

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

Étude de l'activité spontanée dans la moelle épinière de
l'opossum *Monodelphis domestica* en développement.

Par Annie Lavallée

Département des 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

Septembre 2008

© Annie Lavallée 2008



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'activité spontanée dans la moelle épinière de l'opossum
Monodelphis domestica en développement

présenté par :

Annie Lavallée

sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mme Thérèse Cabana, président-rapporteur

M Jean-François Pflieger, directeur de recherche

M Michel Anctil, membre du jury

Résumé

Cette étude concerne le développement de l'activité spontanée dans la moelle épinière d'un marsupial, l'opossum *Monodelphis domestica*. Nous avons utilisé le transport rétrograde de Calcium Green jusqu'aux motoneurones des renflements de la moelle épinière de l'opossum pour mettre en évidence la présence d'activité spontanée au niveau des motoneurones sous la forme de vagues calciques qui activent toute la colonne motrice à la fois. En second lieu, nous avons utilisé la Sulforhodamine-101, une substance fluorescente endocytosée par les cellules actives, pour étudier la localisation de ces cellules dans les renflements spinaux d'opossums d'âge croissant. Chez l'opossum nouveau-né, il y a très peu de cellules actives et elles sont présentes seulement au niveau cervical. Dès le jour postnatal 5, P5, le nombre de cellules marquées a augmenté et elles apparaissent au niveau lombaire. Les motoneurones sont les principales cellules marquées, mais se sont révélés impossibles à dénombrer de manière sûre. Nous nous sommes concentrés sur la variation temporelle des autres cellules. Leur nombre dans les deux renflements augmente avec l'âge de l'animal jusqu'à un plateau à P12 puis diminue graduellement par la suite, jusqu'au dernier âge étudié (P16). L'expression développementale de l'activité spontanée, telle que reflétée par le nombre de cellules marquées, se compare à ce qui a été observé chez d'autres espèces de vertébrés comme le poussin et le rat. Cette étude est un premier pas pour la compréhension du rôle de

l'activité spontanée dans le développement des réseaux moteurs sous-jacents à la motricité chez l'opossum.

Mots-clés : développement, activité spontanée, comportements, locomotion, mammifères, neuroanatomie, imagerie calcique, marquage cellulaire, Sulforhodamine-101.

Abstract

Using calcium imaging techniques and active cell Sulforhodamine-101 (SR101) labeling on *in vitro* preparation we have investigated the development of spontaneous activity in the spinal enlargements of a marsupial, the opossum *Monodelphis domestica*. Following retrograde transport of Calcium Green dye to the motoneurons of the spinal enlargements, we were able to show the presence of spontaneous calcium waves activating the entire motor columns. Secondly, after exposing the spinal cord from animals at different ages to SR101, we were able to locate active cells within the spinal cord. In the newborn opossum, few labeled cells are seen in the cervical enlargement and none in the lumbar enlargement. At the second stage studied, postnatal day 5 (P5), labeled cells increase in number and appear in the lumbar enlargement. Motoneurons are the major cell type labeled but proved impossible to quantify with accuracy. We thus focused our quantitative study on the other labeled cells. Their number in both enlargements increased steadily from P5 up to a peak at P12 and then gradually decreased until the last stage studied, P16. The developmental expression of spontaneous activity, as evidenced by the number of labeled cells, follows a pattern similar to that in other vertebrate species like chicken or rat. This study is a first step in understanding the role of spontaneous activity in the development of spinal network underlying motility in the opossum.

Key words: development, spontaneous activity, behaviour, locomotion, mammals, neuroanatomy, calcium imaging, cell labeling, Sulforhodamine-

101

Table des matières

Résumé français.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.2 <i>Développement de la moelle épinière</i>	4
1.3 <i>Développement précoce de la motricité</i>	9
1.3.1 Développement de l'activité motrice	9
1.3.2 Activité électrique spontanée dans la moelle.....	12
1.3.3 Activité spontanée embryonnaire chez les mammifères	17
1.4 <i>Le modèle expérimental</i>	19
1.4.1 Généralités	20
1.4.2 Développement locomoteur de l'opossum.....	21
1.4.3 Développement de la moelle épinière de l'opossum.....	22
1.4.4 Développement de l'innervation des membres	23
1.4.5 Développement des voies propriospinales longues	25
1.4.6 Développement des voies descendantes et ascendantes	26
1.5 Problématique.....	27
1.6 Méthodologie.....	28
1.6.1 Imagerie calcique	29
1.6.2 Expériences de marquage à la Sulforhodamine-101	31
1.6.3 Immunohistochimie.....	33
1.6.4 Analyse des résultats	33
2 ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL.....	48
3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	83
3.1 Aspects techniques	84
3.2 Développement de l'expression de l'activité spontanée	86
3.3 Perspective.....	90
4 BIBLIOGRAPHIE.....	92

Liste des figures

Figure 1 : Moelle épinière de mammifère.....	36
Figure 2 : Opossums, au jour de la naissance et à P20.....	38
Figure 3 : Développement de quelques réflexes chez l'opossum.....	40
Figure 4 : Renflement lombaire de la moelle épinière d'un opossum au jour de la naissance.....	42
Figure 5 : Expression de la synaptophysine dans les renflements spinaux de l'opossum en développement.....	44
Figure 6 : Expression de la MBP et de la PLP dans les renflements spinaux de l'opossum en développement.....	46

Liste des tableaux

Tableau I : Âge initial d'apparition des voies descendantes au niveau de la moelle épinière et des voies ascendantes au niveau de l'encéphale chez l'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	47
--	----

Liste des abréviations

ChAT : enzyme de synthèse de l'acétylcholine

E : jour embryonnaire

IZ : zone intermédiaire

LDPP : longues voies propriospinales

MBP : myelin basis protein

MB : matière blanche

ME : moelle épinière

MG : matière grise

MZ : zone marginale

P : jour postnatal

PB : tampon phosphate

PLP : proteolipid protein

RC : renflement cervical

RL : renflement lombaire

SNC : système nerveux central

SR101 : sulforhodamine-101

TB : tampon tris

VAcHT : protéine de transport de l'acétylcholine

VZ : zone germinative (ou ventriculaire)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, M Jean-François Pflieger pour son aide dans la réalisation de ce projet du début à la fin. Son support et ses nombreux conseils, particulièrement au moment de la rédaction de ce mémoire, m'ont été très précieux et m'ont permis de rendre à terme cette belle aventure.

Je tiens également à remercier Thérèse Cabana, Louise Pelletier et Stéphanie Lamoureux pour toute l'aide et les conseils techniques qui m'ont aidé dans la réalisation de cette maîtrise. Je remercie aussi Keena Pedneault qui a participé à mon projet dans le cadre de stages durant les étés 2006 et 2007, sans son excellent travail, j'y serais encore.

Une pensée toute spéciale pour Maxime Lemieux et Syndia Champagne, collègues et amis de maîtrise qui m'ont apporté un soutien moral inestimable.

Enfin, un immense merci à mon copain François ainsi qu'à ma famille pour leur patience et leur support infinis tout au long de mes études, je n'y serais pas arrivé sans vous, merci.

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Plusieurs études ont démontré qu'un phénomène d'activité spontanée était présent dans les réseaux neuronaux du système nerveux central (SNC) en développement. Des travaux portant sur des systèmes se développant tardivement, tel le système visuel, ont permis d'établir le rôle de cette activité. Elle influencerait entre autres la croissance neuronale, la formation des synapses et l'établissement des réseaux neuronaux (Zhang & Poo, 2001). Mais que se passe-t-il au niveau des réseaux neuronaux plus précoces tels les réseaux de neurones de la moelle épinière ? Il a été démontré par plusieurs études qu'il était possible d'enregistrer de l'activité spontanée au niveau de la moelle épinière en développement, et ce, chez plusieurs espèces animales tel le poulet (Provine *et al.*, 1970), le rat (Greer *et al.*, 1992 ; Nishimaru *et al.*, 1996), la souris (Hanson & Landmesser, 2003) toutes des études portant sur la locomotion et chez l'opossum (Eugenin & Nicholls, 2000) au niveau des segments hébergeant la fonction respiratoire. Par contre, peu de choses sont encore connues sur le rôle de ce phénomène dans le développement des réseaux neuronaux de la moelle épinière. Nous avons donc décidé de nous y intéresser.

Ce travail porte sur l'étude du phénomène d'activité spontanée au niveau des renflements de la moelle épinière d'un mammifère en développement. Nous utilisons comme modèle expérimental l'opossum *Monodelphis domestica*, un

marsupial qui a fait ses preuves en tant que modèle du développement (revue dans Cabana 2000). Pour bien comprendre la problématique de ce travail, nous commencerons par une présentation de la moelle épinière, de sa structure et de son développement, suivie d'une revue des travaux portant sur l'activité spontanée. Puis, nous présenterons le modèle expérimental et nous exposerons finalement la problématique au cœur de notre étude.

1.1 Organisation générale de la moelle épinière

Chez la plupart des tétrapodes, la moelle épinière (ME) a la forme d'un tube pourvu de deux renflements (fig1A). Le renflement cervical, situé le plus rostralement, est le site où se trouvent les corps cellulaires des neurones innervant les membres antérieurs et le renflement lombaire est le site d'où partent les axones innervant les membres postérieurs. On divise aussi la moelle en plusieurs niveaux selon la position occupée dans la colonne vertébrale, soit cervical, thoracique, lombaire, sacré et coccygien, et qui comprennent chacun plusieurs segments. Les axones des neurones moteurs quittant la moelle à un niveau donné se regroupent et sortent en un seul point du côté ventral, formant ce que l'on appelle la racine ventrale d'un segment et les axones des neurones innervant la périphérie font de même en sens inverse, pénétrant la moelle en groupe en un point formant la racine dorsale d'un segment. Chaque segment comprend donc une racine dorsale et ventrale de chaque côté. En coupe transverse, on peut observer le papillon

caractéristique formé par les corps cellulaires des neurones de la ME, la matière grise, regroupés autour du canal épendymaire (fig1B). Les parties ventrales des ailes du papillon sont nommées cornes ventrales et elles renferment les motoneurones organisés en colonnes. Les motoneurones innervant les muscles axiaux et paraxiaux (cou, tronc, queue) sont retrouvés dans la colonne médiane que l'on peut voir sur toute la longueur de la ME, tandis que les motoneurones innervant les muscles des membres sont retrouvés dans la colonne latérale qui n'apparaît que dans les renflements, le nombre accru de neurones expliquant en partie l'élargissement. Les parties dorsales des ailes du papillon formées par la matière de la ME sont nommées cornes dorsales et renferment des interneurones recevant les afférences des neurones sensoriels primaires. Les portions centrales de la matière grise contiennent entre autres les interneurones composant les « central pattern generator » (CPG), des réseaux de neurones capables de générer une activité rythmique influençant l'activité des motoneurones lors de la locomotion. Toutefois, chez les mammifères, il existe encore une incertitude sur leur localisation exacte ainsi que sur les types d'interneurones qui composeraient ces réseaux (revues dans Falgairolle *et al.*, 2006 ; Grillner, 2006 ; Kiehn, 2006).

Autour de la matière grise, on retrouve la matière blanche composée de fibres nerveuses. La matière blanche se divise grossièrement en trois régions (fig1B) : les funicules dorsaux, situés entre les cornes dorsales, qui regroupent principalement les prolongements des neurones ganglionnaires

sensoriels, et les funicules ventraux et latéraux, qui regroupent les axones des voies propriospinales, descendantes et ascendantes. La matière blanche tire son nom de la présence de myéline autour des fibres de la moelle mature ce qui lui donne un aspect blanc à l'œil nu.

1.2 Développement de la moelle épinière

Le développement de la moelle épinière comprend plusieurs étapes importantes plus ou moins successives (Cowan, 1979 ; Jacobson, 1991).

Induction de la plaque neurale : Suite à la gastrulation, la notocorde, structure mésodermique, induit chez l'embryon la différenciation de l'ectoderme sus-jacent en neurectoderme qui s'épaissira pour former la plaque neurale. Les rebords de cette dernière s'épaississent et se soulèvent formant les replis neuraux qui se touchent et fusionnent pour donner le tube neural qui est à l'origine du futur névraxe et qui finit de se loger entre l'ectoderme général et la notocorde. Un grand nombre des cellules des replis neuraux se détachent et viennent s'insérer entre l'ectoderme et le tube neural sur toute sa longueur. Elles migrent ensuite entre l'ectoderme et le tube neural pour former la crête neurale, qui est à l'origine du système nerveux périphérique. L'induction de la neurulation débute aux environs de la jonction entre bulbe et moelle cervicale et se continue rostralement vers l'encéphale présomptif et caudalement au niveau de la moelle. La moelle épinière se développe donc selon un gradient

rostrocaudal, c'est-à-dire que la partie rostrale de la moelle commence son développement avant la partie caudale. Ce gradient influence toutes les étapes subséquentes du développement de la moelle.

Prolifération et migration cellulaire : Une fois le tube neural formé, les cellules de l'épithélium du tube se divisent rapidement et la paroi du tube s'épaissit. Les cellules postmitotiques sont repoussées vers la périphérie du tube et on distingue alors deux couches : la zone germinative ou ventriculaire centrale qui renferme les cellules germinatives se multipliant et la zone intermédiaire ou manteau où les cellules postmitotiques s'accumulent. Les cellules qui deviennent postmitotiques migrent vers la zone intermédiaire en s'aidant des prolongements de cellules gliales radiales (Rakic, 1990). Les premières cellules à migrer se retrouvent à la périphérie du manteau et les plus tardives occupent les positions internes, près de la lumière du tube neural, le neurocoele. À mesure que les cellules deviennent postmitotiques et que la zone intermédiaire s'épaissit, la zone germinative devient de plus en plus mince. Chez l'adulte, cette dernière sera réduite à une assise unique de cellules ciliées, l'épendyme. Dans le système nerveux central mature, le neurocoele devient le canal épendymaire au niveau de la moelle épinière et les ventricules dans l'encéphale.

Agrégation et différenciation cellulaire : Une fois la migration des cellules achevée, les signaux chimiques permettent leur regroupement en groupe de neurones associés à une fonction commune du système mature. Par

exemple, les motoneurones innervant les muscles des membres antérieurs se regroupent ensemble pour former la colonne motrice latérale de la corne ventrale au niveau cervical. À l'intérieur de cette colonne, les motoneurones se regroupent encore entre eux selon le muscle qu'ils innervent; cette agrégation résulte en des pools de motoneurones caractérisés par leur innervation musculaire. Quand les cellules nerveuses en devenir, les neuroblastes, sont installées à leur position définitive, ils commencent à se différencier pour former les neurones fonctionnels.

La différenciation cellulaire comprend deux étapes, l'axogenèse, qui est généralement la première à débiter, et la dendritogenèse. Le neurone en devenir acquiert par le fait même une polarité : les dendrites sont les récepteurs de l'influx et le propagent vers le corps cellulaire du neurone mature et l'axone est le pôle émetteur du neurone et transporte l'influx vers sa cible. La formation de ces deux types de prolongements dépend d'une structure appelée cône de croissance décrite pour la première fois par Ramón y Cajal au début du XXe siècle (1911). Le cône de croissance est un élargissement cytoplasmique de la cellule pourvu d'appendices, les lamellipodes et les filopodes, contenant des filaments d'actine et des microtubules qui permettent l'allongement du neurite. Le cône de croissance reconnaît certaines substances chimiques de l'environnement et les utilise comme repères pour se diriger vers la bonne cible. Cette action tropique peut être exercée par différents types de molécules, comme les neurotrophines,

les facteurs de croissance (comme le NGF, « nerve growth factor ») ou certains neurotransmetteurs.

De plus, une fois leur croissance bien avancée, voire terminée, la plupart des axones développeront une gaine de myéline, consistant en l'enroulement de prolongements cytoplasmiques de cellules gliales autour de l'axone. Les cellules responsables de cette gaine sont les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et elles forment sur l'axone des régions myélinisées entrecoupées d'espaces, les nœuds de Ranvier. Cette gaine permet la conduction saltatoire de l'influx d'un nœud de Ranvier à l'autre, ce qui accélère la propagation de l'influx par rapport à ce qui se passe dans une fibre non myélinisée.

Synaptogenèse : La synapse est le lieu de propagation de l'influx nerveux entre deux neurones adjacents d'un même circuit ou entre le neurone et le muscle cible. Elle est composée de l'élément présynaptique, c'est-à-dire la terminaison axonique, de l'élément postsynaptique, généralement une région d'un autre neurone (dendrite ou soma) ou d'un autre type cellulaire (musculaire ou myoïde, par exemple) et de la fente synaptique, un espace large de quelques nanomètres situés entre les deux.

