À l'aide de trois ajustements maximaux des corrections gammas (opération non linéaire sur la clarté d'une image), l'arrière-plan a été éliminé pour ne laisser que la position des points noirs représentant les puncta de Cx36. Cette nouvelle image a été importée dans CorelDraw (version 12) avec l'image originale en couleur. Après la superposition parfaite de l'image originale sur la nouvelle image par le logiciel, le contour de la moelle ainsi que la position du canal épendymaire ont été tracés. L'image originale a été par la suite éliminée pour obtenir les délimitations de celle-ci sur l'image ne contenant que les puncta de Cx36 schématiques. Ceci permet de visualiser la localisation des puncta de Cx36 dans l'hémimoelle lorsque la taille de la microphotographie est diminuée à l'échelle d'une page de format lettre ou d'un écran d'ordinateur standard.

Afin d'obtenir une représentation robuste de la localisation de Cx36 dans la moelle épinière pour chaque âge étudié, l'opération décrite ci-haut a été effectuée sur les trois coupes jugées les plus représentatives, tel que mentionné, et les trois images obtenues ont été fusionnées en une seule. La délimitation de la matière grise et de la colonne motrice latérale a été obtenue à partir de microphotomicrographies de coupes montrant le marquage pour NeuN.

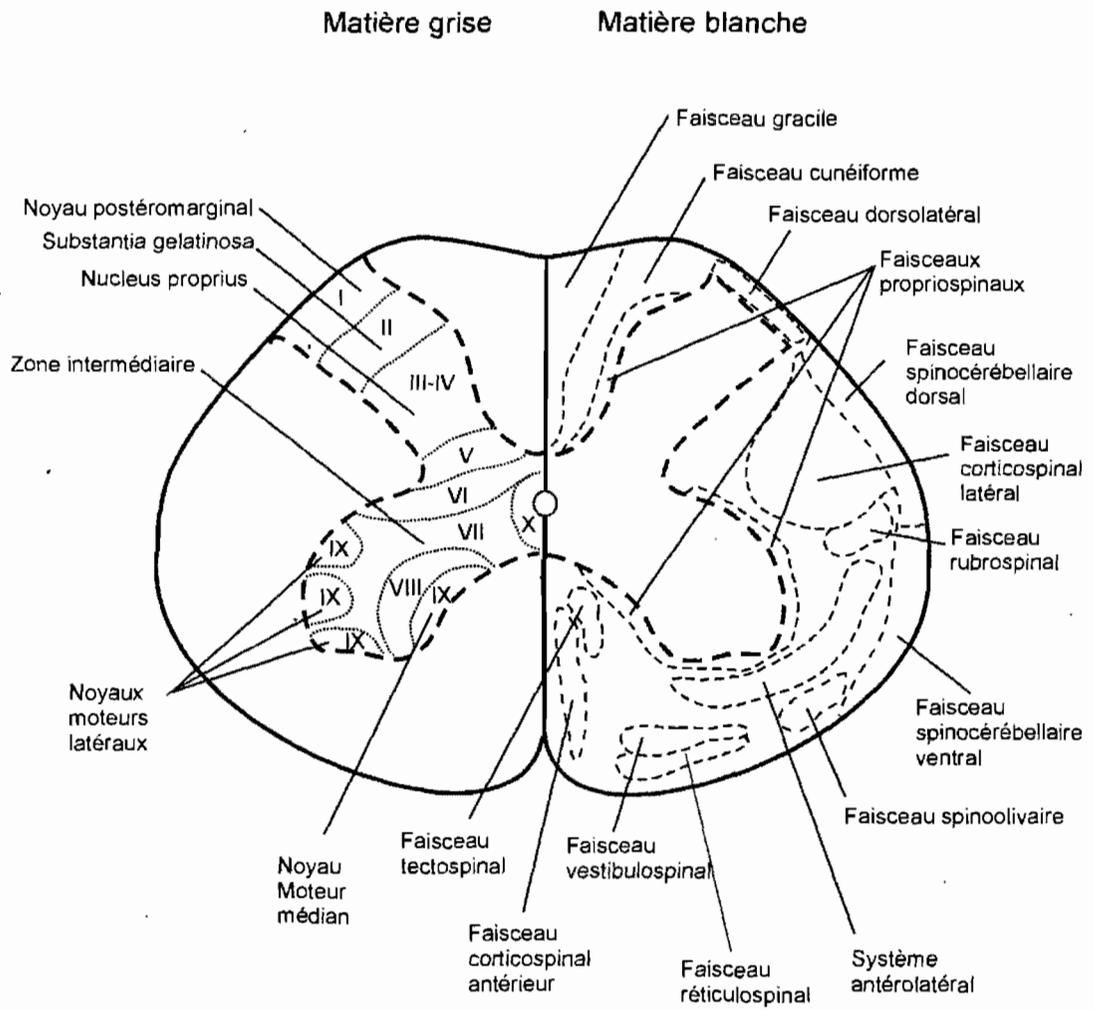
**Figure 1**

Moelle épinière du rat montrant en vue dorsale les niveaux cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés. La colonne de droite présente des coupes transversales à ces différents niveaux. Le schéma indique la position de la matière grise, de la matière blanche, du canal central, des racines ventrale et dorsale ainsi qu'un ganglion de la racine dorsale. La position des funicules dorsal, latéral et ventral de la matière blanche, des cornes dorsale et ventral et de la zone médiane de la matière grise est indiquée sur la moelle épinière lombaire en coupe transversale. Modifié de Zeman & Innes (1963)



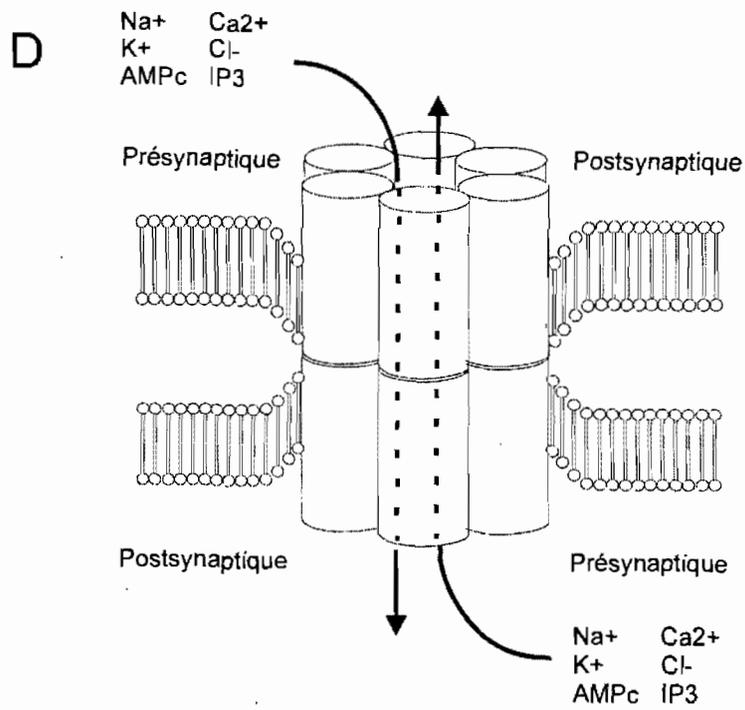
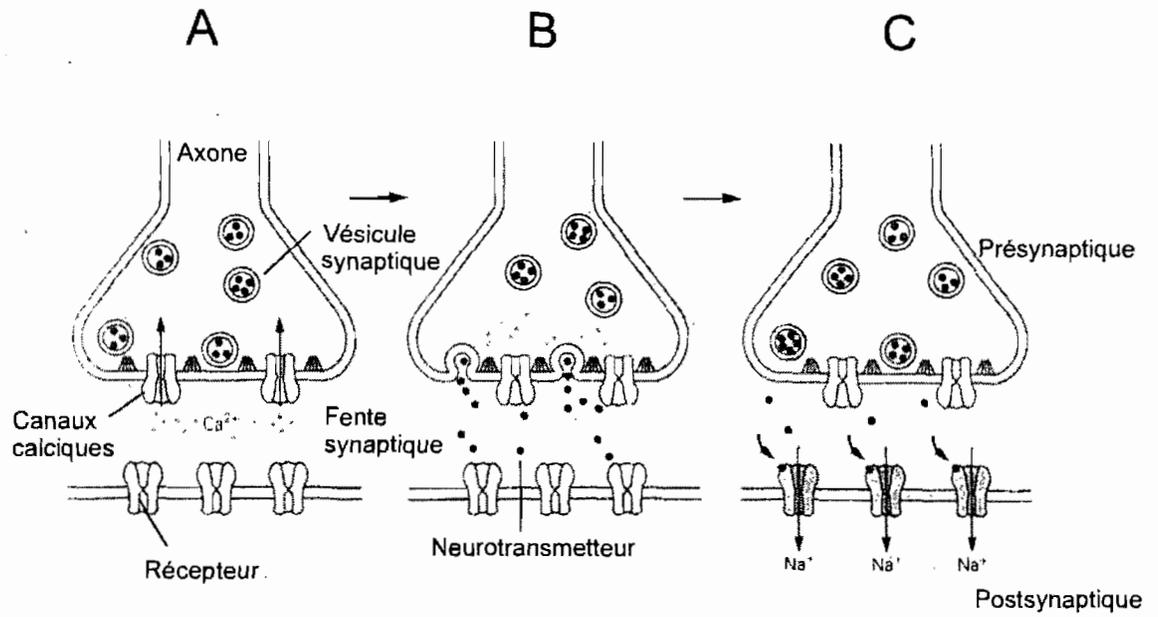
**Figure 2**

Anatomie de la moelle épinière humaine en coupe transversale. Les régions de la matière grise et les laminae de Rexed correspondantes, sont représentées à gauche, et les faisceaux de la matière blanche à droite. Modifié de Haines (1991).