La formation des synapses commence généralement aussitôt que les axones ont atteint leur cible. Les cônes de croissance voient leur concentration en glycogène diminuer et on peut voir apparaître des vésicules synaptiques,

vésicules qui contiendront les neurotransmetteurs relâchés dans la fente synaptique lors de la transmission de l'influx. Au point de contact, la membrane de l'élément postsynaptique s'épaissit et la surface de la jonction augmente. Lorsque les vésicules synaptiques se regroupent et s'accolent à la membrane présynaptique, on voit l'apparition de zones actives, c'est-à-dire les sites spécifiques de relâchement des neurotransmetteurs (Purves & Litchman, 1984). Il a été démontré que pendant la synaptogenèse au niveau de la jonction neuromusculaire les deux pôles communiquent entre eux par des signaux chimiques (molécules de surface membranaire) et électriques (Chow, 1990), ces derniers étant possibles grâce à des pores établis entre des cellules adjacentes (jonctions GAP). De plus, une autre étude sur la jonction neuromusculaire a montré que lorsqu'une synapse est formée, l'atteinte de sa forme mature peut prendre plusieurs jours (Dennis *et al.*, 1981).

Phénomènes « régressifs » : mort cellulaire et élimination des synapses :

Bien souvent, avant que les synapses ne soient formées, certaines cellules surnuméraires ou défectueuses sont éliminées sélectivement. Par exemple, la mort cellulaire de certains motoneurones serait due à un manque d'accumulation de facteurs trophiques, tel le NGF, inhibant l'expression et la transcription des « killer protéines », protéines causant la mort neuronale, produites par la cellule (Kuno, 1990). Cette réorganisation sert à assurer une relation numérique appropriée entre les neurones, leurs afférences et leurs cibles.

D'autre part, après la synaptogenèse, pendant la maturation du système, une partie des synapses établies antérieurement sera éliminée. Certains prolongements dendritiques et axoniques régresseront tandis que d'autres synapses se consolideront afin de donner un patron de connectivité mature.

1.3 Développement précoce de la motricité

Si on considère le comportement locomoteur des mammifères, on constate que certains mammifères précoces, comme les ongulés, peuvent supporter leur poids et marcher dès la naissance (Fox, 1964). Il est donc clair que les systèmes moteurs qui sous-tendent la locomotion se développent grandement *in utero* chez ces animaux et cela est aussi vrai chez les mammifères dits non précoces tel le rat (Lakke, 1997), malgré le fait que la locomotion ne se manifeste spontanément que plusieurs jours après la naissance chez cet animal. Afin de mieux comprendre le développement moteur, les chercheurs ont donc été contraints de s'intéresser aux phénomènes embryonnaires.

1.3.1 Développement de l'activité motrice

Concernant les amniotes, plusieurs études d'importance ont été effectuées dans un premier temps sur des embryons de poulet, car l'accès à ces

embryons *in ovo* est relativement facile comparativement aux mammifères. Entre autres, Hamburger et ses collègues ont beaucoup travaillé sur la motricité embryonnaire du poulet au cours des années cinquante et soixante. Ils ont observé que l'embryon montrait une activité motrice de la tête par flexion au niveau du cou à partir du jour 3,5 d'incubation (jour embryonnaire 3,5 : E3,5) et ils ont qualifié cette activité de cyclique (phases d'activité séparées par des phases d'inactivité) et de spontanée (Hamburger, 1963 ; Hamburger & Balaban, 1963). Au cours des stades subséquents de développement la motricité du tronc et des membres s'ajoute dans les cycles d'activité et le ratio période d'activité/période d'inactivité augmente jusqu'à E13 puis tient un plateau jusqu'à E17 avant de redescendre avant l'éclosion. Le caractère spontané attribué à l'activité motrice chez l'embryon de poulet vient des résultats d'une autre étude dans laquelle ils ont démontré que les arcs réflexes impliquant une réponse à des stimuli sensoriels tactiles n'étaient pas développés chez le poulet avant E7 à E7,5 (Hamburger & Hamilton, 1951). En outre, puisque l'embryon de poulet est à l'état naturel dans un œuf, donc protégé de l'extérieur, ils ont supposé que même si les circuits réflexes étaient en place, l'influence de stimuli l'extérieur sur la motricité de l'embryon serait minime avant l'éclosion. En effet, des observations faites sur des embryons E7 et E18 (le poulet éclos au 21^e jour d'incubation) ont montré premièrement que l'activité continuait de façon cyclique et sans changement apparent dans les stades succédant la mise en place des circuits réflexes sensoriels (qui a lieu aux alentours d'environ E7) et, deuxièmement, que les patrons d'activité n'étaient pas modifiés même si on imposait des stimulations

tactiles à l'embryon de poulet entre E7 et E18 (Hamburger, 1963). De plus, Hamburger et ses collègues ont fait d'autres expériences afin de renforcer l'hypothèse que l'activité motrice observée n'était pas de nature réflexogénique. Ils ont observé la motricité d'embryons sur lesquels ils avaient : a) enlevé la moitié dorsale de la moelle épinière au niveau lombaire afin d'éliminer l'influence des afférences sensorielles segmentaires et b) sectionné la moelle au niveau thoracique afin de prévenir les inputs descendants. Leurs premières observations ont été que la forme des patrons d'activité ne changeait pas entre animaux contrôles et opérés, mais que le niveau d'activité semblait diminuer de 10 à 20 % (Hamburger *et al.*, 1966). Pour séparer l'effet des deux interventions chirurgicales, ils ont ensuite fait une série d'expériences où ils ont comparé l'activité motrice d'embryons sur lesquels les deux interventions avaient été effectuées avec celle d'embryons sur lesquels seulement la section de la moelle thoracique avait été faite. Ils n'ont vu aucune différence entre les deux groupes. Ils ont donc conclu que l'activité motrice était générée intrinsèquement par les neurones moteurs ou les interneurons des circuits moteurs dans la moelle épinière, que les boucles réflexes directes ne jouaient pas de rôle dans le déclenchement et dans la forme des patrons d'activité motrice et que les centres supérieurs semblaient contribuer au niveau d'activité sans en être les déclencheurs (Hamburger *et al.*, 1966 ; Decker & Hamburger, 1967). De plus, plusieurs études durant la même période effectuées entre autres par Crain et ses collègues (Crain & Peterson, 1964 ; Crain, 1966) ont démontré que des cellules de moelle épinière en culture pouvaient former des réseaux nerveux

et qu'elles montraient une activité électrique spontanée enregistrable à l'aide d'électrodes électrophysiologiques et ce chez les oiseaux et les mammifères. Toutes ces informations ont amené les chercheurs à vouloir étudier le phénomène d'activité spontanée nerveuse sous-tendant l'activité motrice de l'embryon en développement.

1.3.2 Activité électrique spontanée dans la moelle

Au début des années soixante-dix, Provine et ses collègues (Provine *et al.*, 1970) ont tenté des enregistrements électrophysiologiques *in situ*, dans la moelle épinière d'embryons de poulets à différents âges. À l'aide d'enregistrement à différentes profondeurs de la moelle lombaire et dans différentes régions latéro-médianes, ils ont commencé par mettre en évidence que la région montrant le plus d'activité était comprise dans les deux tiers ventraux de la moelle (correspondant grossièrement à la corne ventrale et à la région d'interneurones se trouvant au-dessus de celle-ci) et ils ont postulé que l'activité électrique enregistrée dans cette région était responsable de la motricité de l'embryon au moins jusqu'au jour E17. Provine *et al.* (1970) ont aussi remarqué que les bouffées d'activités médullaires montraient des paramètres de cycles et de durées similaires à ceux de bouffées d'activité musculaire enregistrées par Boethius (1967). Ils en conclurent que les mouvements embryonnaires des pattes postérieures

étaient probablement la manifestation périphérique de l'activité électrique médullaire.

En 1972, Provine conduisit une étude plus exhaustive sur l'ontogenèse de l'activité spinale du renflement lombaire chez l'embryon de poulet en effectuant des enregistrements à l'aide d'électrodes insérées à partir du côté dorsal jusque dans la partie ventrale de la moelle lombaire. Il observa que l'activité spontanée au niveau lombaire était enregistrable à partir du cinquième jour d'incubation et que cette activité augmentait et se complexifiait de E5 à E13. Par la suite, cette activité diminuait graduellement jusqu'à E20, dernier jour d'incubation (Provine, 1972). De plus, il remarqua que ces données étaient très bien corrélées avec les données connues sur la motricité de l'embryon de poulet tant au niveau de la quantité de l'activité observée que de la complexité de cette dernière (Hamburger, 1963).

La dernière étude de Provine (Provine & Rogers 1977) portant sur l'activité spontanée de la moelle épinière d'embryons de poulet porte sur le rôle des centres supraspinaux sur les patrons d'activité spontanée de la moelle au cours du développement. Grâce à des enregistrements électrophysiologiques à l'aide d'électrodes intraspinales (même technique que leurs études précédentes) au niveau du renflement lombaire d'embryons dont la moelle avait été entièrement sectionnée plus rostralement (« spinalisation »), ils ont pu observer plusieurs similitudes et différences entre les embryons « spinalisés » et les embryons contrôles. D'abord, ils ont vu que l'apparition

de l'activité, son augmentation en durée et en complexité jusqu'à E13 et son association avec les mouvements embryonnaires étaient similaires entre les deux groupes. De plus, ils ont montré que le site de la section spinale (cervicale ou thoracique) n'avait pas d'influence sur la capacité de la moelle lombaire à produire de l'activité électrique, caractéristique qui avait aussi été démontrée avec l'activité motrice par Hamburger et Balaban (1963), Hamburger *et al.* (1966). Provine et Rogers ont aussi noté une diminution de l'activité entre les jours 15 et 19 dans les deux groupes, en accord avec les travaux mentionnés plus haut (Hamburger *et al.*, 1966). Par contre, ils ont observé que la quantité d'activité enregistrée était significativement plus faible chez les embryons « spinalisés » par rapport aux animaux contrôles à tous les âges étudiés. Ils ont donc conclu que les influences supraspinales étaient particulièrement importantes pour le développement comportemental s'effectuant à des stades d'incubation tardifs d'autant plus que, comme d'autres groupes avant eux, ils ont constaté que les comportements moteurs coordonnés des membres postérieurs nécessaires à l'éclosion, et donc à la survie, ne se mettaient pas en place chez les embryons spinaux (Provine & Rogers, 1977 ; Oppenheim, 1972 ; 1973).

Au milieu des années quatre-vingt, un autre axe de recherche portant sur l'activité spontanée et la motricité embryonnaire commençait à prendre de l'ampleur grâce entre autres à O'Donovan et ses collaborateurs. Ils ont porté leur attention particulièrement sur les motoneurones et les interneurones composant les circuits moteurs des membres postérieurs, sur les patrons

d'activation de la motricité embryonnaire et sur le développement de l'alternance entre les muscles fléchisseurs et extenseurs (amenant une motricité de type locomotrice) chez l'embryon de poulet. Dans une étude publiée en 1984, Landmesser et O'Donovan ont montré à l'aide d'enregistrements électromyographiques *in ovo* que, dès le huitième jour d'incubation, les muscles de la cuisse de l'embryon de poulet s'activaient de manière correspondante à leur fonction mature, c'est-à-dire que les muscles agonistes s'activaient en même temps et que les muscles antagonistes s'activaient en alternance. Ils ont aussi démontré que ces patrons moteurs étaient présents dans des préparations de moelle épinière/patte postérieure isolées où les afférences sensorielles ont été supprimées, donc que les patrons moteurs étaient générés centralement par la moelle épinière (Landmesser & O'Donovan, 1984). Par la suite, une série d'enregistrements d'activité au niveau de motoneurones lombosacrés et au niveau des racines ventrales a permis de présenter un modèle hypothétique simple selon lequel les circuits neuronaux sous-tendant la motricité en alternance des muscles antagonistes comprenaient deux groupes d'interneurones : un groupe excitateur projetant à la fois aux motoneurones des groupes musculaires fléchisseurs et extenseurs et un groupe inhibiteur projetant principalement aux motoneurones des fléchisseurs, produisant ainsi l'interruption de décharge et de contraction pour ces muscles, et permettant ainsi l'extension (O'Donovan, 1989). De plus, Wenner et O'Donovan (2001) ont pu apporter des précisions sur les mécanismes initiant l'activité des réseaux chez le poulet en développement par une étude utilisant une technique d'imagerie

calcique. Ils ont observé que les motoneurones et un groupe d'interneurones, appelés les « R-interneurones », semblent jouer un rôle essentiel dans le déclenchement des bouffées d'activité spontanée.

L'activation spontanée de certaines motoneurones serait transmise aux R-interneurones qui, eux, amplifieraient cette activité et assureraient sa propagation au sein de la moelle.

Finalement, dans le cadre de deux études sur le rôle de l'activité spontanée dans le développement précoce chez le poulet, Hanson et Landmesser (2004) ont regardé ce qui se passait lorsqu'on diminuait ou augmentait la fréquence de l'activité spontanée à l'aide d'agents pharmacologiques. D'abord, par des injections chroniques de picrotoxine (un bloqueur des récepteurs GABA_A) à partir du stade 20 de développement (environ jour embryonnaire 3, lorsque les axones n'ont pas commencé leur croissance hors de la moelle), ils ont pu observer que la baisse d'activité engendrée provoquait des erreurs de « pathfinding » dans l'axe dorsoventral des axones sortant de la moelle au stade 24 (~E4). Par la suite, en remplaçant la picrotoxine par de la sarcosine (un activateur des récepteurs à la glycine) dans le traitement des embryons, provoquant alors une augmentation de la fréquence de l'activité spontanée, ils ont pu observer que la croissance dorsoventrale n'était pas affectée, mais que la fasciculation des axones de façon « pool spécifique » et le « pathfinding » antéropostérieur étaient perturbés (Hanson & Landmesser, 2006).

1.3.3 Activité spontanée embryonnaire chez les mammifères

Les recherches effectuées sur des embryons de mammifères ont mis plus de temps à se développer, le travail *in utero* posant plus de contraintes techniques. En 1971, Narayanan, Fox et Hamburger avaient étudié et décrit, un peu comme Hamburger et ses collègues l'avait fait sur le poulet, la motricité spontanée chez l'embryon de rat *in utero* et *ex utero*. Ils ont noté que cette dernière apparaissait à E15 chez le rat, qu'elle augmentait en fréquence jusqu'à E18 puis qu'il y avait une diminution à E19, un patron semblable à ce qui avait été observé sur les embryons de poulets (Hamburger *et al.*, 1966). Par contre, ils ont pu voir que chez le rat, l'activité motrice débutait à un stade de développement général beaucoup plus avancé que chez le poulet. De ce fait, chez les mammifères, il semble que le début de la motricité embryonnaire se passe à la même période que l'apparition des boucles réflexes suite à des stimulations tactiles (Narayanan *et al.*, 1971 ; Saito, 1979). Cependant, ils ont aussi montré que l'activité motrice de l'embryon n'était pas corrélée avec les contractions de l'utérus, probablement le principal stimulus tactile auquel l'embryon de rat pourrait être soumis. La raison pour laquelle il n'y a pas d'activité motrice avant cette période a été mise en évidence en 1981 par un groupe de chercheurs travaillant sur la jonction neuromusculaire des muscles intercostaux chez l'embryon de rat. Ils ont en effet démontré que les nerfs n'atteignaient pas ces muscles avant E13 (Dennis *et al.*, 1981). On peut supposer que les nerfs se dirigeant vers les membres s'installent plus tardivement et qu'il faut plus

de temps pour que les jonctions neuromusculaires soient fonctionnelles, ce qui expliquerait que l'activité motrice ne soit pas observable avant E15. Cependant, des expériences effectuées sur des préparations *in vitro* de moelle épinière isolées ont montré qu'il était possible d'enregistrer de l'activité électrophysiologique au niveau des racines ventrales des renflements cervical et thoracique à E13,5 et au niveau du renflement lombaire à E14,5 (Greer *et al.*, 1992 ; Nishimaru *et al.*, 1996 ; Ren & Greer, 2003).

Des enregistrements électrophysiologiques effectués simultanément des deux cotés de la moelle ou à différents niveaux ont aussi montré que les décharges sont synchronisées entre les jours E13,5 et E17,5. À E18,5, ce type de préparation montre une forte diminution de l'activité spontanée (Nishimaru *et al.*, 1996), à mettre en parallèle avec la diminution d'activité motrice observée par Narayanan *et al.* (1971), tel que mentionné plus haut. Par contre, Greer *et al.* (1992) ont montré qu'en ajoutant des agonistes excitateurs il était possible d'induire une activité électrique de type locomotrice (alternance de l'activité enregistrée simultanément dans les racines droite et gauche à un même niveau spinal) chez les embryons entre E18,5 et E20,5, montrant que les réseaux neuronaux moteurs au niveau de la moelle sont fonctionnels chez le rat dès E18,5. Dans le même ordre d'idée, quelques études utilisant des concentrations ioniques du liquide physiologique différentes de celles qui sont plus près des concentrations physiologiques normales ont réussi à enregistrer de l'activité spontanée sur des préparations *in vitro* de rats néonataux (Fellippa-Marques *et al.*, 2000 ;

Pflieger et al., 2002a,b). De plus, plusieurs études ont depuis la fin du vingtième siècle mis en évidence les neurotransmetteurs et différents récepteurs impliqués, le décours temporel de l'apparition des alternances, etc., mais encore peu de choses sont connues à ce jour concernant le développement des réseaux de neurones qui seront responsables de la locomotion chez l'animal néonatal et surtout le rôle de l'activité spontanée dans leur mise en place chez les mammifères. Cependant, une étude effectuée sur des embryons de souris suggère que, comme chez le poulet, les motoneurones (exhibant un nombre important de collatérales dans les stades précoces de développement) jouent un rôle important dans le déclenchement des bouffées locales d'activité et que des groupes d'interneurones glycinergiques seraient nécessaires pour la propagation de ces bouffées dans le reste de la moelle (Hanson & Landmesser, 2003).

1.4 Le modèle expérimental

Tel que mentionné précédemment, le développement des réseaux moteurs s'effectue en grande partie *in utero* chez les mammifères euthériens, même pour les animaux dits non précoces tel que le rat. Cette caractéristique a posé dans le passé et pose toujours certaines contraintes face à l'étude des phénomènes développementaux responsables de la mise en place des circuits moteurs puisque les animaux sont peu accessibles durant ces étapes précoces. Pour contrer ce problème, nous utilisons comme modèle expérimental l'opossum *Monodelphis domestica*, un marsupial sans

spécialisation motrice qui naît à un stade de développement précoce et qui termine son développement à l'extérieur de l'utérus de la mère. L'accessibilité aux petits à un stade de développement peu avancé permettant l'étude du développement des réseaux moteurs s'en trouve donc grandement facilitée.

1.4.1 Généralités

L'opossum *Monodelphis domestica*, ou opossum brésilien gris à queue courte, est un petit marsupial omnivore mesurant environ 170 à 200 mm de longueur sans la queue et pesant entre 60 et 150g à l'état adulte. À la naissance, soit après 14 à 15 jours de gestation, il mesure 10 mm et pèse environ 100mg. Il est sevré vers l'âge de 50 jours et est mature sexuellement environ 4 mois après la naissance. Il a une longévité d'un peu plus de deux ans en captivité (Cabana, 2000).

Cet animal est facile à maintenir en élevage (Fadem *et al.*, 1982 ; Kraus and Fadem, 1987 ; Cabana, 2000). Chaque animal est gardé dans une cage individuelle où il a accès à de l'eau, de la nourriture, du matériel pour se faire un nid et un tube opaque qui lui sert de cachette. La température doit être maintenue entre 23 et 27 °C et le taux d'humidité au-dessus de 35 % afin d'éviter le dessèchement des oreilles et de la queue. La reproduction en captivité est également facile. Le mâle et la femelle sont placés dans une grande cage et séparés par un grillage afin de les mettre en présence pour stimuler l'œstrus de la femelle tout en minimisant les agressions. Il est

possible d'obtenir des portées durant toute l'année en captivité, une même femelle pouvant en avoir jusqu'à quatre en un an. Chaque portée contient généralement entre 3 et 12 petits.

1.4.2 Développement locomoteur de l'opossum

À la naissance, les pattes antérieures du petit sont suffisamment développées pour permettre des mouvements rythmiques lui permettant de grimper sur l'abdomen de la mère afin d'accéder à une mamelle où il restera accroché pendant un peu moins de 3 semaines. Les membres postérieurs sont presque à l'état de bourgeons embryonnaires et demeurent immobiles (fig2A). Ils commenceront à montrer des mouvements semblables à ceux des pattes antérieures, mais non coordonnés avec celles-ci entre la 2^e et la 3^e semaine postnatale (fig2B ; Pflieger *et al.*, 1996). C'est aussi à ce stade qu'apparaissent la plupart des réflexes sensorimoteurs (fig3 ; Cassidy *et al.*, 1994). À ce stade, si on détache l'animal du ventre de la mère et qu'on le place sur une surface dure, le jeune opossum pourra supporter son poids sur ses pattes avant. À la fin de la troisième semaine postnatale, le petit commence à se détacher de lui-même de la mère. Il peut supporter son poids sur ses quatre pattes ; la locomotion linéaire apparaît, mais elle est lente et peu coordonnée, en partie à cause du mauvais support du poids dû à la position latérale des pattes postérieures (fig2B). Les yeux et les méats auditifs s'ouvrent durant la 5^e semaine postnatale et la coordination entre les

quatre membres lors de la marche apparaît à la 6^e semaine. À la 7^e semaine, le patron locomoteur du jeune opossum a atteint un degré d'expression similaire à celui de l'adulte (Pflieger *et al.*, 1996).

1.4.3 Développement de la moelle épinière de l'opossum

À l'instar de celle de la plupart des autres quadrupèdes, la moelle épinière de l'opossum a la forme d'un tube pourvu de deux renflements hébergeant les corps cellulaires des neurones innervant les membres antérieurs et postérieurs (Petrou, 2007). Chez l'opossum nouveau-né, elle est encore loin d'avoir complété toutes les étapes de son développement, particulièrement dans les segments caudaux. En coupe histologique, on distingue encore facilement au niveau lombaire une épaisse zone germinative autour d'un neurocoele allongé dorsoventralement (fig4) et il est encore possible de voir en microscopie électronique des figures mitotiques dans cette zone germinative (revue dans Cabana, 2000). On y observe une mince zone marginale (matière blanche présomptive) qui indique toutefois que la différenciation de plusieurs cellules a commencé. De plus, chez l'opossum nouveau-né, des études de marquage immunohistochimique ont montré la présence de protéines synaptiques — la synaptophysine, la synaptotagmine-1, et la protéine SNAP-25 — principalement dans la zone marginale (la matière blanche présomptive) de la moelle épinière (fig5 ; Gingras & Cabana, 1999). Au cours des deux premières semaines de développement, le

marquage des protéines synaptiques s'intensifie particulièrement dans la matière grise. À mesure que les axones croissent vers la matière grise et vers la périphérie, on retrouve de moins en moins de marquage des protéines synaptiques dans la matière blanche, ce qui laisse croire que ces protéines seraient associées aux cônes de croissance des axones en développement (Gingras & Cabana, 1999). Le marquage présent dans la matière grise continue de s'intensifier jusqu'à environ P40 puis il y a une diminution jusqu'à environ P65 pour atteindre le patron retrouvé chez l'adulte, et on peut supposer que cette diminution est causée par une élimination de synapses et un raffinement des connexions (Gingras & Cabana, 1999). Pour ce qui est de la myélogénèse, elle ne débute définitivement qu'après la naissance, car il n'est possible de voir du marquage immunohistologique pour des protéines de la myéline (MBP, PLP) sur des coupes transversales de moelle épinière d'opossums postnataux qu'environ au jour P10 (fig6 ; Lamoureux *et al.*, 2005). La myéline se développe lentement jusqu'à l'atteinte du patron de myélinisation de l'animal mature aux environs de P120. Par contre dans la période entre P20 et P40, là où l'animal acquiert et développe rapidement la locomotion quadrupède, il est possible d'observer un développement intense de la myélinisation de la matière blanche et des racines ventrales et dorsales (Leblond & Cabana, 1997; Lamoureux *et al.*, 2005).

1.4.4 Développement de l'innervation des membres

Tel que mentionné précédemment, les membres de l'opossum se développent en grande partie postnatalement. À la naissance, les membres antérieurs sont peu développés, et les membres postérieurs sont à peu près à l'état de bourgeons embryonnaires et immobiles. L'innervation des membres, particulièrement celle des membres postérieurs, s'effectue donc surtout postnatalement.

Chez l'opossum, l'innervation des membres suit un gradient de développement rostrocaudal au niveau de la moelle et des membres et proximodistal au niveau des membres (Barthélemy & Cabana, 2001, 2005). En étudiant l'expression de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine ChAT et de la protéine de transport de l'acétylcholine nouvellement synthétisée (VACHT), les auteurs ont pu mettre en évidence ces gradients de développement ainsi que la relation entre le développement de l'innervation des membres et le développement des motoneurones de la moelle épinière. Pour ce qui est de l'innervation sensorielle, des études de traçage axonal ont montré que, dans les niveaux thoraciques et lombaires, les afférences primaires commencent à envahir la moelle épinière avant la naissance, mais la majeure partie de leur développement se produit sur plusieurs semaines postnatalement (Knott *et al.*, 1999 ; Kitchener *et al.*, 2006). Ces études

mettent l'emphase sur les afférences provenant du tronc, mais on peut supposer que l'innervation sensorielle des membres suit un décours similaire.

1.4.5 Développement des voies propriospinales longues

Les voies propriospinales longues (LDPP) de l'opossum ont fait l'objet d'une étude réalisée par Cassidy et Cabana en 1993. Ces voies ont pour rôle de coordonner les mouvements de la tête (cou), du tronc et des membres durant la locomotion (Miller, 1970 ; Grillner, 1975) en reliant les renflements cervical et lombaire entre eux et en les reliant aux segments cervicaux supérieurs. En utilisant des techniques de traçage axonal, Cassidy et Cabana (1993) ont mis en évidence le développement grandement postnatal de ces voies. En effet au jour P0, quelques afférences provenant de neurones du renflement cervical seulement sont présentes dans le renflement lombaire. À mesure que l'opossum se développe, le nombre de ces projections augmente et les projections des segments cervicaux plus rostraux viennent s'y ajouter. Qualitativement, le développement des LDPP est près du patron adulte vers P17, un âge durant lequel apparaissent des réflexes relayés par les LDPP tel le réflexe de retrait croisé long. Toutefois, la coordination des mouvements entre les membres antérieurs et postérieurs n'apparaît pas avant P35 lors de la marche sur surface plane (Cassidy, 1993). On peut donc supposer que la mise en place de ces projections n'est pas suffisante pour que leurs fonctions soient totalement remplies. D'ailleurs, quantitativement, le nombre de

projections dans les LDPP continuera à augmenter après P35. En plus de l'accroissement du nombre de projections, d'autres phénomènes peuvent aussi jouer un rôle essentiel dans la maturation et l'établissement de toutes les fonctions de ces voies : la maturation des synapses et la myélinisation des axones qui continuent à se développer tardivement.

1.4.6 Développement des voies descendantes et ascendantes

Il est connu qu'une partie du développement de l'encéphale s'effectue après la naissance de l'animal. Suivant ces observations, il a donc été déduit que les prolongements provenant de l'encéphale et allant innervier la moelle épinière (voies descendantes) et ceux voyageant dans la direction opposée (voies ascendantes) n'étaient pas tous développés au jour de la naissance de l'opossum (tableau 1). Plusieurs études utilisant des techniques de traçage axonal ont mis en évidence le développement principalement postnatal des voies reliant l'encéphale et la moelle chez l'opossum (Wang *et al.*, 1992 ; Desrosiers, 1995 ; Pflieger & Cabana 1996 ; Cabana, 2000). Ces études ont montré que seuls les axones provenant de la formation réticulée bulbaire et des noyaux vestibulaires sont, au moins partiellement, présents dans le renflement lombosacré à la naissance de l'opossum. Concernant ces derniers, il a d'ailleurs été montré par Pflieger et Cabana (1996) que seul le noyau latéral du complexe vestibulaire est facilement identifiable sur coupes histologiques à la naissance de l'opossum et que seuls les organes

mausclaires, qui perçoivent l'accélération linéaire, permettraient à l'opossum nouveau-né de recevoir des informations sensorielles l'aidant à s'orienter contre la gravité. Le reste des voies encéphalospinales se développent dans les deux premières semaines postnatales (Wang *et al.*, 1992, revue dans Cabana, 2000). Pour ce qui est des voies ascendantes provenant de la moelle lombaire, elles commencent seulement à atteindre l'encéphale postnatalement, au jour P3, chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Desrosiers, 1995 ; Cabana, 2000).

1.5 Problématique

Nous avons vu précédemment que l'activité spontanée semblait jouer un rôle dans l'établissement des réseaux nerveux moteurs et qu'elle a été étudiée essentiellement chez le poulet et des rongeurs. Ces animaux se développent dans des conditions protégées – œuf ou utérus – et sont relativement matures sur le plan moteur à la naissance. Le poussin est capable de locomotion non assistée dès la naissance, mais le raton peut être incité à se mouvoir sur une surface (Fady *et al.*, 1998). Il n'existe pas d'étude sur l'activité spontanée utilisant des animaux très immatures, comme les marsupiaux, dont le développement moteur, incluant les comportements, se fait presque entièrement en dehors de l'utérus. Ce travail présente une première étape dans la compréhension du rôle de l'activité dans le développement des comportements moteurs précoces chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Nous étudions le développement de l'activité spontanée dans la moelle

épineière grâce à des techniques d'imagerie calcique ainsi que de marquage des cellules spontanément actives à l'aide d'un traceur fluorescent. Nous cherchons à mettre en évidence la présence de cellules actives de la moelle et à déterminer s'il existe un patron de progression de ce phénomène au cours des trois premières semaines postnatales. C'est la première fois qu'une étude de l'activité spontanée de la moelle épinière au niveau des réseaux moteurs sous tendant la locomotion est mise en œuvre chez un marsupial, ce qui amène une perspective nouvelle sur un phénomène jusque-là étudié seulement chez les oiseaux et les mammifères euthériens.

1.6 Méthodologie

Au total, 42 opossums âgés entre P1 et P21 ont été utilisés soit 8 pour l'imagerie calcique et 34 pour les expériences de marquage des cellules actives à la Sulforhodamine-101 (SR101). Pour les différents types d'expériences, les animaux sont d'abord anesthésiés par hypothermie dans un congélateur à -20 °C pendant un temps suffisant pour qu'ils n'aient plus de réflexe suite au pincement de la patte avant ou de la queue. Ils sont éviscérés rapidement puis fixés au fond d'un bain de liquide physiologique oxygéné réduit en calcium (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM et Glucose 15 mM ; oxygéné avec 95 % O₂/5 % CO₂; ajusté à pH 7.4), et la peau ainsi que les muscles au niveau du dos et du crâne sont enlevés. Cette étape est suivie par une

crâniotomie et une laminectomie complète afin d'exposer le cerveau et la moelle entièrement. On procède ensuite à une transection complète rostralement au mésencéphale.

1.6.1 Imagerie calcique

Une série d'expériences d'enregistrements de l'activité des motoneurones a été réalisée par imagerie calcique. Ces expériences visaient deux buts : a) confirmer qu'une activité spontanée nerveuse est bien générée au niveau spinal b) s'assurer de la viabilité des préparations lors de temps postdissection aussi longs (6-8h),

Le calcium Green (Calcium Green TM — 1 dextran 3000 MW, Invitrogen) est une molécule qui a la propriété d'émettre de la fluorescence en proportion de la concentration en ions calcium du milieu dans lequel il se trouve (Bonnot *et al.*, 2005 ; O'Donovan *et al.*, 2005). Il peut être appliqué sur des axones lésés afin d'être transporté rétrogradement jusqu'au corps cellulaire où il s'accumule (Koshiya & Smith, 1999; Takahashi *et al.*, 2002). Il peut ainsi servir d'indicateur de l'activité dépendante du calcium qui a lieu au sein des neurones marqués.

Huit opossums (2x P3, P5, P6, P11, 2x P12, P15) ont été utilisés. Après la dissection telle que décrite plus haut, les spécimens sont placés face ventrale vers le haut dans un bain de liquide physiologique et les nerfs des plexus

brachiaux de part et d'autre de la colonne vertébrale sont dégagés des tissus qui les recouvrent. Les spécimens sont ensuite sortis du liquide, asséchés le plus possible au niveau des membres, en laissant les tissus nerveux humides. Les nerfs sont coupés, bilatéralement, et des cristaux de Calcium Green sont appliqués sur les portions des nerfs proches de la colonne. Après 3-4 minutes, nécessaires au bon captage des cristaux par les axones sectionnés, les spécimens sont remis dans un bain perfusé par du liquide physiologique complet (CaCl_2 2 mM) et oxygéné. Le bain est laissé dans un endroit à l'abri de la lumière pendant des temps variant de 3 à 5 heures selon l'âge de l'animal (les animaux plus vieux sont laissés plus longtemps). Ensuite, les dissections sont terminées par isolation du tronc cérébral et de la moelle du reste de la carcasse et les préparations placées, ventral vers le haut, dans un bain installé sous un microscope à épifluorescence (BX61WIF, Olympus; Filtres : excitation 482/535 nm, émission 536/540 nm) équipé d'une caméra digitale monochrome (Evolution QEI). Le bain est perfusé continuellement par du liquide physiologique complet oxygéné.

La caméra est reliée à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition d'images (Image-Pro Plus, MediaCybernetics). Des séquences d'images montrant les motoneurones au travers de la surface sont prises à des intervalles variables, entre 1 et 28 heures après la dissection, et enregistrées sous forme numériques sur l'ordinateur. Les paramètres des séquences comme le nombre d'images par séquence (100 - 600) et le temps

d'exposition (250 ms - 2s) par image sont ajustés au manuellement au cas par cas.

La fonction « Tracking » du programme Image-Pro Plus permet, entre autres, de mesurer l'intensité lumineuse d'une région d'intérêt. Pour chaque image de la séquence, il est ainsi possible de sélectionner le contour d'un motoneurone sur une image et de mesurer la variation d'intensité lumineuse à l'intérieur de ce contour sur l'ensemble de la séquence (ΔF). L'intensité d'une région contrôle (sans motoneurone), de même superficie, sert de niveau basal de fluorescence (F_0). Cette valeur est soustraite de celle du motoneurone afin de réduire les artefacts dus à la propagation de la fluorescence dans l'épaisseur du tissu. Les données recueillies sont sauvegardées sous format Excel (Microsoft). Les traces sont construites dans ce logiciel grâce à la fonction « Graphique » avant d'être importées dans un logiciel de dessin vectoriel (CorelDraw 12) pour la réalisation des figures.