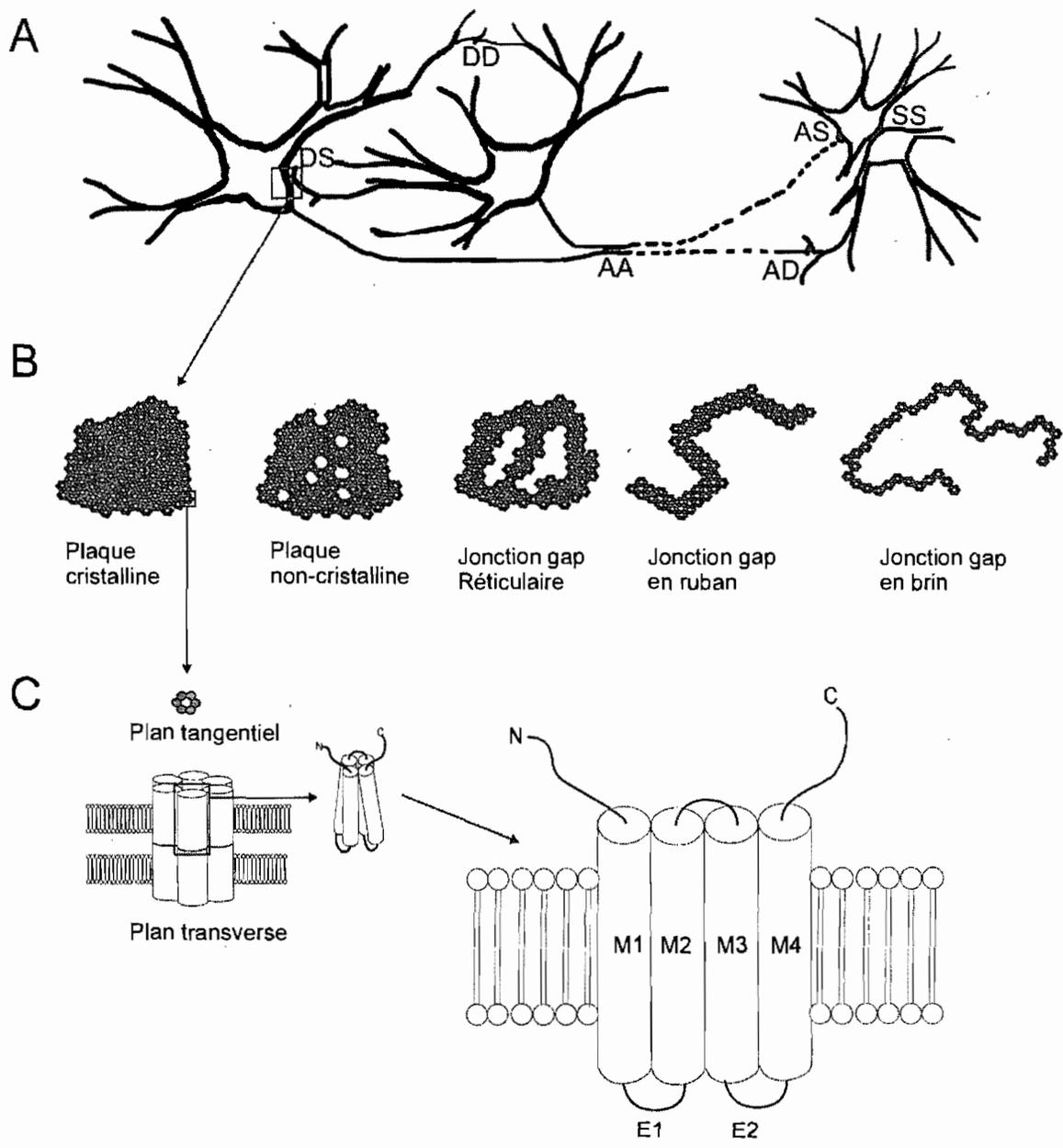
**Figure 3**

Structures de la synapse chimique (A-C) et d'un canal jonctionnel d'une jonction gap (substrat anatomique de la synapse électrique, D). Dans la synapse chimique, un potentiel d'action ouvre les canaux calciques à la zone active (A) qui permet la fusion des vésicules synaptiques et la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (B). Ces neurotransmetteurs se lient à des récepteurs spécifiques qui ouvrent les canaux ioniques sur la membrane postsynaptique (C). Une jonction gap est formée par un ensemble de canaux, chacun étant formé par l'assemblage de deux connexons à travers lesquels circulent les ions et métabolites directement entre les deux cellules ainsi connectées. Plusieurs jonctions gap forment une synapse électrique (D). A-C, modifiés de Kandel & Siegelbaum (2000); D, modifié de Kumar & Gilula (1996).



**Figure 4**

A) Localisation des synapses électriques entre neurones: dendrodendritique (DD), dendrosomatique (DS), axoaxonique (AA), axodendritique (AD), axosomatique (AS) et somasomatique (SS). B) Les 5 types d'organisation ultrastructurale des jonctions gap en vue tangentielle de la membrane, chaque petit cercle représente un connexon. C) Structure d'une connexine, protéine formant les jonctions gap. B, modifié de Kamasawa et al. (2006); C, modifié de Kumar & Gilula (1996).



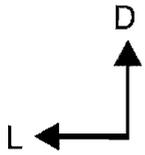
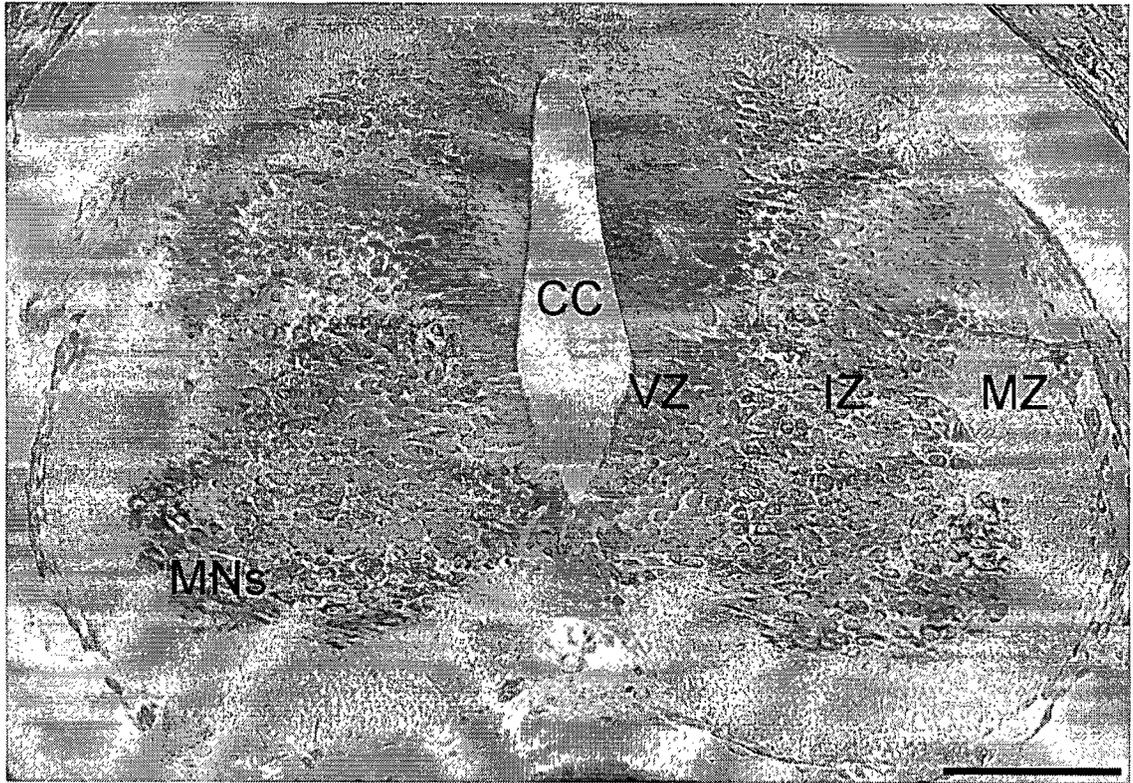
**Figure 5**

Opossum de l'espèce *Monodelphis domestica* à la naissance.



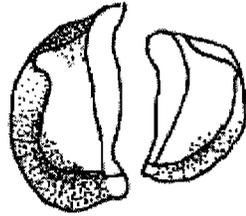
**Figure 6**

Coupe histologique colorée au Nissl de la moelle épinière au niveau cervical chez l'opossum *Monodelphis domestica* à la naissance. CC, canal central (ou épendymaire); VZ, zone ventriculaire; IZ, zone intermédiaire; MZ, zone marginale; MNs, motoneurones. D : dorsal; L : latéral. Échelle, 100 µm.

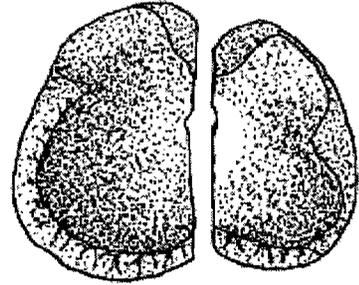


**Figure 7**

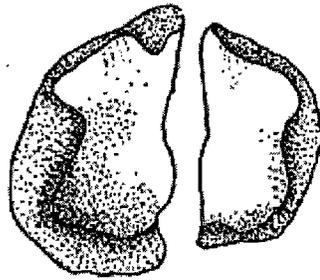
Développement des synapses chimiques tel que révélé par le marquage immunohistochimique de la synaptophysine, dans les renflements cervical (C) et lombaire (L) chez l'opossum *Monodelphis domestica* à différents âges postnataux (P) et chez l'adulte (Ad). Échelle, 200  $\mu\text{m}$ . Modifié de Gingras & Cabana (1999).



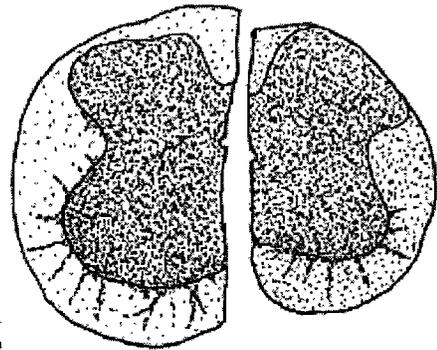
P1



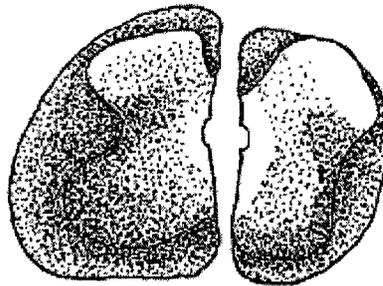
P18



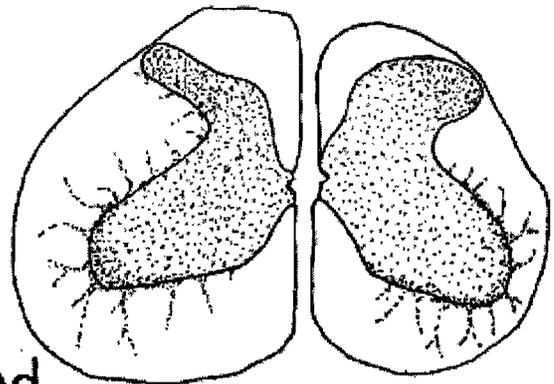
P7



P35



P10



— Ad

### **3. Article scientifique produit au cours de ce travail**

Maxime Lemieux, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger. Postnatal development of the neuronal gap junction protein connexin36 in the spinal cord of opossums, *Monodelphis domestica*.

Article en préparation. À soumettre à Journal of Comparative Neurology.

Postnatal development of the neuronal gap junction protein Connexin36  
in the spinal cord of opossums, *Monodelphis domestica*

Maxime Lemieux, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger

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

Running head: Development of Cx36 in spinal cord of opossums

Associate editor (Developmental Neurobiology): **John L. R. Rubenstein**

Key words: Electrical synapses, Locomotion, Motoneurons, Motor development

Corresponding author:

Jean-François Pflieger

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

Phone: [information retirée / information withdrawn]

Fax: [information retirée /  
information withdrawn]

Grant sponsors: CFI 10442, NSERC 31205, NSERC 3595

## Abstract

We use opossums *Monodelphis domestica* as a model to study the development of mammalian motor systems. The forelimbs of newborn opossums perform rhythmic and alternate movements that are likely under spinal control, and the hindlimbs only start moving in the second week. In view of the scant chemical synapses in the spinal enlargements of neonatal opossums, we hypothesize that electrical synapses (gap junctions) could mediate the neuronal communication responsible for the first limb movements. We have investigated by immunohistochemistry the presence of the neuronal gap junction protein Connexin36 (Cx36) in the spinal cord enlargements of postnatal opossums. At birth, Cx36 immunoreactivity is moderate in the intermediate zone (presumptive gray matter) in both enlargements. Thereafter, Cx36 expression gradually decreases in the ventral horn, but increases dorsally up to a high level between P10 and P20 in both enlargements. In the ventral horn, Cx36 puncta are associated with ventral interneurons or on dendrites of motoneurons rather than on their somas. Immunoreactivity for Cx36 is barely detectable in the dorsal horn by P30. Cx36 immunoreactivity is detected in the marginal zone (presumptive white matter) at birth, but decreases thereafter, except for the dorsal part of the lateral funiculi where it is very high between P10 and P20, before it vanishes by P30. The presence of the neuronal gap junction protein Cx36 in the spinal enlargements of neonatal opossums suggests the existence of electrical synapses, which could control early limb movements. Its postnatal decrease parallels the increase in chemical synapses and the maturation of limb movements.

## Introduction

Few mammals are as immature at birth as are opossums of the species *Monodelphis domestica*, explaining the use of this species for developmental studies, notably of motor systems. The forelimbs of the newborn perform rhythmic and alternate swim-like movements of low amplitude to climb from the birth canal to a nipple, where it attaches. The pup remains thus attached while the forelimbs develop, as well as the hindlimbs that begin to move only during the second week (Cassidy et al., 1994). Tract tracing experiments have shown that, except for some projections from the medullary reticular formation (Wang et al., 1992) and lateral vestibular nucleus (Pflieger & Cabana, 1996), the spinal cord of neonatal opossums is virtually devoid of projections from the brain (reviewed in Cabana, 2000) as well as primary afferents (Knott et al., 1999; Kitchener et al., 2006). These findings suggest that the initial limb movements are mostly spinal in origin, the expression of the central pattern generator (Grillner and Zangger, 1975). However, the light microscopic immunolabeling demonstration of pre- and postsynaptic proteins as well as observations in electron microscopy have evidenced very few chemical synapses in the presumptive gray matter of the spinal enlargements, especially in the lumbar enlargement, of neonatal opossums (Gingras & Cabana, 1999). Could electrical coupling be present in the spinal enlargements of postnatal opossums and mediate neuronal communication responsible for the initial limb movements? Electrical coupling has been shown between motoneurons or interneurons in the cord of neonatal rodents (Fulton et al., 1980; Walton & Navarrete, 1991; Chang et al., 1999, Personius & Balice-Gordon, 2001; Hinckley & Ziskind-Conhaim, 2006).

Electrical synapses are structurally formed by gap junctions, a cluster of hemichannels or connexons formed by the association of six proteins called connexins (Cx). Among connexin genes, Cx36 is reported to be expressed exclusively by neurons in the central nervous system and is mainly found in the olfactory bulb, retina, hippocampus and inferior olive (Condorelli et al., 1998), but also in the spinal cord (Chang et al., 1999; Rash et al., 2000; Marina et al., 2008; Yates et al., 2008). We have thus sought to evidence Cx36 in the spinal cord enlargements of postnatal opossums *Monodelphis domestica*, as an indicator of electrical synapses and to compare its expression with chemical synaptogenesis and other events of neural development in parallel with the development of locomotor behaviors.

## **Materials and method**

The research reported herein was performed under the guidelines of the NIH and the Canadian Council on Animal Care using protocols approved by the University Ethics Committee. Gray, short-tailed opossums *Monodelphis domestica* were obtained from a colony maintained according to Fadem *et al.* (1982) and Kraus and Fadem (1987) (for further details, see Cassidy *et al.*, 1994). P0 is defined as the day of birth.

### **Tissue preparation**

After preliminary experiments using different fixation protocols (Table 1), Cx36 was evidenced by immunolabeling in a total of 24 opossums from P0 to P52 plus two adults. Animals younger than P20 were deeply anesthetized by Metofane inhalation, beheaded, eviscerated and laminectomized in 100 mM Phosphate Buffer

0.9% NaCl (PBS) before being immersed in 1% formaldehyde and 0.2% picric acid in 160 mM PBS for 2 to 4 h and then cryoprotected in 10% sucrose in 25 mM PBS overnight at 4°C. Opossums older than P20 were administered an overdose of somnotol before being perfused transcardially with 100 mM PBS, followed by the aforementioned fixative and then the sucrose solution. The spinal cords of all specimens were dissected out and kept in the sucrose solution for one to two days at 4°C. The cervical and lumbar enlargements were cut and embedded separately in Tissue-Tek OCT Compound (Miles Scientific) solidified in a 2-methylbutane bath frozen in carbon ice-ethanol. Sections were made at 16  $\mu\text{m}$  on a cryostat (CM3050S Leica) and mounted onto Superfrost slides (Fisher).

### **Immunolabeling**

The mounted sections were washed 20 min at room temperature in TBST (50 mM Tris buffer with 1.5% NaCl and 0.3% Triton X-100, pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-Cx36 antibody (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 36-4600, Zymed) either alone or in conjunction with a mouse monoclonal anti-Neuronal Nucleus protein antibody (NeuN, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Chemicon International), which served to label neurons. Both antibodies were diluted in TBST with 3% BSA and 10% NGS. The sections were then washed three times with TBST and incubed 1.5 h at room temperature in TBST with 3% BSA and 10% NGS containing a goat anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa-Fluor488 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Invitrogen) to label Cx36 in green and, in some cases, goat anti-mouse coupled to Cy3 (1.875  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Jackson ImmunoResearch) to label NeuN in red. The slides were then washed once in TBST

and twice in 50 mM Tris buffer, and coverslipped using Fluoromount (SouthernBiotech) as mounting medium. Since the retina of mammals is known to strongly express Cx36 (Belluardo et al., 2000), sections from the retina of a P52 opossum were also mounted on the same slides as the spinal cord sections and served as positive control for the Cx36 antibody (Fig 1A, B). As negative controls, some spinal and retinal sections were processed as described, except that the primary Cx36 antibody was omitted.

### **Texas Red (TR) retrograde labeling**

Retrograde labeling with Texas Red was used in 4 opossums (2x P4, 2x P14) to identify more specifically the motoneurons innervating the forelimbs. These animals were dissected as described above and the preparations placed in baths containing the following physiological solution but with half the normal concentration of  $\text{CaCl}_2$ : NaCl 125 mM, KCl 3 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, dextrose 15 mM, oxygenated with 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ; pH 7.4. The nerves of the brachial plexus on each side were isolated and the specimens were retrieved from the physiological solution to allow drying of the brachial plexus while the spinal cords were kept wet. The nerves were cut bilaterally and Texas Red crystals (3,000 MW, Invitrogen) were applied on the stumps on one side, the other side serving as control. After 3-4 minutes to allow capture of the crystals by the cut axons, the specimens were placed back in the oxygenated physiological solution. The baths were kept in the dark for 3-6 h, depending on the age of the animals, to allow transport of the tracer. The

specimens were immersed in the fixative and processed as described above for Cx36 immunohistochemistry, without NeuN labeling.

### **Analysis**

The slides were observed on a microscope equipped for epifluorescence (Nikon Eclipse E600). Cx36 labeling was observed with a FITC filter (B-2A; Ex 450–490 nm, DM 505 nm, Em 520 nm (LP)) and NeuN labeling with a Rhodamine fluorescence filter (G-2A; Ex 510–560 nm, DM 575 nm, Em 590 nm (LP)). Microphotographs were taken with a digital camera (MicroPublisher 3.3 RTV) linked to an image analysis software (Image-Pro AMS v5.1.1.38) running on a PC. Microphotographies were taken at high magnification, either at 40X or 63X in oil immersion, while for mapping Cx36 on spinal sections (Figure 1C), 20X magnification microphotographs of hemisections were digitalized. Each section was then reconstructed in Corel Photo-Paint (v. 12) and a dot was plotted on every Cx36 positive punctum, the size ranging from 0.4 to 1.6  $\mu\text{m}$ . The background was removed in ImagePro by three successive maximal enhancing of gammas which left only the dots representing the location of Cx36 puncta (Fig 1D). Three sections of an enlargement were merged in Corel PhotoPaint to make more visible the Cx36 labeling. Boundaries between presumptive white and gray matter, easily demarcated with NeuN labeling, and around somatomotor columns were drawn on the final image from NeuN-labeled sections (Figure 1E).

## **Results**

### **Controls**

Figure 1A presents a microphotograph of the retina of a P52 opossum showing intense labeling for Cx36 in the inner and outer plexiform layers, as can be expected from what has been reported in rodents by Kamasawa et al. (2006) and Figure 1B shows the absence of Cx labeling on an adjacent section of the same retina processed, together with spinal sections (not shown), without the Cx36 primary antibody.

### **Postnatal expression of Cx36 in the spinal cord**

The spinal cord of a newborn (P0) opossum is characterized by a thick ventricular zone (VZ), an intermediate zone (IZ) of densely packed small and undifferentiated cells, and a thin marginal zone (MZ), illustrated schematically in Figure 2. The large central canal is elongated dorsoventrally. Motoneurons are recognized by their position in the ventral horn and their larger size compared to other neurons. The lumbar enlargement is more immature than the cervical enlargement. Cx36 immunoreactivity is present in the spinal cord of newborn opossums. However, as is evident by looking at Figure 1C showing two magnifications of the newborn cervical cord, it is very difficult to detect the labeling, which does not stand out on microphotographs. Nonetheless it can be represented on plots obtained from observations at high magnification (Fig. 1D) and the location of the Cx36 puncta can be even better appreciated when the borders between the spinal zones are visualized on the sections processed for NeuN (Fig. 1E).

Figure 2 shows plots of Cx36 labeling on drawings of hemisections of the cervical (left half) and lumbar (right half) enlargements of opossums at increasing postnatal ages. In newborn, Cx36 labeling is seen in all three zones around the central canal in both enlargements. Scant in the ventricular zone, it is denser in the intermediate zone (presumptive gray matter), where it occurs in most regions but with a higher density in the ventral horn, especially in the areas of motoneurons. Furthermore, a high density spot in the ventromedialmost area just beneath the ventricular zone is observed in both enlargements. The intermediate portion of the presumptive gray matter, especially in its medial part, displays sparser Cx36 labeling. In the cervical enlargement the density of the Cx36 punctate labeling in the dorsal horn compares to that observed in the ventral horn, which is not the case in the more immature lumbar cord, where the dorsal ventricular zone is thicker and the intermediate zone in the process of formation. Cx36 labeling is also present in the marginal zone (presumptive white matter), being more abundant in the lumbar enlargement than in the cervical one, in which distribution is more heterogeneous.