1.6.2 Expériences de marquage à la Sulforhodamine-101

Afin de pouvoir localiser les cellules spontanément actives dans la ME, une technique de marquage à la sulforhodamine-101 (SR101) a été utilisée. La SR101 est une molécule fluorescente qui est endocytosée au niveau des terminaisons synaptiques des cellules et qui est transportée de façon rétrograde jusqu'au soma (Lichtman *et al.*, 1985 ; Teng *et al.*, 1999). L'incorporation de cette molécule est proportionnelle au niveau d'activité, ce

qui signifie que la quantité de marquage représente bien le niveau d'activité cellulaire. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre puisqu'il suffit de perfuser la SR101 en solution dans un liquide physiologique pour obtenir le marquage des cellules actives (Kjaerulff *et al.*, 1994 ; Cina & Hochman, 2000). De plus, aucune contre-coloration subséquente du colorant n'est nécessaire pour pouvoir observer le marquage ; il est visible directement en épifluorescence. Ceci permet de visualiser directement les cellules sur coupes et d'effectuer d'autres manipulations, par exemple du marquage immunohistochimique (Cina & Hochman, 2000).

Les animaux sont anesthésiés et les dissections sont réalisées tel que décrit précédemment. Ensuite, selon les expériences, le névraxe est soit laissé dans la carcasse (préparations « *in situ* »), soit retiré de celle-ci (préparation isolée). Les préparations sont ensuite fixées au fond d'un bain perfusé avec un liquide physiologique oxygéné réduit en calcium pendant une heure afin de laisser un temps de repos postchirurgical aux spécimens. Puis, la solution de perfusion est remplacée par un liquide physiologique oxygéné complet additionné d'une concentration de 2 $\mu\text{mol/L}$ de SR101 (Invitrogen). Après six heures de perfusion, un rinçage d'une heure est effectué par circulation de liquide physiologique oxygéné réduit en calcium. Les spécimens sont ensuite fixés par immersion dans une solution de paraformaldéhyde 4 % dans un tampon phosphate (*Phosphate Buffer*, PB) pour un minimum de huit heures à 4 °C. Après fixation, les névraxes des préparations « *in situ* » sont isolés. Tous les spécimens sont cryoprotégés par immersion dans une solution de

sucrose 30%/PB 0,1 M, pH 7,35 à 4 °C, avant d'être enrobés et congelés dans un composé OCT (Tissue Tek) et conservés à -80 °C. Des coupes transverses (30 µm d'épaisseur) des renflements — cervical et lombaire — de la moelle épinière sont faites à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont montées sur lames de verre Superfrost (Fisher) et recouvertes d'une lamelle en utilisant du Fluoromount-G (Southern Biotech) comme milieu de montage.

1.6.3 Immunohistochimie

Avant le montage, certaines lames sont traitées immunohistochemiquement afin d'identifier les neurones et comparer le marquage neuronal avec le marquage à la SR101. Les lames sont d'abord rincées avec un tampon Tris (0,5 mM) contenant du Triton X-100 (0,3 %) et du NaCl (1,5 %) (TBST) pendant 20 minutes. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, Chemicon International) agissant contre NeuN, une protéine neuronale, à une concentration de 2 µg/ml dilué dans du TBST contenant du NGS (Normal Goat Serum, Fisher; 5 %) pendant 24 heures. Puis après 3 lavages de 20 minutes (TBST), elles sont incubées pendant 3 heures avec l'anticorps secondaire « anti-mouse » couplé à l'Alexa 488 (Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488, Invitrogen; 1 :400). Le fluorophore Alexa 488 a été choisi car il émet dans le vert, ce qui permet de bien le distinguer de la SR101 qui émet dans le rouge.

1.6.4 Analyse des résultats

Les coupes transverses de moelle épinière sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse E6000). Une évaluation qualitative du type de cellules marquées à la SR101 et de leur localisation dans la moelle et le bulbe est effectuée. À celle-ci s'ajoute une évaluation quantitative du nombre de cellules et de leur localisation. Une cellule n'est comptée qu'une fois si on peut la retrouver exactement au même endroit sur une coupe adjacente, ce qui n'a été que très rarement observé. La position des cellules dans la moelle est notée. Les décomptes cellulaires sont exprimés en « nombre de cellules par mm de tissu » donc par mm de longueur de la moelle, et ce, pour deux raisons. D'abord, cela donne une mesure relative qui prend en compte l'allongement de la moelle et l'accroissement du nombre de cellules total. De plus, cela permet de pouvoir effectuer un décompte sur des spécimens où une partie de la moelle serait abîmée. Nous avons considéré faire les décompte par mm^3 seulement après réflexion sur la façon d'effectuer un tel travail, nous avons conclu que le mince surplus de précision que cette valeur amènerait comparé au mm de longueur ne valait pas le temps et les efforts méthodologiques requis pour de telles mesures. Les données quantitatives des décomptes et du positionnement sont compilées sous forme de graphiques. Des photos numériques des coupes ont été prises à l'aide d'une caméra (QImaging Micropublisher 3,3) reliée à l'ordinateur équipé du logiciel d'acquisition

Figure 1

Moelle épinière de mammifère : A) vue dorsale mettant en évidence les renflements cervical (RC) et lombaire (RL) et les racines spinales ; B) coupe transverse colorée au Nissl, mettant en évidence la matière blanche (MB) et la matière grise (MG) contenant les neurones ainsi que la forme caractéristique de cette dernière.

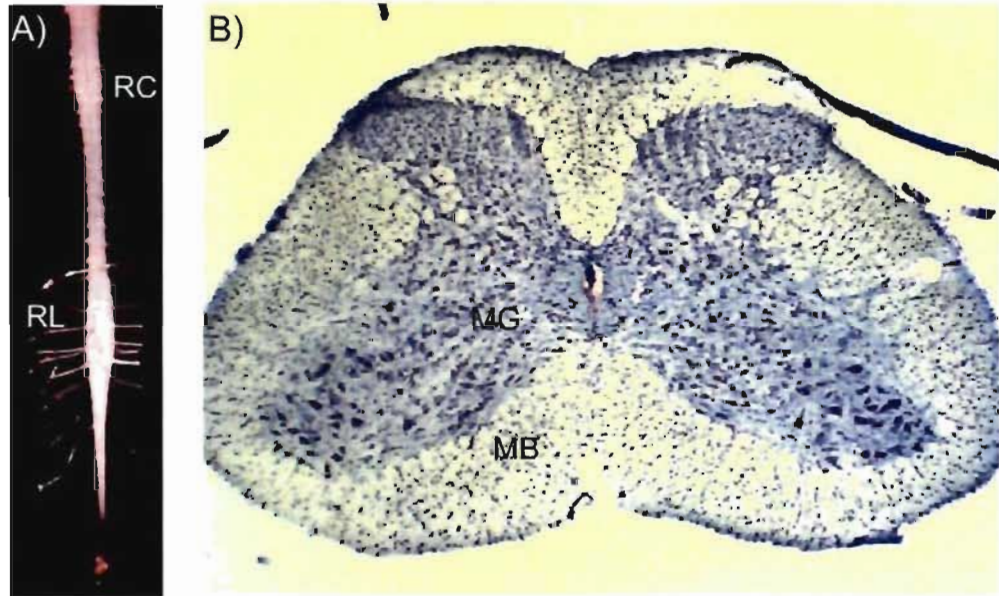


Figure 2

Opossums *Monodelphis domestica*

au jour de la naissance (P0, A) et jour 20 postnatal (P20, B)

A)



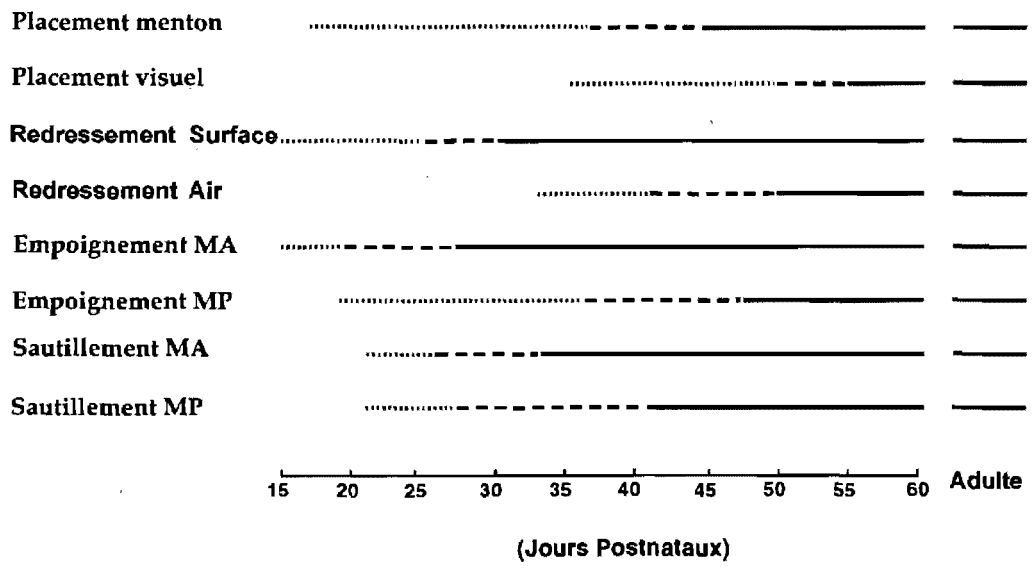
B)



Figure 3

Représentation graphique du déroulement temporel de la mise en place de quelques réflexes chez l'opossum *Monodelphis domestica* au cours du développement.

(Modifié de Petrou, 2007 et Cassidy *et al.*, 1994)



... réflexe exprimé moins de 80 % des essais
 __ réflexe exprimé entre 80 % et 99 % des essais
 ___ réflexe exprimé 100 % des essais

Figure 4

Coupe transverse du renflement lombaire d'une moelle épinière d'un opossum nouveau-né. Abréviations : VZ : zone germinative (ou ventriculaire), IZ : zone intermédiaire, MZ : zone marginale (matière blanche présomptive).

Échelle : 100 μm (Modifié de Cabana 2000)

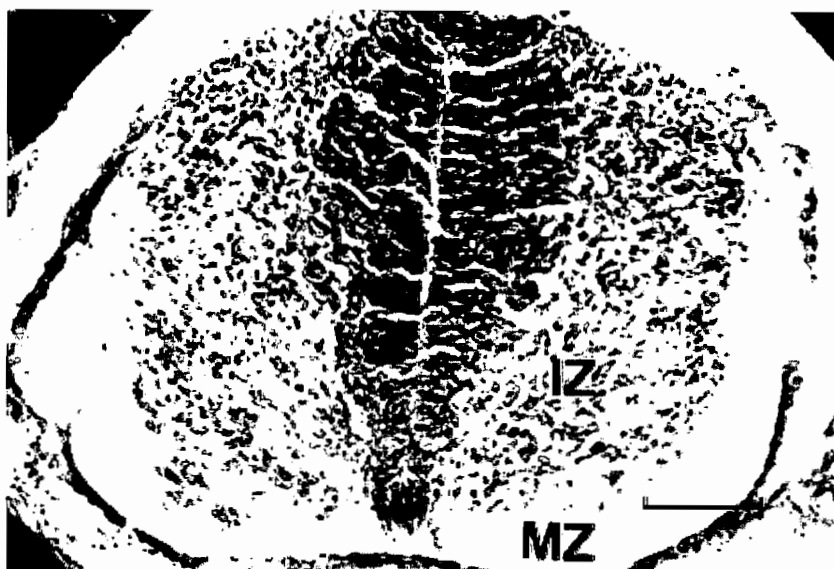


Figure 5

Expression de la synaptophysine au cours du développement de l'opossum néonatal. Coupes transversales dessinées à la caméra lucida dans le renflement cervical (Br, moitié gauche) et lombaire (LS, moitié droite) à différents âges postnataux (P) et au stade adulte (Ad). Échelle : 200 μ m

(Modifié de Gingras & Cabana, 1999)

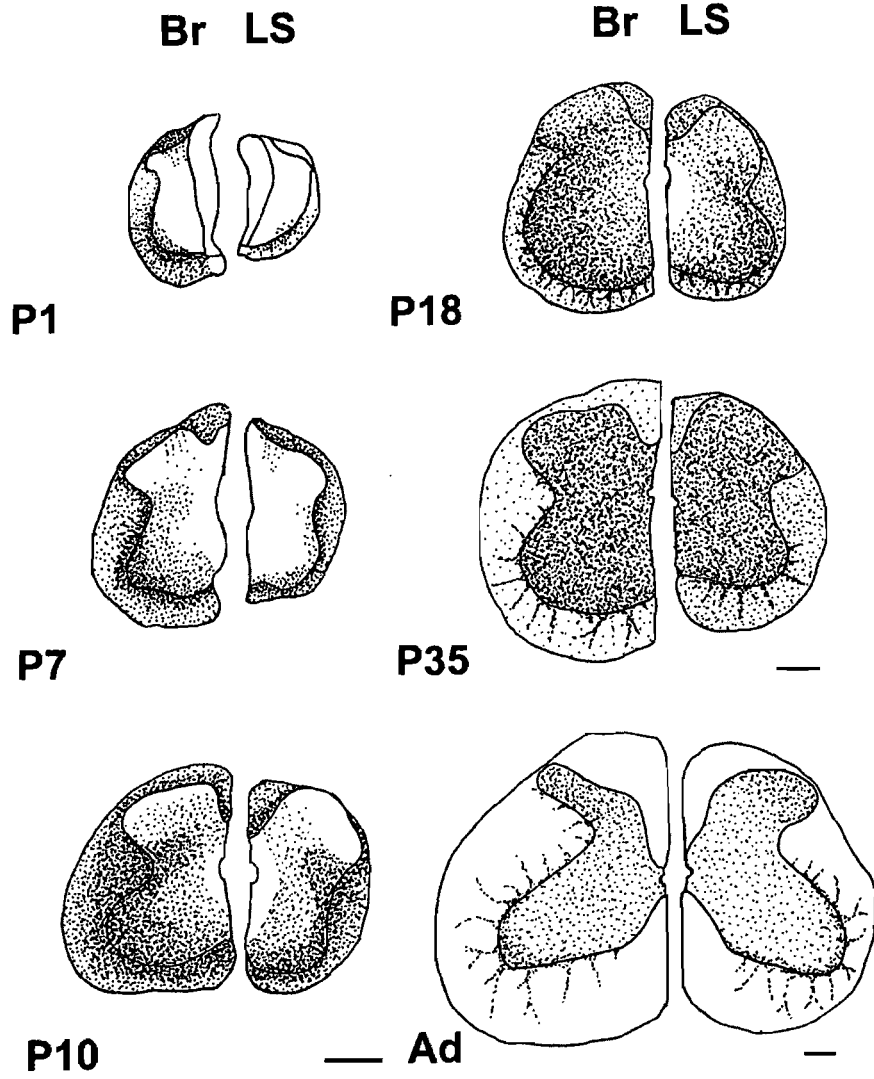


Figure 6

Expression de la « myelin basic protein » (MBP, moitié droite des moelles épinières) et de la « proteolipid protein » (PLP, moitié gauche des moelles épinières) au cours du développement de l'opossum néonatal. Coupes transversales dessinées à la caméra lucida dans le renflement cervical (BR, à gauche) et dans le renflement lombaire (LS, à droite) à différents jours postnataux (P) et au stade adulte (Ad). Abréviations : VZ : zone germinative (ou ventriculaire), IZ : zone intermédiaire, MZ : zone marginale (matière blanche présomptive). Échelle : 200 μm

(Modifié de Lamoureux *et al.*, 2005)

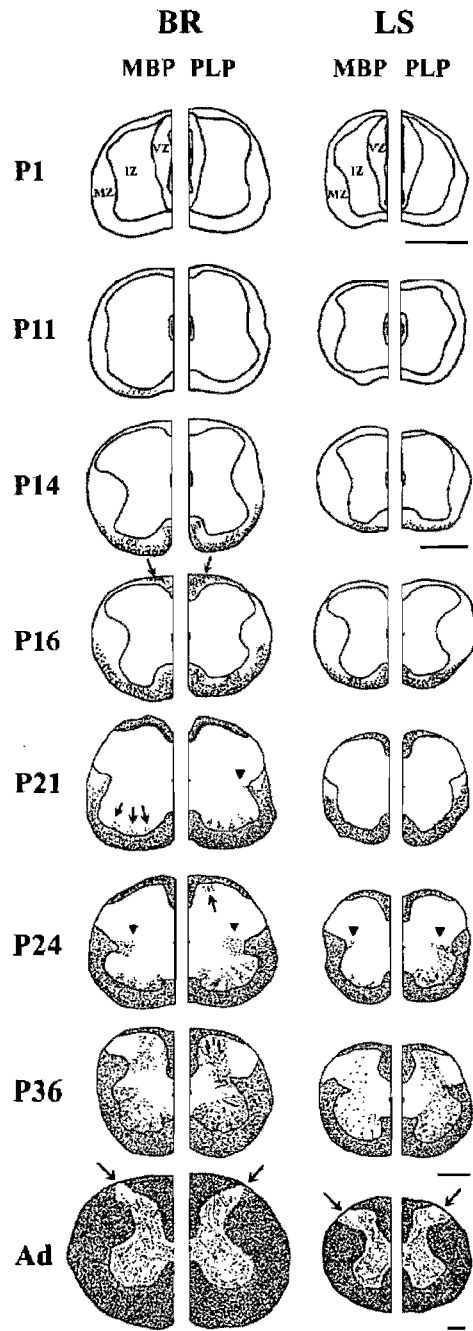


Tableau I : Âge initial d'apparition des voies descendantes au niveau de la moelle épinière et des voies ascendantes au niveau de l'encéphale chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Modifié de Cabana, 2000)

Origine	Terminaison	Âge
C5-T1, laminae VII-VIII	Renflement lombaire	Prénatal
C5-T1, laminae V-VI	Renflement lombaire	P2-3
C1-C4, laminae VII-VIII	Renflement lombaire	P2-3
C1-C4, laminae V-VI	Renflement lombaire	P5-6
C1-T1, lamina IV	Renflement lombaire	P5-6
C1-T1, lamina X	Renflement lombaire	P11-12
Noyau vestibulaire latéral	Renflement lombaire	Prénatal
Formation réticulée médullaire	Renflement lombaire	Prénatal
Noyaux vestibulaires médiaux-inférieurs	Renflement lombaire	P2-3
Formation réticulée ponto-mésencéphalique	Renflement lombaire	P1-3
Noyau rouge	Renflement lombaire	P5-7
Renflement lombaire	Formation réticulée médullaire	P3-4
Renflement lombaire	Noyau gracilis	P3-4
Renflement lombaire	Noyau réticulé latéral	P3-4
Renflement lombaire	Noyau vestibulaire latéral	P3-4
Renflement lombaire	Formation réticulée ponto-mésencéphalique	P4-5
Renflement lombaire	Olive inférieure	P4-5
Renflement lombaire	Tectum ventrocaudal	P11-12
Renflement lombaire	Complexe thalamique ventrobasal	P11-12

2 ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT LORS DE CE TRAVAIL

En préparation, sera soumis à Brain Research.