At P4 and P5 (Fig. 2), the ventricular zone has decreased in thickness, but Cx36 labeling can still be seen within it. Except for the densely labeled ventromedialmost area, labeling has decreased in the ventral horn of the cervical enlargement, including the region of motoneurons (photographed in Fig. 3A), but has slightly increased in the intermediate gray and more so in the dorsal horn. The same modifications holds true for the lumbar enlargement at these ages, except that the decrease of Cx36 labeling in the ventral horn and its increase in the dorsal horn are less marked than in the cervical

enlargement. In the marginal zone immunolabeling has decreased but for the dorsal dorsolateral part of the cervical enlargement where it is relatively dense.

At the next age examined, P10 (Fig. 2), neurons within the presumptive gray matter are better differentiated than previously and the presumptive white matter is thicker. The diameter of the central canal as well as the surrounding epithelium are reduced. Cx36 labeling in the latter has disappeared in the cervical enlargement but is still observed in the lumbar one. In both spinal enlargements, a further increase in Cx36 immunolabeling has occurred in the superficial dorsal part (photographed in Fig. 3B for the cervical enlargement) whereas a decrease deeper in the dorsal part and in the ventral horn is noted. Cx36 immunoreactivity is strong in the dorsal part of the lateral funiculus of both enlargements, and scant in the rest of the presumptive white matter.

Cx36 labeling in P14 or P15 opossums does not differ significantly from what has been described at P10 and is therefore not represented on Figure 2. At P18, but especially at P20 (Fig. 2), Cx36 labeling remains robust in the superficial dorsal horn and the dorsal part of the lateral funiculus, but has disappeared from the ventricular zone and further decreased everywhere else. By P30 (Fig. 2), the next age investigated, it has greatly diminished in all of the gray and white matter in both enlargements, but especially in the cervical enlargement. The last developmental age examined, P52 (not shown), as well as the adult animals revealed very few Cx36 puncta in the ventral horn (Fig. 3C) and labeling has completely disappeared from the dorsal horn (Fig 3D) and the presumptive white matter.

### **Cx36 labeling in relation to identified motoneurons**

Motoneurons within the lateral motor column of the cervical enlargement retrogradely labeled with Texas Red are shown in Figure 4A for a P4 opossum. It can be seen how, at that age, the motoneurons are densely packed and difficult to distinguish individually. Few Cx36 puncta are observed on motoneuronal dendrites (Fig. 4B) and even less on somas. Cx36 labeling rather appears in the presumptive intermediate zone where interneurons are located. At P14 (Fig 4C, D), no Cx36 puncta are observed in the vicinity of Texas Red labeled motoneuronal somas and dendrites

### **Discussion**

The immunohistochemical demonstration of Cx36, a protein constituting gap junctions specific to neurons, has allowed us to evidence its presence in the spinal cord enlargements of postnatal opossums. Cx36 is present in moderate amount in all areas of the immature cord in newborn animals. It decreases gradually in the ventral horn during the first four weeks whereas it increases in the dorsal horn, particularly in its superficial part, and the dorsal part of the lateral funiculus, to disappear afterwards altogether. The lumbar enlargement lags the cervical ones.

The presence of Cx36 in the ventral horn of the cervical cord of newborn and young postnatal opossums at a time when chemical synapses are scant (Gingras & Cabana, 1999) suggests a role for electrical coupling of neurons in the control of the forelimb movements performed by neonatal opossums. This conclusion is further supported by the time course of both events: the decrease of Cx36 in the ventral horn during the first four postnatal weeks is paralleled by a significant increase in three

synaptic proteins and synaptic profiles in electron microscopy during the same period (Gingras & Cabana, 1999). Opossums remain firmly attached to their mother's nipples for three weeks and it is only at three weeks of age that the young starts detaching from the mother and locomoting for short periods (Pflieger et al., 1996).

The neuronal gap junction protein Cx36 is distributed throughout the ventral horn, in the vicinity of motoneurons but equally at the location of presumptive interneurons of the CPG. Because neurons are small, undifferentiated and tightly packed at birth, Cx36 puncta in the region of motoneurons are possibly established as somasomatic electrical synapses. As motoneurons increase in size and differentiate, moving apart from one another (see Barthélemy & Cabana, 2005), the incidence of Cx36 puncta decreases. As soon as P4, the number Cx36 puncta seen around motoneurons positioned laterally starts decreasing and are very scant at P14. Although Cx36 expression within lateral motor column was not studied in detail at P20, when the opossum detaches from the nipple and is able to walk on short distance (Pflieger et al., 1996), the overall Cx36 expression in the ventral horn is low. It then appears that electrical coupling, at least the one mediated by Cx36, is downregulated as locomotor behaviors become more mature.

The coupling of neurons via gap junctions in the spinal cord of mammals has been documented for motoneurons (Fulton et al., 1980; Walton & Navarrete, 1991; Chang et al., 1999) also for associated interneurons (Hanson & Landmesser, 2003; Hinckley & Zisking-Conhaim, 2006). However, to our knowledge, electrical coupling in the dorsal horn and has not documented.

The expression of Cx36 in *M. domestica* is temporally correlated with the development of primary afferents in the superficial dorsal horn (Kitchener et al., 2006). Cx36 expression increases at P5 in the lateralmost part of the superficial dorsal horn, as growth cones of dorsal root ganglia fibers arrive. At P10, Cx36 expression is high in the superficial dorsal horn and remains stable until at least P20, when this region is clearly innervated by primary afferents (Kitchener et al., 2006) and chemical synaptogenesis has begun (Gingras & Cabana, 1999). Cx36 expression decreases afterwards and is barely detected in the superficial dorsal horn at P30.

The coupling of dorsal horn neurons could dissipate any sensorial inputs that would promote movement, thus inhibiting withdrawal reflexes. This hypothesis is supported by the fact that it is around the time of Cx36 decrease in the dorsal horn that hopping reflexes can be elicited (Cassidy et al., 1994). Because opossums remain attached to their mother until at least P20, inhibiting reflex movements could prevent the young from detaching themselves at a time when they do not have the behavioral capabilities to locomote and survive. Likewise, electrical coupling of dorsal horn neurons could play a role in establishing somatotopy in the ascending sensory pathway, such having been reported for the retina where Cx36 is highly expressed and was shown to synchronize calcium waves of ganglion cells (Hansen et al., 2005), a mechanism considered essential in establishing retinotopy (Feller, 1999).

The intense Cx36 labeling we observed in the dorsal part of the lateral funiculus is probably representative of axoaxonic electrical coupling. This area contains the rubrospinal tract and the Cx36 labeling of it appears at the time that rubrospinal axons grow into the spinal cord (Wang et al., 1992). Such axoaxonic coupling could play a

transient role in the fasciculation of growing axons, but the reason it is restricted to the rubrospinal tract is unclear. This labeling disappears when myelin forms therein (Lamoureux et al., 2005). Myelin probably prevents electrical coupling between axons, and oligodendrocytes do not express Cx36 (Rash et al., 2000).

As mentioned, the expression of Cx36 in the spinal enlargements of opossums follows the reverse temporal pattern of chemical synaptogenesis. The transition from a network driven by electrical transmission to one driven by chemical synapses is probably intrinsically regulated. Studies have shown a link between chemical synaptogenesis and the regulation of electrical coupling (Mentis et al., 2002; Szabo et al., 2004; Arumugam et al., 2005). Further work is necessary to clarify the contribution of electrical synapses to early spinal networks in the opossums *Monodelphis domestica*, notably in the superficial dorsal horn where Cx36 is (transiently) the densest, and their relationship with the development of chemical transmission, such as neurotransmitters, and neuromodulators and their receptors.

### **Other Acknowledgments**

This work was performed by M.L. in partial fulfillment of the requirements for MSc degree at the Université de Montréal. The authors wish to thank Dr. J.I. Nagy at the University of Manitoba for his gift of Cx36 antibodies and his helpful advice on the protocol.

## References

- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB. 2005. NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. *Nat Neurosci* 8(12):1720-1726.
- Barthelemy D, Cabana T. 2005. Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: Immunohistochemical localization of acetylcholine. *SO - Dev Brain Res* 155(2) MAR 31 05 87-98.
- Belluardo N, Mudo G, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, Condorelli DF. 2000. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 865(1):121-138.
- Cabana T. 2000. The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53(5):615-626.
- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. 1994. The development of sensorimotor reflexes in the brazilian opossum *monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 43(4-5):244-253.
- Chang Q, Balice-Gordon RJ. 2000. Gap junctional communication among developing and injured motor neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):242-249.
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. 1999. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* 19(24):10813-10828.
- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F. 1998. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10(3):1202-1208.
- Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, VandeBerg JL, Hayssen V. 1982. Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory animal science* 32(4):405-409.
- Feller MB. 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22(4):653-656.
- Fulton BP, Miledi R, Takahashi T. 1980. Electrical synapses between motoneurons in the spinal cord of the newborn rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 208(1170):115-120.

- Gingras J, Cabana T. 1999. Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *SO - J Comp Neurol* 414(4) Nov 29, 1999 551-560.
- Grillner S, Zangger P. 1975. How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Res* 88(2):367-371.
- Hansen KA, Torborg CL, Elstrott J, Feller MB. 2005. Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina. *J Comp Neurol* 493(2):309-320.
- Hanson MG, Landmesser LT. 2003. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23(2):587-600.
- Hinckley CA, Ziskind-Conhaim L. 2006. Electrical coupling between locomotor-related excitatory interneurons in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 26(33):8477-8483.
- Kamasawa N, Furman CS, Davidson KGV, Sampson JA, Magnie AR, Gebhardt BR, Kamasawa M, Yasumura T, Zumbrennen JR, Pickard GE, Nagy JI, Rash JE. 2006. Abundance and ultrastructural diversity of neuronal gap junctions in the OFF and ON sublaminae of the inner plexiform layer of rat and mouse retina. *Neurosci* 142(4):1093-1117.
- 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(4):423-436.
- Kraus DB, Fadem BH. 1987. Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory animal science* 37(4):478-482.
- 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(3) 2005 143-156.

- Marina N, Becker DL, Gilbey MP. 2008. Immunohistochemical detection of connexin36 in sympathetic preganglionic and somatic motoneurons in the adult rat. *Auton Neurosci* 139(1-2):15-23.
- Mentis GZ, Diaz E, Moran LB, Navarrete R. 2002. Increased incidence of gap junctional coupling between spinal motoneurons following transient blockade of NMDA receptors in neonatal rats. *J Physiol (Lond)* 544(Pt 3):757-764.
- Personius KE, Balice-Gordon RJ. 2001. Loss of correlated motor neuron activity during synaptic competition at developing neuromuscular synapses. *Neuron* 31(3):395-408.
- Pfieger JF, Cassidy G, Cabana T. 1996. Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum *Monodelphis domestica*. *Behav Brain Res* 80(1-2) 1996 137-143.
- Pfliederer J-F, Cabana T. 1996. The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat Embryol* 194(1) 1996 75-88.
- Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JJ. 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7573-7578.
- Szabo TM, Faber DS, Zoran MJ. 2004. Transient electrical coupling delays the onset of chemical neurotransmission at developing synapses. *J Neurosci* 24(1):112-120.
- Walton KD, Navarrete R. 1991. Postnatal changes in motoneuron electrotonic coupling studied in the in vitro rat lumbar spinal cord. *J Physiol (Lond)* 433:283-305.
- 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 Brain Res* 68(2):203-216.
- Yates C, Charlesworth A, Allen SR, Reese NB, Skinner RD, Garcia-Rill E. 2008. The onset of hyperreflexia in the rat following complete spinal cord transection. *Spinal cord*.