Title: Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: A study using Sulforhodamine-101,

Authors: Annie Lavallée and Jean-François Pflieger

Affiliation: Département de Sciences biologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Number of pages : 33

Number of figures : 5

Number of tables : 2

Corresponding Author:

J.-F. Pflieger,

Département de Sciences biologiques,

Université de Montréal, C.P. 6128,

Succ. Centre-ville,

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Tel : +1 514 343 6847

Fax : +1 514 343 2293

Email : 

Abstract

Using calcium imaging techniques and active cell Sulforhodamine-101 (SR101) labeling on *in vitro* preparations, we have investigated the development of spontaneous activity in the spinal enlargements of a marsupial, the opossum *Monodelphis domestica*. Following retrograde transport of Calcium Green dye to the motoneurons of the spinal enlargements, we were able to show the presence of spontaneous calcium waves activating the entire motor columns. Secondly, after exposing the spinal cord from animals at different ages to SR101, we were able to locate active cells within the spinal cord. In one day old opossums, few SR101 labeled cells were observed in the cervical enlargement but none in the lumbar enlargement. At the second stage studied, postnatal day 5 (P5), SR101 labeling increased in number and appeared in the lumbar enlargement. Motoneurons were the major cell type labeled but we were unable to count them with accuracy. Therefore, we focused our quantitative study on the other cell types showing SR101 labeled. Their number in both enlargements increased steadily from P5 up to a peak at P12 and then gradually decreased until the last age examined, P21. The developmental expression of spontaneous activity, as evidenced by the number of labeled cells, follows a pattern similar to what has been reported in other vertebrate species like chicken or rats. However, contrary to the opossum, spontaneous activity in these species seems to disappear before birth. This study is a first

step to understanding the role of spontaneous activity in the development of spinal networks underlying motility in the opossum.

Classification terms

Section: 2. Nervous System Development, Regeneration and Aging

Keywords: development, locomotion, mammals, neuroanatomy

Acknowledgments

This project was undertaken by A.L. in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree. This work is supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Foundation for Innovation and the Université de Montréal to J.-F.P. We thank K. Pedneault for technical assistance.

Introduction

Spontaneous activity, a rhythmical activity intrinsically generated by the networks through which it propagates, is a widespread phenomenon in the developing central nervous system (CNS) of vertebrate (reviews in Ben Ari, 2001; Feller, 1999; O'Donovan, 1999). It has been particularly studied in the visual system of mammals, a late-developing system, where it plays a significant role in the formation and reinforcement of synapses and in the refinement of neuronal networks (see Katz and Shatz, 1996; Zhang and Poo, 2001) and in the hippocampus and neocortex (review in O'Donovan, 1999). Does spontaneous activity have similar roles in early-maturing systems like the spinal motor networks?

In the adult spinal cord, the basic rhythmic activity underlying locomotion is generated by interneuronal networks defined as central pattern generators (CPGs) located within the cervical and lumbar (or lumbosacral) enlargements, where limb-innervating motoneurons are also located (reviews in Goulding and Pfaff, 2005 ; Falgairolle *et al.*, 2006 ; Grillner, 2006 ; Kiehn, 2006). In rats, spontaneous activity can be recorded in ventral roots from embryonic day (E) 13.5 to E19.5 (Ren and Greer, 2003), and the spinal networks can produce an alternating rhythm similar to locomotor activity at E18.5 (Nishimaru and Kudo, 2000). A similar temporal expression of spontaneous activity as been reported in the mouse (Branchereau *et al.*, 2000; Yvert *et al.*, 2004) and chick (O'Donovan *et al.*, 1998) embryos. Pharmacological perturbation of spontaneous activity results in disturbance of motoneuron pathfinding

(Hanson and Landmesser, 2004, 2006), and synaptic drive (Gonzalez-Islas and Wenner, 2006), indicating that spontaneous activity plays a role in motor circuitry. Some authors have recorded spontaneous activity in neonatal rats after using different ionic concentrations in the bathing physiological solution that what is thought to be functional physiological concentrations (Fellippa-Marques *et al.*, 2000; Pflieger *et al.*, 2002a,b) but under normal concentration, in mice and rats, spontaneous activity has been reported to disappear before birth (Yvert *et al.*, 2004; Ren and Greer, 2003) and the same observations were made on chicks embryos (Provine, 1972). These are able to locomote at birth with the 4 limbs, at least when postural constraints are removed (swimming, "air walking") or when they are strongly stimulated (Fady *et al.*, 1998). In contrast, marsupials, such as the small opossum *Monodelphis domestica* that has served as a model for developmental studies of motor system (reviewed in Cabana 2000), are born very immature and most of their motor development occurs postnatally. Could there be spontaneous activity related to locomotion in their spinal enlargement after birth, such as has been demonstrated electrophysiologically in thoracic/ lower cervical cord for respiration (Zou, 1994; Eugenin & Nicholls, 1997)?

We have investigated the expression of spontaneous activity in the spinal cord of opossums *Monodelphis domestica*, which are born in a very immature state, comparable to an E14 rat (Saunders *et al.*, 1989, 1995; Nicholls *et al.*, 1990). The newborn of this species performs automatic rhythmic movements with its forelimbs which enable it to reach the mother's nipples, where it

attaches for about three weeks, and the hindlimbs only start moving in the second weeks (Cassidy *et al.*, 1994; Pflieger *et al.*, 1996). Only few afferents from the brain have reached the cord in the newborn (Wang *et al.*, 1992), suggesting that the forelimbs movements of the newborn opossum is largely a spinal mechanism. In *in vitro* preparations, the isolated nervous system from postnatal opossums can be kept until around P20 (Nicholls *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1991). In order to study the expression of spontaneous activity in this specie, we have used calcium imaging and bath application of Sulforhodamine-101 (SR101), a neuroanatomical marker of activity that is collected at active synaptic sites and retrogradely transported to cell bodies. The intensity of SR101 labeled cell has been shown to be proportional to the intensity of their activity (Teng *et al.*, 1999). This molecule has already been employed as a label of neuronal activity after induced locomotor rhythm in *in vitro* spinal cord preparations of neonatal rats (Kjaerulff *et al.*, 1994; Cina and Hochman, 2000).

Part of this work as been presented in an abstract from (Lavallée and Pflieger, 2007).

Results

Spontaneous activity in the spinal cord

Figure 1A shows a ventral view of the cervical spinal cord of a P5 opossum in which motoneuronal columns have been retrogradely labeled with Calcium Green. Fluctuations of calcium concentration, reflected by changes in

fluorescent emission (ΔF) of the dye, were observed overtime in the majority of the motoneurons along the whole columns (Fig. 1B-D). Such fluctuation of activity was recorded in all 8 specimens between P3 and P15 from about 1 h to up to 28 h after dissection. These results indicate that spinal motoneurons at cervical level are spontaneously active in postnatal opossum's spinal cords. It also gives us an indication that the preparations can be maintained viable in these experimental conditions for that period of time.

SR101 labeling

The most obvious type of SR101 labeled cells were motoneurons (Fig. 2A,B). They were characterized by relatively large and multipolar somas clustered in the ventral part of grey matter and they presented positive immunolabeling for NeuN, a neural protein (Fig. 2C,D). At all ages studied, motoneuron labeling occurred at the cervical level, and from P5 onwards at lumbar levels. Labeling occurred both in "*in situ*" and in isolated preparations, suggesting that in neonatal opossums, motoneurons are able to take up SR101 without the established neuromuscular junctions, probably by way of intraspinal collaterals. This contrasts with SR101 labeling experiments in neonatal rats, where spinal motoneurons were showed no or faint labeling when their muscular connections were removed (Kjearulff et al., 1994 ; Cina and Hochman, 2000). Motoneuronal labeling was generally strong but the tracer tended to leak from their somas, blurring cells contours and making counting difficult and unreliable.

Other labeled cells tended to be smaller and devoid of special features (Fig. 2E-H). They were round shaped and sometimes they showed thin neurites. They were found almost equally in the ventral and dorsal grey matter and did not show obvious clustering. Most of these cells were immunopositive for NeuN (arrows in Fig. 2F-H) but some of them were not (arrowheads in Fig. 2F-H). This suggests that in addition to interneurons, some glial cells (probably astrocytes; Nimmerjahn *et al.*, 2004) were able to incorporate SR101.

A few labeled cells were also observed in the caudal part of the brainstem of specimens exposed to SR101 (Fig. 3A-D). Their somas were relatively large in size. They were immunopositive for NeuN. Their position in the brainstem and clustered organization suggest that they were motoneurons belonging to the hypoglossal motor nucleus.

Expression of spontaneous activity over time

As mentioned earlier, labeled motoneurons were observed in the spinal cord at every age studied but quantification proved unreliable. Other cells were counted in the cervical and lumbar enlargements. Because of the developmental change in length of the cord, and the occasional loss of sections during processing of the slides, we consider that estimating the density of cells per mm of tissue offers a better way to compare data than the absolute number of cells per enlargement. However, an estimation of the absolute numbers is given (see Table 1).

Table 1 and Figure 4 show that, either at the cervical or the lumbar enlargements, the average number of labeled cells per mm of tissue increases steadily and significantly with age ($P < 0.0001$, one-way Anova with Bonferroni's post-tests; significant differences between all pairs are given in Table 1) until P12 and then decrease thereafter. At cervical level, the density range goes from 0.7 ± 0.14 (P1) to 47.0 ± 1.95 cells/mm (P12); at lumbar level, the density range is from no cell labeled at P1 to 25.8 ± 1.36 (P12). At P16, last age studied where labeled cells were observed, the density was 3.5 ± 0.96 and 5.5 ± 1.56 cells/mm for the cervical and lumbar enlargements, respectively. No cell was labeled in the two P21 specimens but it could not be determined if it was due to the lack of spontaneous activity or to the poor survival of the preparations.

Our results (Table 1, Fig. 4) suggest that spontaneous activity appears first at the cervical level and a few days later in the lumbar enlargement and that the overall expression of this activity is stronger first rostrally and then caudally. Such a spatiotemporal time lag could be reflected by the absence of labeling at the lumbar level at P1, the significant difference in labeling between cervical and lumbar enlargements at P12 and P14 ($P < 0.0001$, one-way Anova with Bonferroni's post-test; Table 1) and the higher labeled cell density at lumbar level at P16. At other ages, there is no statistical difference between the density of labeled cell in cervical and lumbar enlargements.

Influence of sensory feedbacks

Results given in Table 1 were obtained from isolated and *in situ* preparations. As motoneuronal spontaneous activity of *in situ* preparations can induce movements resulting in sensory feedback, we examined whether there were differences in the labeling between the two conditions. We pooled the data from two homogeneous age groups (P5-P9 and P12-P14, see Table 1) in order to improve the statistical value of the analysis. In the cervical enlargement, there is no significant difference ($P > 0.05$, t-test) in the number of labeled cells per mm of tissue for the four ages at which such a comparison was possible (Table 2 and Fig. 5). No difference is found even at P12, the age when spontaneous activity (as expressed in number of labeled cells) is stronger. An absence of statistical difference was also found for the lumbar enlargement (not illustrated). This suggests that sensory feedback may not be sufficiently important to influence the activity generated centrally. Also, the absence of statistical difference supports the pooling of the data obtained in the two kinds of preparations.

Influence of the brainstem

An experiment was conducted to evaluate if descending projections from the brain influence spinal spontaneous activity. In non-sectioned preparations (brainstem attached) the average density of labeled cells was higher than sectioned ones (respectively, 12.7 ± 2.45 vs. 8.1 ± 0.96 cells/mm; $P > 0.5$, t-test). The difference was most important at the cervical level (15.4 ± 4.36 vs. 8.2 ± 1.86 cells/mm for non-sectioned and sectioned, respectively; $P > 0.5$, t-

test) than at the lumbar level (10.7 ± 3.32 vs. $.97 \pm 1.06$ cells/mm for non-sectioned and sectioned, respectively; $P > 0.5$, t-test). As none of these differences were significant, we conclude that spontaneous activity is mainly generated in the spinal cord in the opossum. This does not preclude a supporting role for descending projections.

Discussion

The purpose of the present study was to characterize the spontaneous activity present in the spinal cord of the postnatal opossum *Monodelphis domestica*. Using calcium imaging and recording calcium waves occurring in cervical spinal motoneurons, we have documented the occurrence of a widespread spontaneous activity in the cord, not restricted to the lower cervical and thoracic cord where respiratory network are found. Such waves have been related to physiological activity in a large number of neural networks (Koshiya and Smith, 1999 ; Wenner and O'Donovan, 2001 ; Bonnot *et al.*, 2005). Using SR101 labeling, we have been able to show that motoneurons are the primary cell type that is spontaneously activated but that other cells are also active. We demonstrated that this activity is generated within the spinal cord and does not originate from the descending projections of the brain or brainstem. Finally we have shown that its intensity varies with age, increasing to a peak around P12 and decreasing thereafter.

Generators of spontaneous activity

In our experiments, motoneurons constitute the cell type that was the most consistently labeled by SR101 and they are clearly spontaneously active as shown by calcium imaging. This suggests that motoneurons play an essential role in the triggering and propagation of spontaneous activity in the opossum spinal cord. Wenner and O'Donovan (2001), using electrophysiological recordings and calcium imaging, showed that generation and propagation of spontaneous activity in the spinal cord of the embryonic chick results largely from synaptic interactions between motoneuron and Renshaw-like interneurons (so-called R-interneurons). The latter are innervated by intraspinal motoneuron collaterals. Hanson and Landmesser (2003) studied electrophysiologically and pharmacologically the expression of spontaneous activity in the mouse spinal cord and proposed that motoneurons are the main generators of this activity, either by reciprocal interactions between motoneurons or by interactions with GABAergic interneurons. In our study, we did not find a cluster of labeled cells that would suggest a population of specific interneurons interacting with motoneurons to generate and propagate spontaneous activity. This does not preclude the possibility that such a population exists and has been masked by motoneurons or that its cells are too faintly labeled to be discernible. Further investigations are required to test if this is the case.

Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord

It has been shown (Zou, 1994 ; Eugenin and Nicholls, 2000) that spontaneous activity related to respiration could be recorded in the low cervical and thoracic spinal cord of the postnatal opossum. We investigated the possibility of a more widespread activity in the spinal cord that could affect the maturation of neural networks underlying locomotion. At birth, we found only few labeled cells restricted to the cervical enlargement, suggesting a weak spontaneous activity at this level only. With age, labeled cells appeared at the lumbar enlargement and their number increased in both enlargements throughout the entire spinal cord, suggesting that the level of activity intensifies with time until it peaks at P12-14. Thereafter, the activity decreases, perhaps following a slight rostrocaudal gradient of disappearance.