Table 1 Number of opossums used at different ages and for different fixation protocols

Ages	Fixative		
	4% PFA 24-72 hrs	0.2% Picric acid 1% FA 24-72hrs	0.2% Picric acid 1% FA <4 hrs
P0	3	0	2
P4	0	0	2
P5	0	3	4
P10	2	0	3
P12	1	0	0
P14	0	2	2
P15	2	2	2
P18	0	1	2
P19	0	3	0
P20	0	0	2
P30	1	0	2
P39	1	0	0
P52	0	0	1
Adult	0	0	2
Total	10	13	24

**Figure 1: Controls and Cx36 Mapping.** A, B: Photomicrographs of adjacent sections of the retina of a P52 opossum showing Cx36 labeling in inner and outer plexiform layers (A) and its absence when the primary antibodies are omitted (B). C, D, E: sections from the cervical spinal cord of a P1 opossum labeled for Cx36 (C) or NeuN to delineate the presumptive gray and white matter and the lateral motor column (E, right). Hemisections of the spinal cord are reconstructed from low magnification (20x) microphotographs (C, left) and 10 pixels dots are plotted on recognizable Cx36 puncta (not shown). Once the puncta of Cx36 labeling have been plotted, the image is processed to remove the background (D). Three adjacent sections are merged to obtain to better illustrate the labeling (E, left). The central canal and ventricular zone are delineated in E. IPL: inner plexiform layer, OPL: outer plexiform layer. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

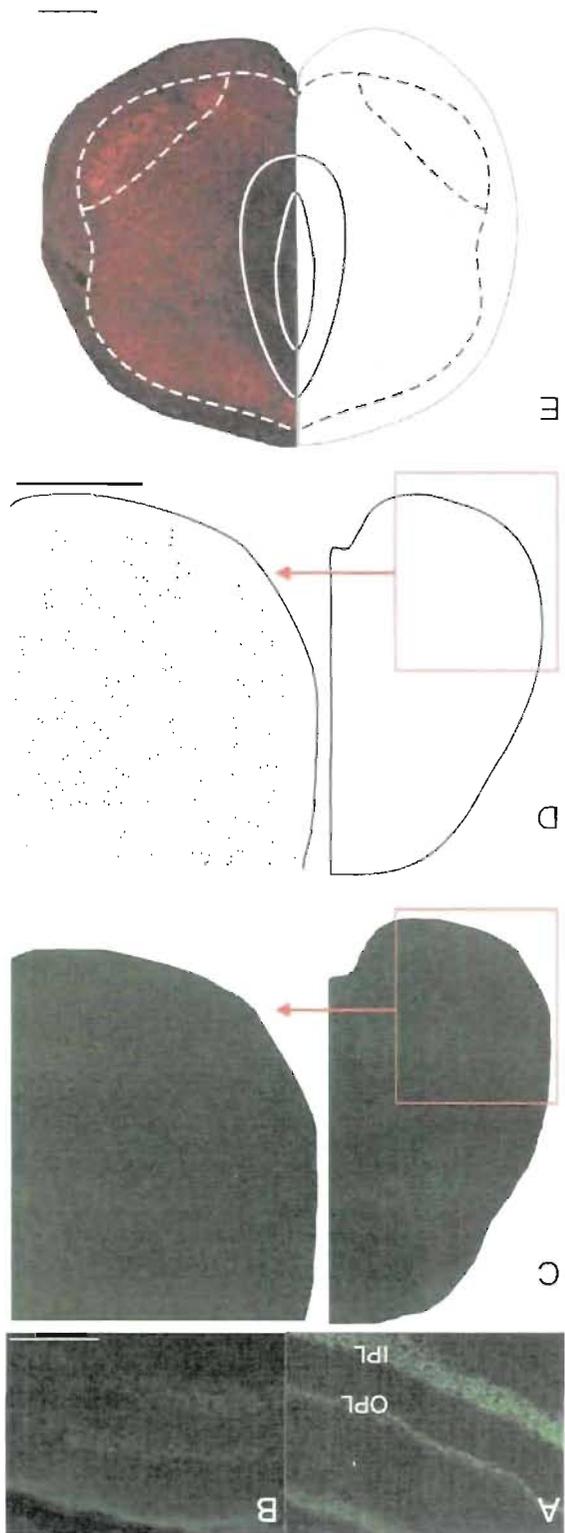
**Figure 2: Plots of Connexin36 labeling in the spinal cervical (left half) and lumbar (right half) enlargements in opossums aged P0 to P30.** Each hemisection represents the labeling of three adjacent sections. Dashed lines represent borders of presumptive gray matter and lateral motor column. Cc: central canal, VZ: ventricular zone; IZ: intermediary zone Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

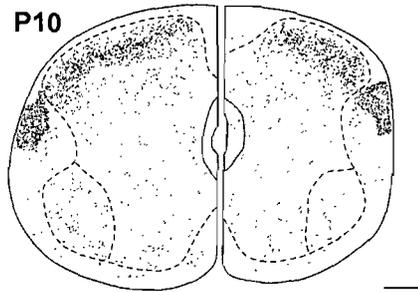
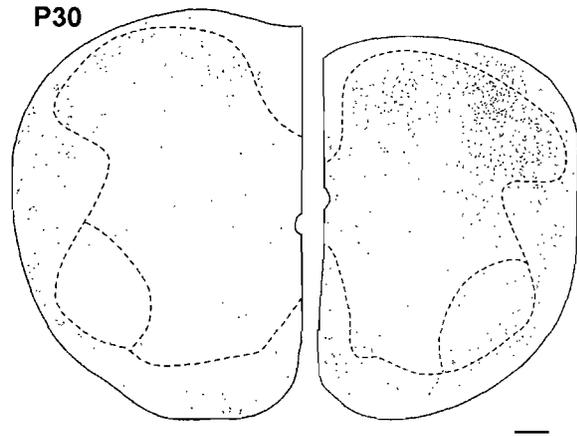
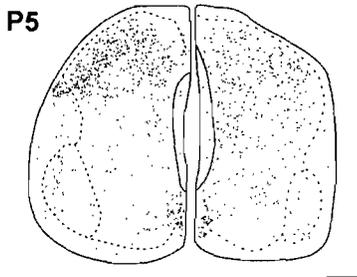
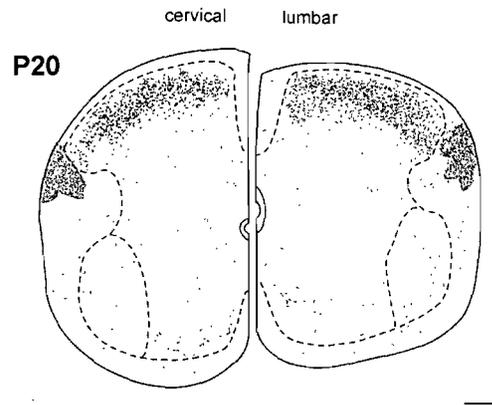
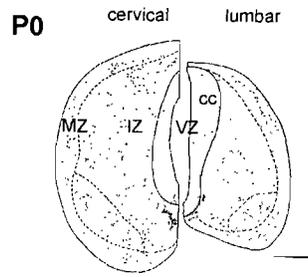
**Figure 2: Photomicrographs of Cx36 labeling in the cervical enlargement.**

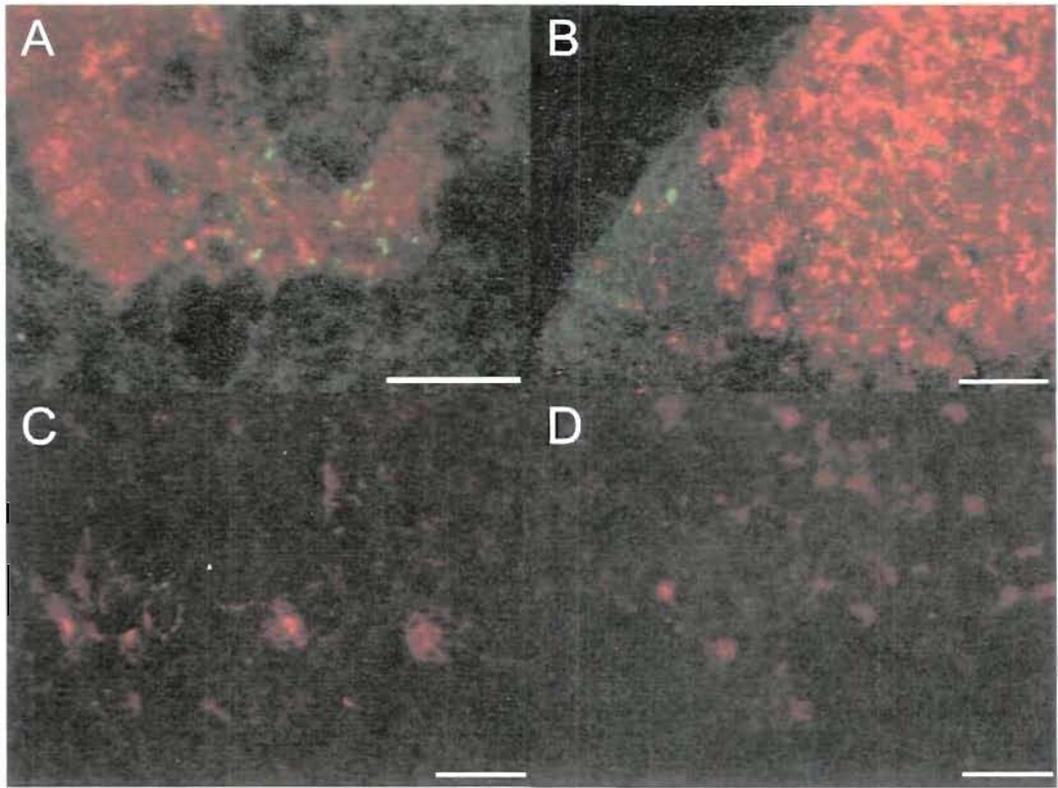
Cx36 labeling in the ventral horn of at P5 (A) and the dorsal horn at P10 (B), and the virtual absence in ventral (C) and dorsal horn (D) in an adult opossums. Note some