The development of descending projections from the brainstem to the lumbar spinal cord in the opossum was studied for the cervical enlargement and lumbar enlargement (Wang *et al.*, 1992). At birth, only a few descending projections, mainly originating from the bulb, have reached the cervical enlargement. Most of them will develop postnatally. The rubrospinal axons are the last descending projections to reach the lumbar enlargement. The first ones arrive by P4-6 but they continue to install during the second and third postnatal weeks. The development of ascending projections from the lumbar cord to the brain occurs also mostly during the two first postnatal weeks (Cassidy and Cabana, 1993 ; Desrosiers, 1995 ; see review in Cabana, 2000). Even if developing descending projections could potentially increase

the intensity of activity in the cord, our results suggest that it is not the case as removing supraspinal influences does not change significantly the number of labeled cells in the cord.

Comparison with other species

Spontaneous activity has been observed in other species as being mostly prenatal. In the chick embryo, in the lumbar enlargement, electrical activity is recorded from E5 to a peak at E13 and then it decreases up to E20 the day before hatching (Provine, 1972). In the mouse (Yvert *et al.*, 2004) spontaneous activity can be recorded respectively between E12.5 at all levels and E17.5 at lumbar level. In the rat it appears in the cervical enlargement at E13.5 and is last recorded at E18.5, in the lumbar enlargement (Nishimaru *et al.*, 1996 ; Ren and Greer, 2002). However, spontaneous activity has been recorded in similar preparations from postnatal rats (Fellippa-Marques *et al.*, 2000 ; Pflieger *et al.*, 2002a,b). A newborn opossum is at a stage of development comparable to an E14 rat (Saunders *et al.*, 1989 ; Nicholls *et al.*, 1990 ; Saunders *et al.* 1995). It seems that the spontaneous activity starts in both these mammal species approximately at the same stage of development. However, we have shown that the disappearance of this activity is delayed at least up to 16 days after birth, whereas in the rat this activity lasts for 5 days after it begins. There may be a distinction in the role this activity plays during development of marsupials as it is maintained through a longer period of time after birth.

Methodological considerations

Two major problems may arise with the use of SR101 on immature preparations: the identification of cell types which are labeled and the underestimation of active cells due to immaturity of endocytotic mechanisms. Regarding the SR101-labeled cell types, Teng et al. (1999) showed in a study on endocytosis that SR101 was a sensitive activity-dependent probe taken up by nerve terminals in endocytic active zones. Moreover, in a study on pharmacologically evoked locomotion, Cina and Hochman (2001) used immunolabeling with neuronal and glial markers on sections from *in vitro* preparations of rat spinal cord exposed to SR101; they found that only cells expressing neuronal markers were labeled. In our immunolabeling experiments, non-neuronal cells also absorbed SR101 (arrowheads in figure 2F-H) in addition to neurons. Recent experiences showed that astrocytes could be labeled by SR101 in *in vivo* mouse neocortex (Nimmerjahn et al., 2004). The specificity of SR101 for neurons is thus questionable. However, our results indicate that it is still possible to use SR101 to document the expression of spontaneous activity. Regarding the second consideration with SR101 that endocytosis could be less efficient in immature neurons, it is possible that this would lead to underestimate the active cell population. Our results showed that, with the exception of motoneurons, only a small number of cells are labeled, even at the ages where such labeling is maximal (P12-P14). However, if neuron immaturity influenced notably cell labeling, one would expect that the averages of labeled cells in the lumbar enlargements should be closer to that observed at cervical levels in more mature

specimens. Indeed, there is a rostrocaudal gradient of maturation in the spinal cord, and cells at lumbar levels are more immature than those at cervical ones in younger specimens (Cassidy *et al.*, 1994). But this difference in maturity becomes less marked with time. By contrast, our results showed an important difference between the number of cell labeled respectively in the cervical and lumbar enlargements at more mature ages, when spontaneous activity is maximal. Moreover, even if an underestimation of active cell populations cannot be excluded it would probably not change the developmental pattern of expression described in this study.

This work is a first step in understanding how spontaneous activity affects the development of spinal motor networks and how its expression in a marsupial species differs from what is observed in other vertebrates, especially eutherian mammals. As opossum preparations allow long-term *in vitro* study, it will be interesting to see how modifying spontaneous activity would impact on motor networks development in this species.

Experimental Procedures

Specimens and dissections:

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). A total of 48 opossums aged between P1 and P21 were used for the experiments (P0 = day of birth), 8 for the calcium imaging experiments and 40 for the SR101 experiments. In both sets of experiments, opossums were detached from the mother, deeply anaesthetized by hypothermia, eviscerated and pinned on a Sylgard-lined petri dish filled with a physiological solution in which the calcium concentration was halved in order to reduce the excitability of the preparations (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM and glucose 15mM; oxygenated with 95% O₂ / 5% CO₂; pH 7.4). During the experiments, the calcium concentration was increased to its normal value (CaCl₂ 2 mM). The brains and spinal cords were then exposed by craniotomy and laminectomy, and a complete section was made rostral to the mesencephalon. All dissections and experiments were done at room temperature (21-24°C).

Calcium imaging experiments

To verify the presence of cellular activity in these preparations, calcium imaging recordings were made using Calcium Green dextrans (Calcium Green -1 3000 MW, Invitrogen) in eight opossums (2x P3, P5, P6, P11, 2x P12, P15). The dissected preparation were pinned ventral side up and the nerves innervating the forelimbs were exposed with microscissors. The bath was emptied and excess fluids over the ventral part of the preparation were removed with a filter paper. The nerves of the brachial plexus were transected

and crystals of Calcium Green were applied on their proximal stump. The central nervous system was kept humid by applying droplets of physiological solution. After 3 to 4 minutes, time needed to ensure capture of the dye by the axons, the specimens were placed back in a bath perfused with a normal oxygenated physiological solution. The preparations were left in the dark for 3 to 5 hours of transport time, depending on the specimen's age and size. The hindbrain and spinal cord were then isolated and pinned ventral side up in a bath perfused with oxygenated normal physiological solution. The bath was placed under an epifluorescence microscope (BW61WIF Olympus; filter for FITC: Ex. 482-535 nm, Em. 536-540 nm) equipped with a monochrome digital camera (Evolution QEI) coupled to a PC.

Image sequences of the unstimulated ventral cord were acquired and digitized with an image analysis software (Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics). The exposure time and number of frames in each sequence were adjusted as needed. The change in fluorescence intensity (ΔF) was analyzed with the same software: regions of interest (AOI) of same areas were drawn over identifiable motoneurons or groups of motoneurons, and the light intensity was measured for all frames in the sequence. A region of the grey matter without cell served as fluorescence baseline level (F_0). The traces were reconstructed using Microsoft's Excel software and the figures were prepared with CorelDraw 12.

SR101 labeling experiments:

A total of 34 opossums were used (4xP1, 4xP5, 10xP9, 4xP12, 4xP14, 4xP16, 4xP21). The dissections were done as described previously and the neuraxis were either left *in situ* (enclosed in the spine and cranium) or isolated. The preparations were transferred to a bath dorsal side up and perfused with oxygenated calcium-reduced physiological solution for 1 hour to recover from the stress of dissection. The medium was then changed for a normal oxygenated physiological solution to which SR101 (2 mg/L; Invitrogen) was added. The preparations were left unstimulated for 6 hours, after which they were rinsed in SR101-free solution for an hour before being fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB 0.1 M). They were immersed in a 30% sucrose solution (PB 0.1 M) overnight for cryoprotection and cut (30 μ m) transversally with a cryostat and mounted on slides. Some sections were processed to label neurons with a specific antibody. They were first incubated (24 h) with mouse anti-Neuronal Nuclei (NeuN) monoclonal antibodies (2 μ g/ml PB; Chemicon Internationnal), washed with PB and incubated (3 h) with an anti-mouse antibody coupled to Alexa-488 (5 μ g/ml in PB; Invitrogen). The slides were coverslipped with Fluoromount (Southern Biotech).

The sections were observed under a microscope (Nikon E600) equipped for epifluorescence (Filters: G-2A (Ex 510–560 nm, DM 575 nm, Em 590 nm (LP)) for SR101; B-2A (Ex 450–490 nm, DM 505 nm, Em 520 nm (LP)) for Alexa-488). Motoneurons were identified by their position in the grey matter,

their size and their general form but their density was too high to make counting possible. However, other SR101-labeled cells were counted in each animal and their position in the grey matter was noted. Labeled cells were counted only once when they were found at the exact same location on two adjacent sections. The number of cells per mm of spinal cord in both enlargements was averaged for each age studied.

Brainstem influence on SR101 labeling

One SR101 labeling experiment was done to verify the influence of descending projections from the brainstem. *In situ* preparations were made from six animals (P9) from the same litter and dissections were done as described previously. In half of them (n=3), complete sections were made at the obex and all encephalon tissues were removed. The rest the experiment was conducted as described previously and labeled cells were counted the same way. The number of cells per mm of spinal cord in both enlargements was averaged for each condition studied.

Statistical analysis was made with statistic software (Prism 5.01, GraphPad) for all results. Number in the text, figures and tables are given as average \pm s.e.m.

Photomicrographs for calcium imaging and SR101 labeling experiments were acquired with a digital color camera (QImaging) coupled with an image analysis software (Image-ProPlus 5.1, Media Cybernetics). They were left untouched except for cropping. The figures were prepared with Photoshop CS2 (v9.0.2).

Literature references

- Ben-Ari, Y., 2001. Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosciences*. 24, 353-60.
- Bonnot, A., Mentis, G.Z., Skoch, J., O'Donovan, M.J., 2005. Electroporation loading of calcium-sensitive dyes into the CNS. *Journal of Neurophysiology*. 93, 1793-808.
- Branchereau, P., Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B., Chapron, J., Viala, D., 2000. Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Research Bulletin*. 53, 711-8.
- Cabana, T., 2000. The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Research Bulletin*. 53, 615-26.
- Cassidy, G., Cabana, T., 1993. The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research Developmental Brain Research*. 72, 291-9.
- Cassidy, G., Boudrias, D., Pflieger, J.F., Cabana, T., 1994. The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior & Evolution*. 43, 244-53.
- Cina, C., Hochman, S., 2000. Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*. 423, 590-602.

- Desrosiers, C., 1995. Ontogénèse des voies spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum, *Monodelphis domestica*. M.Sc. Thesis, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal.
- Eugenin J. Nicholls JG. 1997. Chemosensory and cholinergic stimulation of fictive respiration in isolated CNS of neonatal opossum. *Journal of Physiology*, London. 501:425-37.
- Eugenin, J., Nicholls, J.G., 2000. Control of respiration in the isolated central nervous system of the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research Bulletin*. 53, 605-13.
- Fadem, B.H., Trupin, G.L., Maliniak, E., VandeBerg, J.L., Hayssen, V., 1982. Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science*. 32, 405-9.
- Fady, J.C., Jamon, M., Clarac, F., 1998. Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Brain Research Developmental Brain Research*. 108, 111-23.
- Falgairolle, M., de Seze, M., Juvin, L., Morin, D., Cazalets, J.R, 2006. Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *Journal of Physiology*, Paris. 100, 304-16.
- Feller, M.B., 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron*. 22, 653-6.
- Fellippa-Marques S, Vinay L, Clarac F. (2000) Spontaneous and locomotor-related GABAergic input onto primary afferents in the neonatal rat. *European Journal of Neuroscience*, 12:155-164.

- Gonzalez-Islas, C., Wenner, P., 2006. Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates AMPAergic and GABAergic synaptic strength. *Neuron*. 49, 563-75.
- Goulding, M., Pfaff, S.L., 2005. Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*. 15, 14-20.
- Grillner, S., 2006. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*. 52, 751-66.
- Hanson, M.G., Landmesser, L.T., 2004. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*. 43, 687-701.
- Hanson, M.G., Landmesser, L.T., 2006. Increasing the frequency of spontaneous rhythmic activity disrupts pool-specific axon fasciculation and pathfinding of embryonic spinal motoneurons. *Journal of Neuroscience*. 26, 12769-80.
- Katz, L.C., Shatz, C.J., 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*. 274, 1133-8.
- Kiehn, O., 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*. 29, 279-306.
- Kjaerulff, O., Barajon, I., Kiehn, O., 1994. Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity *in vitro*. *Journal of Physiology*. 478, 265-73.
- Koshiya, N., Smith, J.C., 1999. Neuronal pacemaker for breathing visualized *in vitro*. *Nature*. 400, 360-3.

- Kraus, D.B., Fadem, B.H., 1987. Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science*. 37, 478-82.
- Lavallée, A., Pflieger, JF, 2007. A study of the expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums using Sulforhodamine-101 *in vitro*. Society for Neurosciences. Abstract, 132.17, San Diego, November.
- Nicholls, J.G., Stewart, R.R., Erulkar, S.D., Saunders, N.R., 1990. Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained *in vitro*. *Journal of Experimental Biology*. 152, 1-15.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N.D., Helmchen, F., 2004. Sulforhodamine-101 as a specific marker of astroglia in the neocortex *in vivo*. *Nature Methods*. 1, 31-7.
- Nishimaru, H., Kudo, N., 2000. Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Research Bulletin*. 53, 661-9.
- O'Donovan, M.J., Wenner, P., Chub, N., Tabak, J., Rinzel, J., 1998. Mechanisms of spontaneous activity in the developing spinal cord and their relevance to locomotion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 860, 130-41.
- O'Donovan, M.J., 1999. The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*. 9, 94-104.

- Pflieger, J.F., Cabana, T., 1996. The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy & Embryology*. 194, 75-88.
- Pflieger, J.F., Clarac, F., Vinay, L., 2002a. Picrotoxin and bicuculline have different effects on lumbar spinal networks and motoneurons in the neonatal rat. *Brain Research*. 935, 81-6.
- Pflieger, J.-F., Clarac, F., Vinay, L., 2002b. Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal development in the rat. *Journal of Neuroscience*. 22, 5108-17.
- Provine RR. (1972) Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Research*, 41:365-378.
- Ren, J., Greer, J.J., 2003. Ontogeny of rhythmic motor patterns generated in the embryonic rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*. 89, 1187-95.
- Saunders, N.R., Adam, E., Reader, M., Mollgard, K., 1989. *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anatomy & Embryology*. 180, 227-36.
- Saunders, N.R., Deal, A., Knott, G.W., Varga, Z.M., Nicholls, J.G., 1995. Repair and recovery following spinal cord injury in a neonatal marsupial (*Monodelphis domestica*). *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 22, 518-26.

- Stewart, R.R., Zou, D.J., Treherne, J.M., Møllgård, K., Saunders, N.R., Nicholls, J.G., 1991. The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity. *Journal of Experimental Biology*. 161, 25-41.
- Teng, H., Cole, J.C., Roberts, R.L., Wilkinson, R.S., 1999. Endocytic active zones: hot spots for endocytosis in vertebrate neuromuscular terminals. *Journal of Neuroscience*. 19, 4855-66.
- Wang, X.M., Xu, X.M., Qin, Y.Q., Martin, G.F., 1992. The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research Developmental Brain Research*. 68, 203-16.
- Yvert, B., Branchereau, P., Meyrand, P., 2004. Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *Journal of Neurophysiology*. 91, 2101-9.
- Zhang, L.I., Poo, M.M., 2001. Electrical activity and development of neural circuits. *Nature Neuroscience*. 4 Suppl, 1207-14.
- Zou, D.J., 1994. Respiratory rhythm in the isolated central nervous system of newborn opossum. *Journal of Experimental Biology*. 197, 201-13.

Tables

Table I: Average (\pm s.e.m.) of SR-101 labeled cells in both cervical and lumbar enlargements of the opossum spinal cord at different ages.

Age (P)	Level	Density (cell/mm)	Total number of cells (estimated)	N	Statistical analysis #
1	Cervical	0,68 \pm 0,14	2,50 \pm 0,50	n=4	a
	Lumbar	0	0		b
5	Cervical	11,40 \pm 2,56	46,20 \pm 9,34	n=5	c
	Lumbar	7,80 \pm 1,59	29,40 \pm 6,52		d
9	Cervical	20,67 \pm 2,55	97,83 \pm 15,28	n=6	a, b, d**, e
	Lumbar	9,83 \pm 1,40	38,50 \pm 5,41		f
12	Cervical	47,00 \pm 1,95	194,40 \pm 19,23	n=5	a, b, c, d, e**, f, g
	Lumbar	25,80 \pm 1,36	136,80 \pm 7,74		a, b, c**, d, f, g, h
14	Cervical	37,00 \pm 4,71	230,00 \pm 25,10	n=4	a, b, c, d, e**, f, i
	Lumbar	14,25 \pm 5,96	68,00 \pm 30,83		b*, g
16	Cervical	3,50 \pm 0,96	14,75 \pm 3,30	n=4	e, g, h, i
	Lumbar	5,50 \pm 1,55	24,50 \pm 8,15		e**, g, h, i
21	Cervical	0	0	n=2	e**, g, h, i
	Lumbar	0	0		e**, g, h, i

One-way Anova with Bonferroni's post-tests; each letter

represents significant difference between groups: no asterisk, $P <$

0.0001, * $P <$ 0,01, ** $P <$ 0,05.

Table II: Average (\pm s.e.m.) of SR-101 labeled cells in isolated or *in situ* cervical enlargements of the opossum spinal cord for two age groups.