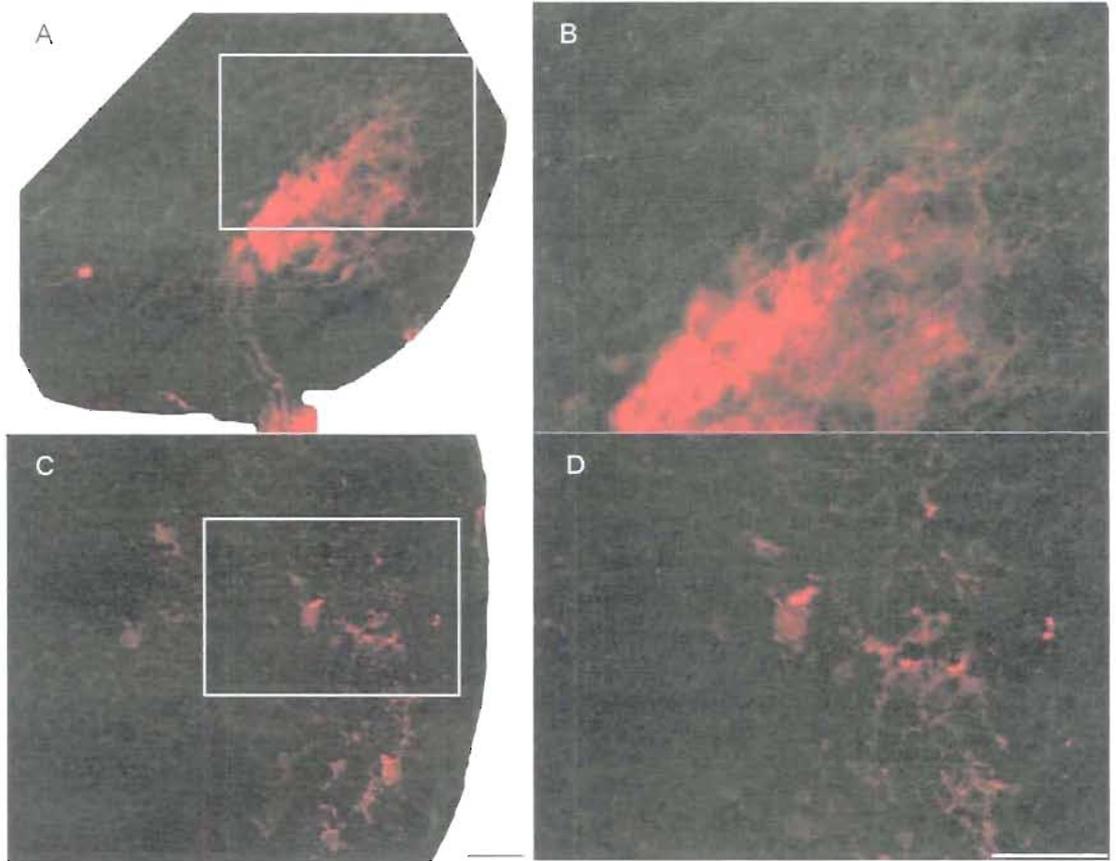
autofluorescent neuronal soma (especially in motoneurons) in adult opossums. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  (A) and 40  $\mu\text{m}$  (B-D).

**Figure 4: Cx36 and Texas Red retrograde labeling** Cx36 expression in lateral motor column retrogradely labeled with Texas Red at P4 (A) and P14 (C). Magnified of view of puncta on dendrites and somas of motoneurons is shown at P4 (B) and P14 (D). Scale bars: 40  $\mu\text{m}$ .









## 4. Discussion et conclusion générale

### *Aspect méthodologique*

Afin de mettre en évidence la présence de synapses électriques dans la moelle épinière de l'opossum postnatal, nous avons choisi de révéler par immunohistochimie la présence de connexine 36, une protéine formant les jonctions gap reconnue comme spécifiquement neuronale (Condorelli et al., 1998; Söhl et al., 1998). Cette technique n'est peut-être pas aussi sensible que l'hybridation *in situ* ou l'immunoblot, surtout que les connexines ne sont pas aussi abondantes que plusieurs autres protéines et leur quantité risque donc d'être sous-estimée, mais elle a l'avantage de localiser l'expression de la protéine même sur des coupes de tissu. C'est donc une technique adéquate pour répondre à notre besoin de localiser la Cx36 sur plusieurs coupes de moelle à plusieurs âges, soit pour une approche « systémique ». Néanmoins, la faible quantité de Cx36 même aux âges où elle abonde rendant difficile et très longue l'analyse des coupes à fort grossissement, un nombre moindre d'âges a été étudié et un nombre moindre d'animaux à chaque âge que ce anticipé au début du projet.

Une approche quantitative était initialement planifiée mais a été abandonnée à cause de l'incertitude des résultats fournis. Tout d'abord, la mesure de l'intensité lumineuse est difficile à interpréter à cause du faible ratio entre le signal et le bruit. De plus, la reconnaissance entre un faux marquage et de véritables puncta nécessite une appréciation visuelle qui n'est pas programmable. Cette première limitation technique introduit un biais dans l'évaluation quantitative de l'expression de Cx36. Parce que les puncta de Cx36 ont un diamètre entre 0.4 et 1.6  $\mu\text{m}$  et étaient échantillonnés sur des coupes de moelle épinière de 16  $\mu\text{m}$ , la reproductibilité des résultats est fortement

compromise. Cette seconde limitation, combinée à la première, génère une incertitude qui ne fournit pas plus d'information que l'évaluation qualitative de l'expression de Cx36 faite sur des cartographies où la première limitation est beaucoup moins importante.

#### *Décours temporel*

Ainsi, nous avons démontré qualitativement que la Cx36 est présente dans les renflements cervical et lombaire de la moelle épinière chez l'opossum postnatal. Modérée dans la matière grise présomptive à la naissance, l'immunoréactivité pour la Cx36 diminue dans la corne ventrale au cours des quatre semaines suivantes alors qu'elle augmente dans la corne dorsale, étant maximale de P10 à P20, pour ensuite diminuer à un très faible niveau dans la matière grise. Initialement présente dans la matière blanche présomptive à la naissance, la Cx36 disparaît graduellement de cette région, sauf dans la portion dorsale du funicule latéral où elle atteint une forte densité entre P10 et P20 avant de disparaître.

Les travaux antérieurs de notre groupe ainsi que ceux d'autres chercheurs résumés en introduction ont montré sans équivoque l'immaturation considérable de la moelle épinière et de tout le système nerveux de l'opossum néonatal et, en parallèle, l'immaturation comportementale, l'opossum nouveau-né étant à l'état embryonnaire. Néanmoins, les membres antérieurs du nouveau-né présentent une activité rythmique et alternée lui permettant de grimper sur le ventre de sa mère jusqu'à ce qu'il atteigne une tétine à laquelle il s'accroche et sur laquelle il demeure fusionné pendant trois semaines, durant lesquelles les membres antérieurs poursuivent leur développement et

les membres postérieurs commencent eux aussi à bouger (Pflieger et al., 1996). On peut présumer que ces mouvements des membres ne résultent pas seulement de contractions spontanées des fibres musculaires, celles-ci reçoivent en effet une innervation cholinergique, même si d'apparence très immature, des motoneurones spinaux (Barthélemy & Cabana, 2005). La caractéristique rythmique et alternée de ces mouvements laisse croire que le générateur central de rythme est, au moins partiellement, fonctionnel à la naissance. Bien que très peu d'afférences primaires aient pénétré la moelle à la naissance et qu'elles n'aient pas encore cru dans la corne ventrale (Knott et al., 1999; Kitchener et al., 2006), un fait corroboré par l'absence de réponses réflexes (malgré la présence de mouvements) avant au moins deux semaines (Cassidy et al., 1994), le CPG de l'opossum nouveau-né est vraisemblablement modulé par des afférences de la formation réticulée et surtout du noyau vestibulaire latéral (Pflieger & Cabana, 1996). Or, Gingras & Cabana (1999) ont démontré que le renflement cervical de l'opossum nouveau-né ne montre que peu de protéines indicatrices de la présence de synapses (chimiques) et même en microscopie électronique les figures synaptiques n'abondent pas, la synaptogenèse chimique se déroulant principalement postnatalement. Ces observations sont encore plus flagrantes dans la moelle lombaire. Notre mise en évidence de Cx36 dans la moelle épinière de l'opossum à la naissance supporte notre hypothèse que les synapses électriques sous-tendent l'activité neuronale générant les premiers mouvements des membres et ceux exprimés dans les semaines suivantes, alors qu'elles sont graduellement remplacées par les synapses chimiques.

*Expression dans la corne ventrale*

L'expression de Cx36 dans la corne ventrale diminue dès P5, alors que le nombre de motoneurones qui acquièrent leur phénotype cholinergique augmente. Il est très intéressant de constater à quel point nos observations sur le développement postnatal de la Cx36 dans les régions motrices de la moelle de l'opossum offrent une bonne corrélation temporelle avec les autres événements développementaux, tant neuraux que comportementaux. Dans les premiers jours postnataux, alors que l'expression de la Cx36 est à son maximum dans la corne ventrale (même si celle-ci demeure fort modérée), les motoneurones sont très petits, indifférenciés, tous ne présentent pas encore leur expression cholinergique et ils sont densément groupés, formant un ruban ininterrompu dans la corne ventrale qui borde la zone marginale (Barthélemy & Cabana, 2005). Nos résultats, notamment ceux identifiant les motoneurones et la présence de Cx36 sur les mêmes coupes, n'ont pas permis de conclure avec certitude que les jonctions gaps relient les motoneurones entre eux, mais l'ensemble de ces observations permet d'en poser l'hypothèse et de vouloir la vérifier à l'avenir avec l'approche adéquate.

La diminution jusqu'à la presque disparition de Cx36 dans la corne ventrale durant les trois premières semaines correspond au moment où l'expression cholinergique des motoneurones augmente et où ceux-ci s'éloignent les uns des autres, formant progressivement les colonnes motrices (Barthélemy & Cabana, 2005; Champagne et al., 2008), alors que leur expression glutamatergique disparaît (Lamoureux et al., 2008). Elle correspond également à la pénétration d'afférences primaires dans cette région (Knott et al., 1999; Kitchener et al., 2006), l'établissement des longues voies propriospinales (Cassidy & Cabana, 1993) et des voies descendantes

(Wang et al., 1992). Enfin, tel que mentionné, la diminution de Cx36 dans la corne ventrale correspond à l'augmentation des synapses chimiques et sa quasi disparition correspond plus précisément à la période la plus intense de synaptogenèse chimique (Gingras & Cabana, 1999). C'est également à l'issue de cette période, soit à l'âge de trois semaines, que l'opossum commence à se détacher de lui-même de sa mère et à se déplacer sur de courtes distances, malgré la lenteur et l'inefficacité de la locomotion ainsi que le manque de coordination entre les ceintures pectorale et pelvienne. La diminution de la quantité de synapses électriques est donc bien corrélée avec la maturation de la moelle épinière ainsi qu'avec celle des comportements locomoteurs.