Age group	Density (cell/mm) Isolated		Density (cell/mm) <i>In-situ</i>		Statistical analysis #
P5/P9	16,0 \pm 2,96	n=6	17,0 \pm 3,85	n=5	n.s.
P12/P14	40,5 \pm 5,42	n=4	44,2 \pm 3,01	n=5	

Unpaired t-test. n.s.: non significant.

Figure legends

Figure 1: Calcium imaging of spontaneously active motoneurons in the cervical spinal cord of a P5 opossum. A: Low magnification of the ventral cord showing Calcium Green labeled motoneurons; the inset indicates the location where photomicrographs shown in B were taken. B1-4: Frames taken at four different times. The blue and yellow circles in B1 surround the cells analyzed in graphs (C-D). The red circle surrounds a region arbitrarily chosen as fluorescence baseline level (F0). B1'-4': The same frames treated with false colors to accentuate visual variations in intensity. C,D: Spontaneous variation in intracellular calcium concentration as represented by change in fluorescence (ΔF) in the two motoneurons shown in B1. Intensity is represented after removal of the baseline values ($\Delta F - F_0$; C) or in fraction of the latter ($\Delta F/F_0$; D). The red lines represent the frames of the photomicrographs in B. Similar spontaneous variations of calcium concentration were observed in all specimens studied. Scale bar in A and B is 50 μm .

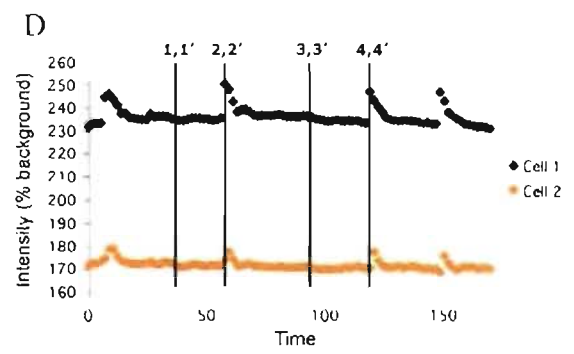
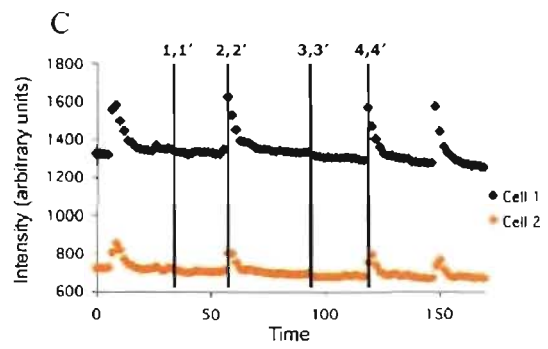
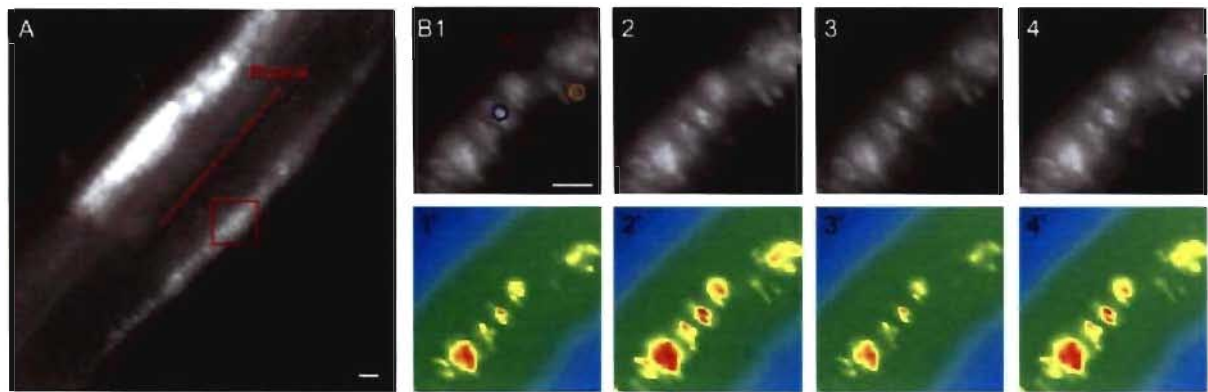
Figure 2: Sulforhodamine-labeled cells in the spinal cord. A,E: Composite transverse sections of the cervical cord of P12 opossums showing on the left half the border of the grey matter (dashline) and on the right half NeuN labeling. The red insets in the left halves show the approximate location of photomicrographs (B-D or F-H, respectively). B,C,D: Labeled motoneurons.

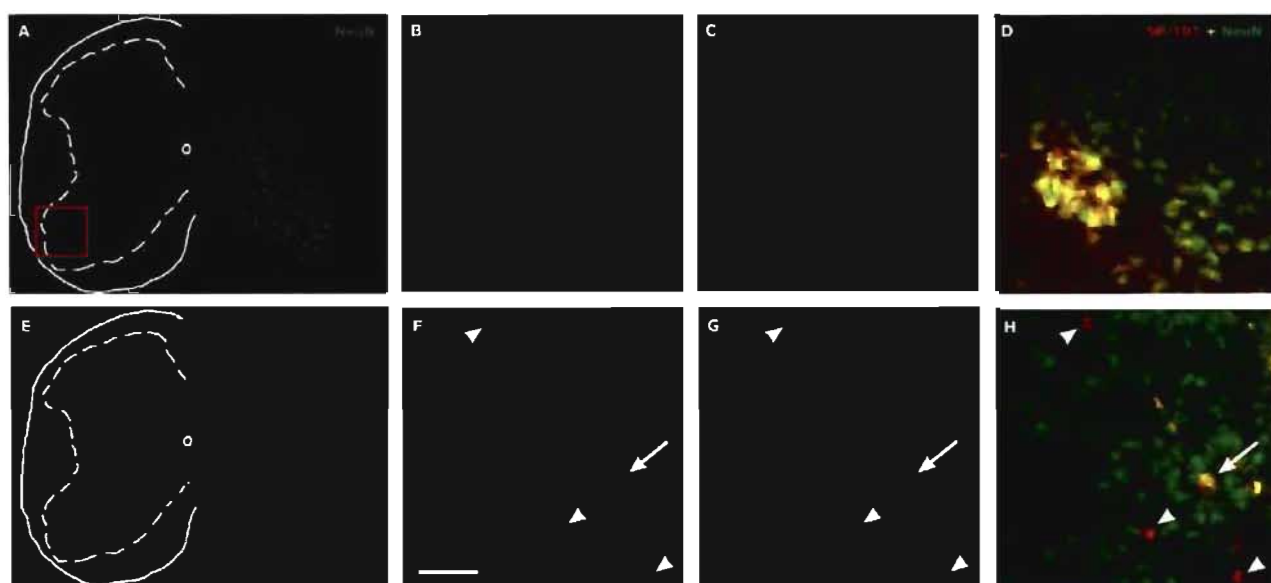
F,G,H: Interneurons (arrow) and putative glia (arrowheads). Scale bar in F: 150 μm for A,E and 50 μm for all others.

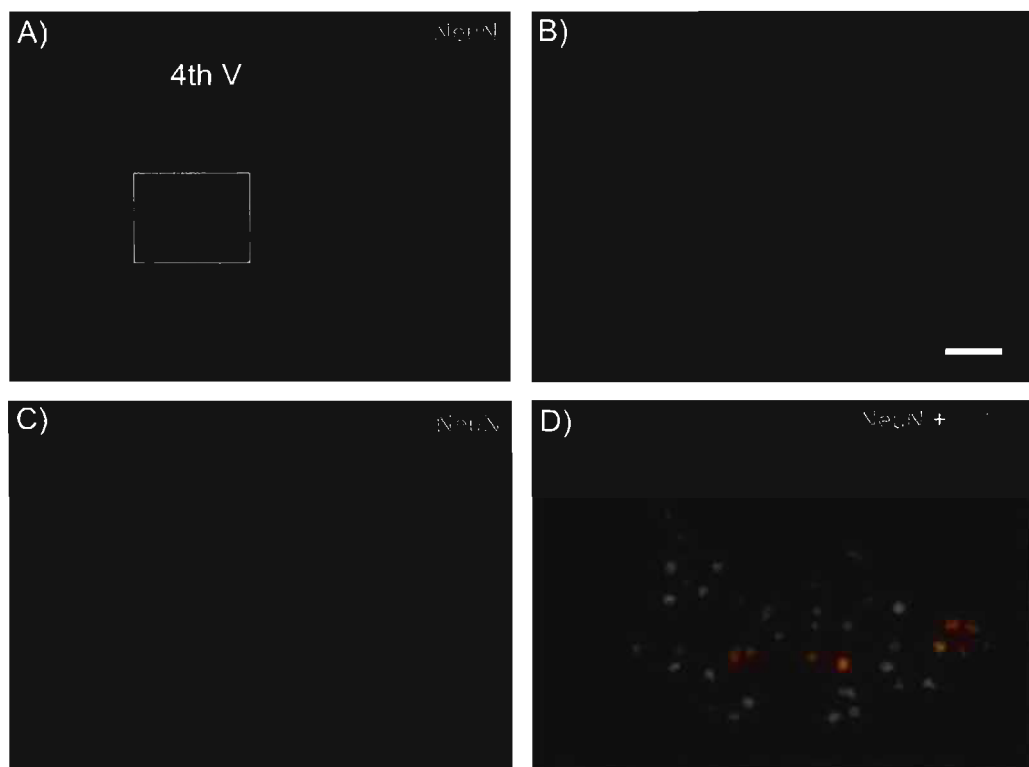
Figure 3: Sulforhodamine-labeled cells in the brainstem. A: Transverse section of the brainstem of a P5 opossum labeled for NeuN showing the edge of the 4th ventricle (4th V) (dashed outlines). The inset indicates area enlarged in B,C,D. B-D: labeled neurons. Scale bar in B is 200 μm for A and 50 μm for all others.

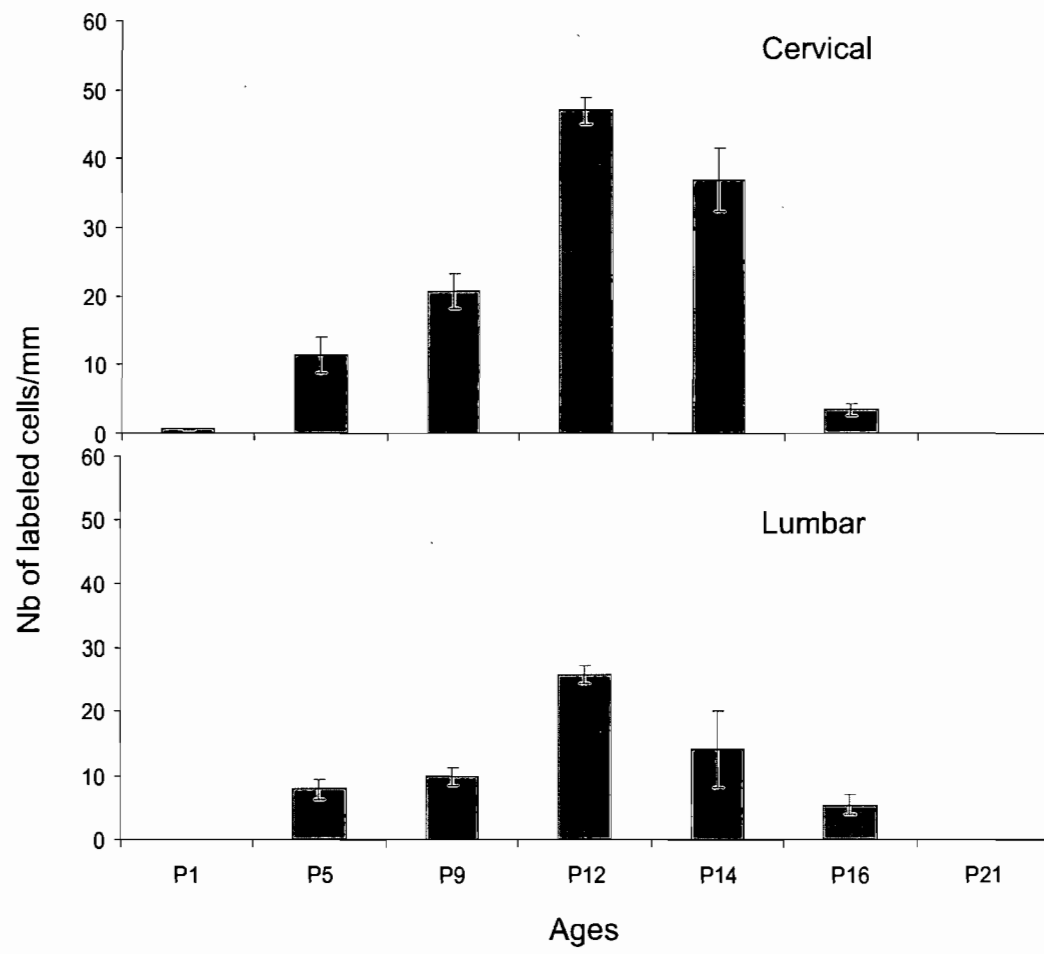
Figure 4: Average (\pm s.e.m.) of SR-101 labeled cells per mm of tissue in both cervical (upper graph) and lumbar (lower graph) enlargement of the spinal cord at different ages.

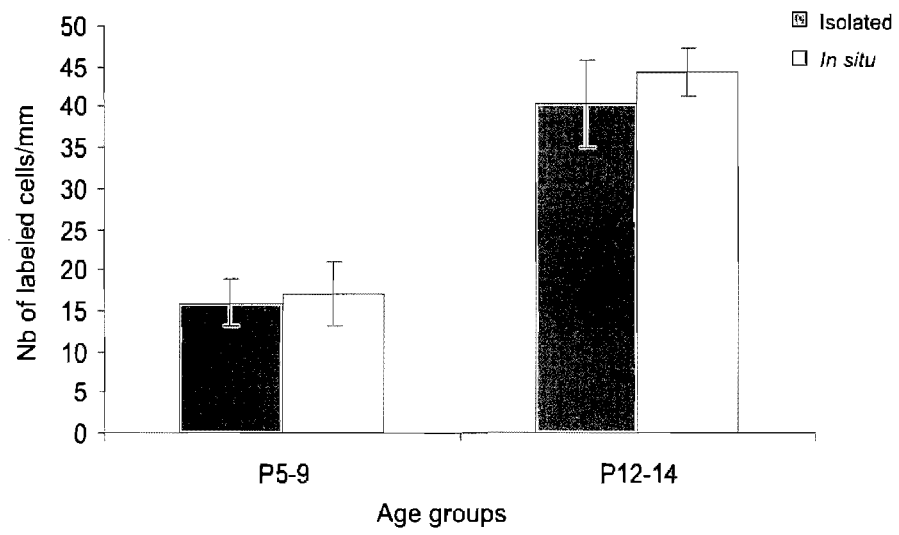
Figure 5: Average (\pm s.e.m.) of SR-101 labeled cells per mm of tissue in isolated (filled box) or *in situ* (blank box) cervical enlargements of the spinal cord for two age groups.











3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'immaturation à la naissance de l'opossum *Monodelphis domestica* en fait un bon modèle pour des études portant sur le développement précoce. Tel que décrit en introduction de ce travail, la moelle épinière est encore grandement en formation, la plupart des voies reliant la moelle à l'encéphale se développent postnatalement, les synapses s'établissent principalement après la naissance, et la myélinisation se déroule entièrement postnatalement, ce qui permet d'avoir un accès facile à ces étapes de développement. De plus, il est possible avec ce modèle de mettre en relation ces différents phénomènes avec le développement comportemental puisque ce dernier est facilement observable, sans même la présence d'un marsupium, et bien documenté dans la littérature. Connaissant l'existence d'un phénomène d'activité spontanée dans la moelle épinière d'animaux embryonnaires chez des mammifères naissant à des stades de développement plus avancés que l'opossum, nous nous sommes intéressés à l'expression postnatale de ce phénomène chez ce dernier.

Le but de cette étude était la caractérisation anatomique de l'activité spontanée dans la moelle épinière de l'opossum néonatal. Nous voulions voir s'il existait chez ce modèle expérimental un patron de développement de cette activité et commencer à poser des hypothèses sur le rôle de cette dernière dans le développement moteur et comportemental cet animal.

3.1 Aspects techniques

La technique d'imagerie calcique utilisée lors de ces expériences a permis de mettre en évidence le phénomène d'activité spontanée au niveau des motoneurones de la moelle épinière et d'apprécier sa forme en bouffées activant toute la colonne motrice à la fois. Toutefois, l'élaboration de ce protocole a demandé plusieurs essais et erreurs. Malgré le fait que l'imagerie calcique soit une technique éprouvée en neurobiologie développementale, plusieurs types de protocole ont été utilisés par différents auteurs sur différentes préparations et certains se sont avérés difficiles à réaliser. Nous avons dû faire l'essai de plus d'un produit fluorescent et de plus d'une technique d'exposition du tissu nerveux au produit avant d'obtenir des résultats concluants. Nos premiers essais ont été faits avec du Fluo-4 AM (Invitrogen). Le tissu nerveux était disséqué puis plongé durant environ 15 minutes dans du liquide physiologique contenant le Fluo4. Après plusieurs essais ainsi que quelques manipulations de double marquage des motoneurones à l'aide de SR101, nous avons pu constater que cette façon de faire ne permettait pas l'absorption du Fluo4 par les motoneurones. En effectuant quelques recherches dans la littérature, nous avons opté pour une technique de marquage rétrograde à l'aide de cristaux plutôt que de fluophore liquide (voir méthodologie). Par contre, même une fois le protocole établi, la réalisation de celui-ci demandait quelques manipulations et dissections difficiles, au point que certaines expériences n'ont pas fonctionné.