#### *Expression dans la corne dorsale*

Contrairement à la corne ventrale où la Cx36 est la plus abondante en début de développement postnatal et diminue par la suite, la Cx36 augmente dans la corne dorsale pour diminuer à compter de la troisième semaine et éventuellement disparaître, donc plus tardivement que dans la corne ventrale. Cette observation s'explique par le développement plus tardif, chez les vertébrés, des régions et systèmes sensoriels que des régions et systèmes moteurs, un fait aussi rapporté dans toutes nos études passées de l'opossum et résumées en introduction. Il est raisonnable de croire que, si nous avions pu effectuer les expériences sur des opossums prénataux, nous aurions probablement découvert que la Cx36 apparaît peu avant la naissance dans la corne dorsale, et nous aurions constaté son apparition plus précoce ventralement, où elle aurait peut-être été exprimée à un niveau supérieur à celui observé à la naissance avant de commencer à décroître, possiblement prénatalement.

La quantité modérée de Cx36 dans la corne dorsale à la naissance et son augmentation subséquente initiale correspond à une période où peu d'afférences ont commencé à pénétrer dans la moelle (Knott et al., 1999; Kitchener et al., 2006), avant que les protéines des synapses chimiques ne soient détectables dans cette région et alors que peu de profils synaptiques sont vus ultrastructurellement (Gingras & Cabana, 1999; Kitchener et al., 2006). Ces découvertes combinées plaident ici aussi pour l'existence de synapses électriques tel qu'indiqué par la présente mise en évidence de Cx36.

La maturation subséquente de la corne dorsale, incluant la croissance des afférences primaires, et de longues voies propriospinales et encéphalospinales, n'entraîne pas une diminution immédiate de la Cx36 dans cette région. On constate plutôt une période à la fois de maturation spinale et d'augmentation de Cx36 de trois semaines précédant la décroissance de celle-ci. Cette observation est probablement liée au développement, non seulement plus tardif, mais surtout plus lent des fonctions sensorielles. Il est intéressant de noter que les opossums avant l'âge de trois semaines ne répondent pas à l'action d'anesthésiants chimiques, certainement parce que les voies de la douleur (des afférences primaires aux voies centrales intraspinales et ascendantes) ne sont pas formées ou suffisamment matures. Y aurait-il une relation à faire avec le couplage électrique dans la corne dorsale superficielle, suggéré par la Cx36, bien évidente jusqu'à P20? Cette question mériterait d'être abordée par d'autres chercheurs. Quoiqu'il en soit, la forte expression de Cx36 entrainerait un fort couplage entre cellules sensorielles qui pourrait avoir deux conséquences physiologiques importantes. La première serait qu'un fort couplage électronique des neurones pourrait résulter en

une diminution de leur sensibilité, donc une diminution de l'influence des inputs sensoriels. Il faut noter à ce sujet que des synapses électriques formées de Cx36 réduisent les décharges spontanées des neurones ganglionnaires de la rétine entre les vagues calciques pendant le développement des projections de la rétine (Hansen et al., 2005). Une diminution des inputs sensoriels est particulièrement importante lorsque le jeune opossum est attaché à la mère, car cela réduit le risque de mouvements réflexes qui pourraient à la longue le détacher avant qu'il n'y soit comportementalement prêt à le faire naturellement. La diminution de la forte expression de Cx36 dans la corne dorsale correspond aux âges où l'opossum se détache de la tétine. La seconde conséquence d'un fort couplage électronique au niveau dorsal serait que les synapses électriques formées par Cx36 synchroniseraient l'activité des neurones sensoriels pendant la croissance de leurs projections vers le cerveau, permettant ainsi le maintien d'une forme de somatotopie.

#### *Relation avec la synaptogenèse chimique*

Que ce soit au niveau du développement des fonctions sensorielles ou motrices, il est clair à la lumière de nos résultats qu'il y a une relation inverse entre la quantité de synapses électriques et chimiques. Des études dans d'autres systèmes suggèrent aussi fortement que les synapses électriques permettent les premiers contacts neuronaux et sont régulées à la baisse avec la maturation de la transmission chimique (Mentis et al., 2002; Szabo et al., 2004; Arumugam et al., 2005, 2008).

Tel que décrit dans l'introduction, la synapse chimique est une structure complexe qui nécessite une longue maturation. Inversement, la synapse électrique est

une structure relativement simple et il est fort concevable que le premier contact synaptique se fasse par l'intermédiaire des jonctions gap. Bien que celles-ci pourraient assurer la communication au sein des circuits neuronaux précoces, en transmettant l'activité spontanée par exemple, il est évident que le fonctionnement de circuits neuronaux matures, dont le CPG locomoteur, nécessite une structure plus flexible, soit la synapse chimique. L'expression modérée à la naissance de Cx36 dans la corne ventrale qui diminue progressivement au cours des premières semaines postnatales, ainsi que l'augmentation et la diminution subséquente de l'expression de Cx36 corne dorsale qui se développe plus tardivement que la corne ventrale, pointe dans cette direction. Un autre avantage que peuvent présenter les jonctions gap durant le développement est qu'elles laissent passer certains messagers secondaires, permettant possiblement l'échange de facteurs neurotrophiques essentielles à la survie des neurones.

*Expression dans la portion dorsale du funicule latérale*

Si, comme pour les protéines synaptiques (Gingras & Cabana, 1999) et l'acétylcholine (son enzyme de synthèse ChAT et sa vésicule de transport VAcHT - Barthélemy & Cabana, 2005), il est facile d'interpréter la présence de Cx36 dans la zone marginale (matière blanche présomptive) comme étant transportée de son site de synthèse dans les corps cellulaires neuronaux soma jusqu'aux terminaisons neuritiques, il est plus difficile d'interpréter sa forte présence dans une région particulière de la matière blanche présomptive, soit dans la portion dorsale du funicule latéral correspondant à la position du faisceau rubrospinal. Ce marquage coïncide d'ailleurs

avec la croissance de ce faisceau dans la moelle épinière (Wang et al., 1992). Cela suggère que Cx36 formeraient des synapses électriques axoaxoniques dans ce faisceau qui pourraient servir au maintien de la fasciculation lors du développement de cette voie qui est la dernière à croître dans la moelle épinière, la voie corticospinale n'allant pas plus loin que C1 chez *M. domestica* (Nudo & Masterton, 1990, Cabana et al., 1992). Pourquoi seulement ce faisceau est marqué de la sorte, plutôt que d'autres plus précoces et agissant sur les premiers comportements moteurs comme le vestibulospinal et/ou le réticulospinal? Y a-t-il un lien à faire entre le rôle spécial dans le contrôle moteur qu'on pourrait prêter au noyau rouge, qui compenserait l'absence fibres corticospinales chez l'opossum ou simplement le fait que la voie rubrospinale soit la dernière à envahir la moelle épinière. Notons que la disparition de Cx36 dans le funicule latéral chez l'opossum correspond au moment de la myélination de cette région (Lamoureux et al., 2005), processus qui empêche forcément le couplage axoaxonique.

Bien que la Cx36 soit la principale protéine impliquée dans les synapses électriques entre neurones, et que nous avons choisi de concentrer notre étude sur cette protéine des jonctions gap, il est possible que d'autres connexines exprimées par les neurones, dont Cx45 et Cx40, jouent un rôle dans les fonctions discutées dans ce mémoire. Les pannexines (Px1 et Px2) sont également de nouvelles candidates pour jouer un rôle dans la communication neuronale au sein des circuits précoces de la moelle épinière (Panchin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003).

Nous avons montré dans ce travail que la Cx36 est exprimée dans les renflements de la moelle épinière de l'opossum *Monodelphis domestica* à la naissance

et postnatalement, et à un degré permettant de croire que les jonctions gap jouent un rôle dans la communication neuronale au sein des circuits spinaux générant la locomotion. Des études plus poussées, notamment électrophysiologiques, seront utiles à renforcer notre conclusion. La découverte d'une forte expression de Cx36 dans la corne dorsale superficielle ouvre la voie à l'utilisation de cette espèce marsupiale comme nouveau modèle pour étudier le développement de la douleur, alors que cette espèce a principalement servi à l'étude des fonctions motrices et somatosensorielles, du moins en ce qui concerne sa moelle épinière. Il va sans dire que le marquage de Cx36 dans la portion dorsale du funicule latéral et que l'on suppose associé au développement des projections rubrospinales soulève des énigmes. Le rôle d'un possible couplage axoaxonique tout comme la raison pour laquelle il est restreint à ce faisceau occuperont bien des chercheurs, on peut l'espérer.

## 5. Bibliographie

- Al-Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, Bruzzone R. 2000. Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J Neurosci Res* 59(6):813-826.
- Armstrong DL, Turin L, Warner AE. 1983. Muscle activity and the loss of electrical coupling between striated muscle cells in *Xenopus* embryos. *J Neurosci* 3(7):1414-1421.
- Arumugam H, Denisova JV, Neve RL, Corriveau RA, Belousov AB. 2008. Use of calcium imaging for analysis of neuronal gap junction coupling. *Neurosci. Lett.* in press.
- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB. 2005. NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. *Nat Neurosci* 8(12):1720-1726.
- Baker R, Llinas R. 1971. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *J Physiol (Lond)* 212(1):45-63.
- Barthelemy D, Cabana T. 2001. The development of vesicular acetylcholine transporter immunoreactivity in the hindlimbs of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev. Brain Res.* 128(2):191-195.
- Barthelemy D, Cabana T. 2005. Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: Immunohistochemical localization of acetylcholine. *Dev. Brain Res.* 155(2): 87-98.
- Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Hurd YL, Condorelli DF. 1999. Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res* 57(5):740-752.
- Belluardo N, Mudo G, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, Condorelli DF. 2000. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 865(1):121-138.
- Bennett MV, Aljure E, Nakajima Y, Pappas GD. 1963. Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science* 141:262-264.
- Berthoud VM, Singh R, Minogue PJ, Ragsdale CW, Beyer EC. 2004. Highly restricted pattern of connexin36 expression in chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 209(1):11-18.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13644-13649.
- Cabana T., Desrosiers D., Nadeau A. 1992. The ontogenesis of corticobulbar projections and the virtual absence of corticospinal connections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abstr* 440:8.
- Cabana T. 2000. The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53(5):615-626.
- Cai L, Hayes NL, Nowakowski RS. 1997. Synchrony of clonal cell proliferation and contiguity of clonally related cells: production of mosaicism in the ventricular zone of developing mouse neocortex. *J Neurosci* 17(6):2088-2100.

- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. 1994. The development of sensorimotor reflexes in the brazilian opossum *monodelphis domestica*. *Brain Behav. Evol.* 43(4-5):244-253.
- Cassidy G, Cabana T. 1993. The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Res Dev Brain Res* 72(2):291-299.
- Champagne S, Petrou A, Lamoureux S, Cabana T. 2008. The developmental of motoneuronal columns related to different muscle compartments of the limbs in opossum *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abstr*
- Chang Q, Balice-Gordon RJ. 2000. Gap junctional communication among developing and injured motor neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):242-249.
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. 1999. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* 19(24):10813-10828.
- Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. 2004. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol* 272(1):203-216.
- Condorelli DF, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G. 2000. Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):72-85.
- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F. 1998. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10(3):1202-1208.
- Deans MR, Gibson JR, Sellitto C, Connors BW, Paul DL. 2001. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 31(3):477-485.
- Dermietzel R, Spray DC. 1993. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16(5):186-192.
- Eckert R. 1963. Electrical interaction of Paired Ganglion Cells in the Leech. *J. Gen. Physiol.* 46:573-587.
- Feller MB. 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22(4):653-656.
- Fischbach GD. 1972. Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Dev Biol* 28(2):407-429.
- Floeter M. 2003. The Spinal Cord, Muscle, and Locomotion. In: Squire, Bloom, McConnell, Robert, Spitzer, Zigmond, editors. *Fundamental Neuroscience*. Second ed. San Diego: Elsevier Science. p 737-790.
- Fujita S. 1964. Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 122:311-327.
- Fulton BP. 1995. Gap junctions in the developing nervous system. *Perspect Dev Neurobiol* 2(4):327-334.
- Fulton BP, Miledi R, Takahashi T. 1980. Electrical synapses between motoneurons in the spinal cord of the newborn rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 208(1170):115-120.
- Furshpan EJ, Potter DD. 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol (Lond)* 145(2):289-325.

- Gingras J, Cabana T. 1999. Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *SO – J Comp Neurol* 414(4) Nov 29, 1999 551-560.
- Gogan P, Gueritaud JP, Horcholle-Bossavit G, Tyc-Dumont S. 1977. Direct excitatory interactions between spinal motoneurons of the cat. *J Physiol (Lond)* 272(3):755-767.
- Grillner S. 2006. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52(5):751-766.
- Grillner S, Zangger P. 1975. How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Res* 88(2):367-371.
- Haines DE. 1991. *Neuroanatomy: An Atlas of Structures, Sections and Systems*. Urban & Schwarzenberg.
- Hansen KA, Torborg CL, Elstrott J, Feller MB. 2005. Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina. *J Comp Neurol* 493(2):309-320.
- Hanson MG, Landmesser LT. 2003. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23(2):587-600.
- Hendry S, Hsiao S. 2003. The Somatosensory System. In: Squire, Bloom, McConnell, Robert, Spitzer, Zigmond, editors. *Fundamental Neuroscience*. Second ed. San Diego: Elsevier Science. p 667-697.
- Hinckley CA, Ziskind-Conhaim L. 2006. Electrical coupling between locomotor-related excitatory interneurons in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 26(33):8477-8483.
- Hinrichsen CF, Larramendi LM. 1968. Synapses and cluster formation of the mouse mesencephalic fifth nucleus. *Brain Res* 7(2):296-299.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, Monyer H. 2001. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31(3):487-495.
- Jessell TM, Sanes JR. 2000a. The Induction and Patterning of the Nervous System. In: Kandel, Schwartz, Jessell, editors. *Principles of Neural Science*. 4th ed. New York: The McGraw-Hill Companies. p 1020-1039.
- Kamasawa N, Furman CS, Davidson KGV, Sampson JA, Magnie AR, Gebhardt BR, Kamasawa M, Yasumura T, Zumbrennen JR, Pickard GE, Nagy JJ, Rash JE. 2006. Abundance and ultrastructural diversity of neuronal gap junctions in the OFF and ON sublaminae of the inner plexiform layer of rat and mouse retina. *Neuroscience* 142(4):1093-1117.
- Kandel ER, Siegelbaum SA. 2000. Overview of synaptic transmission. In: Kandel, Schwartz, Jessell, editors. *Principles of Neural Science*. 4th ed. New York. p 175-186.
- Kandler K, Katz LC. 1995. Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5(1):98-105.
- Kiehn O. 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306.
- Kiehn O, Tresch MC. 2002. Gap junctions and motor behavior. *Trends Neurosci*. 25(2) February, 2002 108-115.

- 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(4):423-436.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381-388.
- Lamoureux S, Gingras J, Cabana T. 2005. Myelination in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav. Evol.* 65(3) 2005 143-156.
- Lamoureux S, Hartmann J, Pflieger J-F, Cabana T. 2008. Is glutamate transiently expressed in limb motoneurons of developing opossums, *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abstr*
- Leblond H, Cabana T. 1997. Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of development in the gray opossum, *Monodelphis domestica*. *SO – J. Comp. Neurol.* 386(2) 1997 203-216.
- Llinás R, Sasaki K. 1989. The Functional Organization of the Olivo-Cerebellar System as Examined by Multiple Purkinje Cell Recordings. *Eur J Neurosci* 1(6):587-602.
- Loewenstein WR. 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61(4):829-913.
- MacVicar BA, Dudek FE. 1981. Electrotonic coupling between pyramidal cells: a direct demonstration in rat hippocampal slices. *Science* 213(4509):782-785.
- Marina N, Becker DL, Gilbey MP. 2008. Immunohistochemical detection of connexin36 in sympathetic preganglionic and somatic motoneurons in the adult rat. *Auton Neurosci* 139(1-2):15-23.
- Matsumoto A, Arnold AP, Micevych PE. 1989. Gap junctions between lateral spinal motoneurons in the rat. *Brain Res* 495(2):362-366.
- Matsumoto A, Arnold AP, Zampighi GA, Micevych PE. 1988. Androgenic regulation of gap junctions between motoneurons in the rat spinal cord. *J Neurosci* 8(11):4177-4183.
- Mentis GZ, Diaz E, Moran LB, Navarrete R. 2002. Increased incidence of gap junctional coupling between spinal motoneurons following transient blockade of NMDA receptors in neonatal rats. *J Physiol (Lond)* 544(Pt 3):757-764.
- Motorina MV. 1989. Electrotonic synapses in the spinal cord of mammals. *Neurosci Behav Physiol* 19(1):72-78.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3):191-215.
- Nelson PG. 1966. Interaction between spinal motoneurons of the cat. *J Neurophysiol* 29(2):275-287.
- Nudo RJ., Masterton RB. 1990. Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract. *J Comp Neurol* 296(4):559-583.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10(13):R473-474.

- Peinado A, Yuste R, Katz LC. 1993. Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10(1):103-114.
- Pflieger J-F, Cabana T. 1996. The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *SO - Anat Embryol* 194(1) 1996 75-88.
- Pfieger JF, Cassidy G, Cabana T. 1996. Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum *Monodelphis domestica*. *SO - Behav Brain Res* 80(1-2) 1996 137-143.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE. 1998. Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord. *Cell Biol Int* 22(11-12):731-749.
- Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI. 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7573-7578.
- Rozental R, Giaume C, Spray DC. 2000. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):11-15.
- Schieber M, Baker J. 2003. Descending Control of Movement. In: Squire, Bloom, McConnell, Robert, Spitzer, Zigmond, editors. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Elsevier Science. p 791-814.
- Sheridan JD. 1968. Electrophysiological evidence for low-resistance intercellular junctions in the early chick embryo. *J Cell Biol* 37(3):650-659.
- Shiosaka S, Yamamoto T, Hertzberg EL, Nagy JI. 1989. Gap junction protein in rat hippocampus: correlative light and electron microscope immunohistochemical localization. *J Comp Neurol* 281(2):282-297.
- Söhl G, Degen J, Teubner B, Willecke K. 1998. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett* 428(1-2):27-31.
- 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. *Soc Neurosci Abstr*
- Spray DC, Harris AL, Bennett MV. 1981. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science* 211(4483):712-715.
- Srinivas M, Rozental R, Kojima T, Dermietzel R, Mehler M, Condorelli DF, Kessler JA, Spray DC. 1999. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci* 19(22):9848-9855.
- Szabo TM, Faber DS, Zoran MJ. 2004. Transient electrical coupling delays the onset of chemical neurotransmission at developing synapses. *J Neurosci* 24(1):112-120.
- Teubner B, Degen J, Sohl G, Guldenagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De Zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Willecke K. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol* 176(3):249-262.
- van der Want JJ, Gramsbergen A, Ijkema-Paassen J, de Weerd H, Liem RS. 1998. Dendro-dendritic connections between motoneurons in the rat spinal cord: an electron microscopic investigation. *Brain Res* 779(1-2):342-345.

- Walton KD, Navarrete R. 1991. Postnatal changes in motoneurone electrotonic coupling studied in the in vitro rat lumbar spinal cord. *J Physiol (Lond)* 433:283-305.
- 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 Brain Res* 68(2):203-216.
- Warner AE. 1973. The electrical properties of the ectoderm in the amphibian embryo during induction and early development of the nervous system. *J Physiol (Lond)* 235(1):267-286.
- White TW, Deans MR, O'Brien J, Al-Ubaidi MR, Goodenough DA, Ripps H, Bruzzone R. 1999. Functional characteristics of skate connexin35, a member of the gamma subfamily of connexins expressed in the vertebrate retina. *Eur J Neurosci* 11(6):1883-1890.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383(5):725-737.
- Yates C, Charlesworth A, Allen SR, Reese NB, Skinner RD, Garcia-Rill E. 2008. The onset of hyperreflexia in the rat following complete spinal cord transection. *Spinal cord*.
- Zeman W, Innes JRM. 1963. *Craigie's Neuroanatomy of the Rat*. New York: Academic Press.

**Annexe 1**

**Protocole immunohistochimique contre Cx36 et NeuN**

## Protocole pour Cx36 et NeuN

- A) Séchage des lames (15 minutes, température pièce)
- B) Hydratation/Perméabilisation (20 minutes, température pièce) dans le tampon suivant :
- 0.05M Tris buffer
  - 1.5% NaCl
  - 0.3% Triton X-100
- C) Incubation primaire et blocage simultané (16 heures, 4C) dans le tampon suivant :
- 0.05M Tris buffer
  - 1.5% NaCl
  - 0.3% Triton X-100
  - 5% NGS
  - 3 µg polyclonal rabbit anti-connexin36
  - 2 µg monoclonal mouse anti-NeuN
- D) Lavage des anticorps primaires (3 x 20 minutes, température pièce) dans le tampon suivant:
- 0.05M Tris buffer
  - 1.5% NaCl
  - 0.3% Triton X-100
- E) Incubation secondaire (2 heures, température pièce) dans le tampon suivant :
- 0.05M Tris buffer
  - 1.5% NaCl
  - 0.3% Triton X-100
  - 5% NGS
  - 1:1000 goat anti-rabbit IgG AlexaFluor-488 (pour Cx36)
  - 1:800 goat anti-mouse IgG Cy3 (pour NeuN)
- NB: ne jamais utilisé Cy3 pour Cx36 car c'est un anticorps secondaire qualifié de sale car il produit un marquage non spécifique sous forme de puncta.
- F) Lavage des anticorps secondaires (20 minutes, température pièce) dans ce tampon:
- 0.05M Tris buffer
  - 1.5% NaCl
  - 0.3% Triton X-100
- G) Lavages finaux (2 x 20 minutes, température pièce) dans ce tampon:
- 0.05M Tris-HCl
- H) Montage permanent dans du fluoromount (SouthernBiotech) et couvrir avec une lamelle.  
Conserver les lames au réfrigérateur (4C) pour conserver un marquage durant plusieurs mois. Pour conserver à long terme, entreposer les lames de -20C à -80C.