Cependant, malgré ces difficultés techniques, nous avons réussi à recueillir suffisamment de résultats intéressants pour les besoins de cette étude.

Dans le même ordre d'idée, l'utilisation d'une technique de marquage anatomique des cellules à l'aide de la SR101 permettant de montrer plus clairement de quelle façon cette activité variait au cours du développement précoce de l'opossum a aussi posé quelques problèmes techniques. D'abord, les temps d'exposition au produit ainsi que la concentration de produit à utiliser afin d'obtenir des résultats optimaux ont dû être établis par essais et erreurs avant de commencer à recueillir des résultats. De plus, les dissections à réaliser présentaient une autre source de difficultés techniques puisque le tissu nerveux en développement est très fragile. De ce fait, plusieurs spécimens abîmés n'ont pu être considérés dans les résultats. Par ailleurs, nous avons basé notre protocole expérimental sur des études effectuées sur du tissu nerveux et montrant une spécificité d'absorption du produit par les cellules neuronales (Teng *et al.*, 1999 ; Cina & Hochman, 2000), mais nous avons remarqué suite à des tests immunohistochimiques de double marquage des neurones (SR101 et marqueur neuronal NeuN) que certaines cellules ayant absorbé la SR101 n'étaient pas des neurones, mais plus probablement des cellules gliales. Malgré ce fait, nous avons pu observer des variations significatives dans le nombre de cellules montrant du marquage aux différents âges étudiés, ce qui nous laisse penser que, malgré le manque de spécificité neuronale, le marquage à la SR101 semble être un bon indicateur de l'activité spontanée.

Finalement, la dernière contrainte majeure en ce qui a trait à l'expérimentation est venue du fait que l'observation au microscope à épifluorescence des cellules marquées, surtout aux âges les plus précoces, est relativement difficile. Aux plus jeunes âges, les cellules sont très petites, donc pas toujours faciles à distinguer. De plus, le tissu présente une autofluorescence relativement forte, de sorte que le contraste entre les cellules ayant absorbé le produit et le tissu environnant n'était pas toujours très grand. Cette caractéristique a principalement posé problème lors de la prise de photographies. Pour les décomptes, une grande attention a été portée sur les lames provenant des animaux les plus jeunes pour éviter des erreurs dues à ce problème. De plus, une attention particulière a été mise sur les coupes adjacentes où nous retrouvions une cellule exactement à la même position dans la matière grise. Dans de tels cas, nous prenions le temps de nous assurer que c'était bien une cellule, et non deux, et, le cas échéant, la cellule vue deux fois n'entrait dans le décompte qu'une seule fois.

3.2 *Développement de l'expression de l'activité spontanée*

Les expériences réalisées en imagerie calcique nous ont permis de voir l'activité spontanée des motoneurones. De plus, lors des expériences de marquage à la SR101, nous avons pu observer que le principal type de cellules marquées était les motoneurones, leur identification se faisant par leur forme caractéristique, leur taille et leur emplacement dans la matière

grise. Ceci nous amène à croire que les motoneurones doivent avoir un rôle important dans l'occurrence de ce phénomène. Certaines études ont suggéré que les motoneurones jouaient un rôle de déclencheurs lors d'épisodes d'activité spontanée, notamment chez la souris (Hanson & Landmesser, 2003) et le poulet (Wenner & O'Donovan, 2001). Hanson et Landmesser (2003) ont pu montrer que les motoneurones de la souris en développement possédaient plusieurs collatérales qui les reliaient entre eux et aux interneurones, ce qui pourrait aider à la genèse et à la propagation des bouffées d'activité au niveau des colonnes motrices de la moelle en développement. Nos résultats nous permettent de croire que des collatérales de motoneurones existent aussi dans la moelle épinière de l'opossum. En effet, le nombre élevé de motoneurones marqués dans les spécimens où la moelle était complètement isolée, donc où les racines (et terminaisons axonales de la jonction neuromusculaire) étaient sectionnées, laisse supposer que le traceur devait être capté par les terminaisons des collatérales présentes au niveau de la moelle. Le rôle qu'occuperaient les motoneurones dans la genèse de l'activité spontanée n'est pas encore clair mais ces résultats sont intéressants et constituent une première étape vers la compréhension de ce phénomène.

En plus des motoneurones marqués par la SR101, nous avons fait le décompte et noté la localisation dans la matière grise des autres cellules qui présentaient du marquage à la SR101. Ce faisant, nous avons montré que l'activité spontanée était présente à la naissance de l'opossum, mais au

niveau du renflement cervical seulement. Elle apparaît ensuite dans le renflement lombaire au deuxième âge étudié, P5, son expression augmente dans les deux renflements jusqu'à un maximum aux alentours de P12 puis diminue graduellement. Ce genre de patron de développement, cette forme en cloche, est semblable à ce qui a été observé par l'observation visuelle ou par des techniques d'enregistrements électrophysiologiques chez le poulet, le rat et la souris (Provine, 1972 ; Nishimaru *et al.*, 1996 ; Ren & Greer, 2002). Toutefois, chez ces derniers et selon ces auteurs, l'activité spontanée semble être exprimée à des stades embryonnaires seulement. Quelques études utilisant des concentrations ioniques du liquide physiologique différentes ont réussi à enregistrer de l'activité spontanée sur des préparations *in vitro* de rats néonataux (Fellippa-Marques *et al.*, 2000 ; Pflieger *et al.*, 2002a,b). Comme il n'existe pas d'étude sur les changements de la composition des liquides cérébrospinaux, il est difficile de savoir quelle situation est le plus près de la réalité. Néanmoins, notre étude confirme que le phénomène d'activité spontanée dans la moelle épinière est présent chez l'opossum relativement de la même manière que chez d'autres espèces à l'exception du fait que chez l'opossum elle semble être plutôt postnatale dû à l'immaturité de l'animal à la naissance. Par exemple, aucune trace de marquage des cellules à la SR101 n'a été observée au niveau du renflement lombaire chez les opossums d'âge P1 ce qui nous laisse supposer qu'il n'y a pas d'activité avant ce point et un très faible marquage a été vu dans le renflement cervical ce qui laisse entrevoir que l'activité est peut-être présente avant la naissance de l'animal. Néanmoins, la ressemblance du patron de développement de

l'activité spontanée chez l'opossum comparativement au rat, à la souris et au poussin nous permet de penser que notre modèle s'avérerait utile pour approfondir les connaissances générales sur ce phénomène.

Un autre fait intéressant que nous avons relevé est que le nombre de cellules actives était plus important dans le renflement cervical comparativement au renflement lombaire, et ce, à tous les âges étudiés à l'exception du dernier soit P16. Des observations effectuées par Narayanan *et al.* en 1971 sur l'activité motrice du rat embryonnaire montraient que l'activité motrice commençait plus tôt dans les membres antérieurs et était, de façon générale, toujours plus importante en terme de quantité d'activité motrice au niveau de ceux-ci comparativement aux membres postérieurs (Narayanan *et al.*, 1971). De plus, le fait qu'on ne retrouve aucune cellule active dans le renflement lombaire à P1 et qu'on en retrouve plus que dans le renflement cervical à P16 nous laisse supposer un léger décalage rostrocaudal dans le développement de l'expression de l'activité spontanée chez l'opossum un peu comme cela avait été observé chez le rat embryonnaire (Ren & Greer, 2003). Plus d'expériences seront nécessaires pour bien clarifier ce point, mais ces résultats nous permettent tout de même de poser cette hypothèse.

Dans un autre ordre d'idée, nous avons aussi tenté de mettre en parallèle l'expression de l'activité spontanée et les autres phénomènes développementaux observables durant la même période. Nous avons remarqué que l'activité spontanée semble atteindre son maximum au moment

où les dernières voies descendantes et ascendantes, c'est-à-dire les voies reliant l'encéphale et la moelle épinière, sont mises en place (revue dans Cabana, 2000). Du moment que ces voies sont installées, l'activité spontanée se résorbe. Suite à cette observation, nous pouvons supposer que l'activité spontanée joue peut-être un rôle dans l'établissement de ces voies et qu'elle est peut-être en partie responsable des comportements précoces de l'animal avant que ces derniers soient totalement pris en charge par les prolongements supraspinaux. Cette observation est intéressante parce qu'elle amène un point nouveau au phénomène jusqu'alors étudié que chez des animaux où le phénomène est principalement embryonnaire. Dans le cas du rat, par exemple, l'activité spontanée semble se résorber et s'arrêter avant la naissance de l'animal vers E18,5 (Nishimaru *et al.*, 1996 ; Ren & Greer, 2003). On peut donc penser qu'elle n'a pas ou peu d'effet sur les comportements précoces postnataux. Cette hypothèse sur le rôle de l'activité dans le développement de l'opossum nécessite plus de recherche pour être confirmée. Néanmoins, les observations effectuées dans cette étude sont un bon point de départ pour l'approfondissement de ce point.

3.3 *Perspective*

Cette étude est une première étape pour comprendre le rôle de l'activité spontanée dans l'établissement des réseaux moteurs et, de ce fait, dans l'apparition des comportements moteurs. Ces résultats serviront de base à

des travaux futurs au laboratoire. Ils pourraient, par exemple, être complétés par une étude développementale de l'expression physiologique de cette activité — en termes de fréquences, d'amplitudes des bouffées, de propagation de l'activité obtenus par des enregistrements électrophysiologiques ou de l'imagerie calcique — qui serait complémentaire à mon étude plus anatomique. Aussi, il serait important d'étudier les changements temporels dans la connectivité cellulaire même à l'intérieur des réseaux, soit électrophysiologiquement, soit anatomiquement. Cela permettrait des études plus expérimentales.

Par exemple, il a été démontré par Hanson et Landmesser (2004, 2006) qu'il était possible de modifier l'activité spontanée en l'augmentant ou en la diminuant à l'aide d'agents pharmacologiques. Ceci pourrait être réalisé sur notre préparation, afin d'observer ce qu'une perturbation de l'activité spontanée entraîne comme modification dans la connectivité des réseaux. Ce type d'expérience permettrait de mieux définir le rôle de l'activité dans le développement des réseaux moteurs et des comportements précoces.

4 BIBLIOGRAPHIE

- Barthelemy D, Cabana T. (2001) The development of vesicular acetylcholine transporter immunoreactivity in the hindlimbs of the opossum *Monodelphis domestica*. Brain Research Developmental Brain Research, 128:191-195.
- Barthelemy D, Cabana T, (2005) Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. Brain Research Developmental Brain Research, 155:87-98.
- Boethius J. (1967) The development of the electromyogram in chick embryos. Journal of Experimental Zoology, 165:419-424.
- Bonnot A, Mentis GZ, Skoch J, O'Donovan MJ. (2005) Electroporation loading of calcium-sensitive dyes into the CNS. Journal of Neurophysiology, 93:1793-1808.
- Cabana T. (2000) The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. Brain Research Bulletin, 53:615-626.
- Cassidy G. (1993) Ontogénèse des voies propriospinales en relation avec l'ontogénèse du comportement moteur chez l'opossum, *Monodelphis domestica*. MSc, Département de Sciences Biologiques. Université de Montréal, Montréal, 114p.

- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. (1994) The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior & Evolution*, 43:244-253.
- Cassidy G, Cabana T. (1993) The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research Developmental Brain Research*, 72:291-299.
- Chow I. (1990) Cell-cell interaction during synaptogenesis. *Journal of Physiology, Paris*, 84:121-127.
- Cina C, Hochman S. (2000) Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 423:590-602.
- Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L. (2004) The *in vitro* neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms. *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural & Behavioral Physiology*, 190:343-357.
- Cowan WM. (1979) The development of the brain. *Scientific American*, 241:113-133.
- Crain SM. 1966. Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture. *International Review of Neurobiology*, 9:1-43.
- Crain SM, Peterson ER. (1967) Onset and development of functional interneuronal connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture. *Brain Research*, 6:750-762.

- Decker JD, Hamburger V. (1967) The influence of different brain regions on periodic motility of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 165:371-383.
- Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. (1981) Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Developmental Biology*, 81:266-279.
- Desrosiers C. (1995) Ontogénèse des voies spinales ascendantes provenant du renflement lombosacré chez l'opossum, *Monodelphis domestica*. MSc, Département de Sciences Biologiques. Université de Montréal, Montréal.
- Eugenin J, Nicholls JG. (2000) Control of respiration in the isolated central nervous system of the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research Bulletin*, 53:605-613.
- 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*, 32:405-409.
- Fady JC, Jamon M, Clarac F. (1998) Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Brain Research Developmental Brain Research*, 108:111-123.
- Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D, Cazalets JR, (2006) Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *Journal of Physiology, Paris*, 100:304-316.

- Fellippa-Marques S, Vinay L, Clarac F. (2000) Spontaneous and locomotor-related GABAergic input onto primary afferents in the neonatal rat. *European Journal of Neuroscience*, 12:155-164.
- Fox W. (1964) A phylogenetic analysis of behavioral neuro-ontogeny in precocial and non precocial mammals. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 28:197-202.
- Gingras J, Cabana T. (1999) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 414:551-560.
- Goulding M, Pfaff SL. (2005) Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 15:14-20.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. (1992) Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord *in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, 67:996-999.
- Grillner S. (1975) Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiological Reviews*, 55:247-304.
- Grillner S. (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*, 52:751-766.
- Hamburger V. (1963) Some aspects of the embryology of behavior. *Quarterly Review of Biology*, 38:342-365.

- Hamburger V, Wenger E., Oppenheim, R. (1966) Motility in the Chick Embryo in the Absence of Sensory Input. *Journal of Experimental Zoology*, 162:133-160.
- Hamburger V, Balaban M. (1963) Observations and experiments on spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. *Developmental Biology*, 7:533-545.
- Hamburger V, Hamilton H. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88:49-92.
- Hanson MG, Landmesser LT. (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 23:587-600.
- Hanson MG, Landmesser LT. (2004) Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*, 43:687-701.
- Hanson MG, Landmesser LT. (2006) Increasing the frequency of spontaneous rhythmic activity disrupts pool-specific axon fasciculation and pathfinding of embryonic spinal motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 26:12769-12780.
- Jacobson M, (1991) *Developmental Neurobiology*, 3rd edition. New York: Plenum Press.
- Kiehn O. (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*, 29:279-306.
- Kitchener PD, Hutton EJ, Knott GW. (2006) Primary sensory afferent innervation of the developing superficial dorsal horn in the South

American opossum *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 495:37-52.

Kjaerulff O, Barajon I, Kiehn O. (1994) Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity *in vitro*. *Journal of Physiology, London*, 478:265-273.

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*. *Journal of Comparative Neurology*, 414:423-436.

Koshiya N, Smith JC. (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized *in vitro*. *Nature*, 400:360-363.

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

Kuno M. (1990) Target dependence of motoneuronal survival: the current status. *Neuroscience Research*, 9:155-172.

Ladle DR, Pecho-Vrieseling E, Arber S. (2007) Assembly of motor circuits in the spinal cord: driven to function by genetic and experience-dependent mechanisms. *Neuron*, 56:270-283.

Lakke EA. (1997) The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Advances in Anatomy, Embryology & Cell Biology*, 135:I-XIV.

- Lamoureux S, Gingras J, Cabana T. (2005) Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior & Evolution*, 65:143-156.
- Landmesser LT, O'Donovan MJ. (1984) Activation patterns of embryonic chick hind limb muscles recorded in ovo and in an isolated spinal cord preparation. *Journal of Physiology*, 347:189-204.
- 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*. *Journal of Comparative Neurology*, 386:203-216.
- Lichtman JW, Wilkinson RS, Rich MM. (1985) Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature*, 314:357-359.
- Miller S. (1970) Excitatory and inhibitory propriospinal pathways from lumbosacral to cervical segments in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 80:25A-26A.
- Narayanan CH, Fox MW, Hamburger V. (1971) Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Behaviour*, 40:100-134.
- Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S, Kudo N. (1996) Spontaneous motoneuronal activity mediated by glycine and GABA in the spinal cord of rat fetuses *in vitro*. *Journal of Physiology*, 497:131-143.

- O'Donovan MJ. (1989) Motor activity in the isolated spinal cord of the chick embryo: synaptic drive and firing pattern of single motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 9:943-958.
- O'Donovan MJ, Bonnot A, Wenner P, Mentis GZ. (2005) Calcium imaging of network function in the developing spinal cord. *Cell Calcium*, 37:443-450.
- Oppenheim RW. (1972) Experimental studies on hatching behavior in the chick. III. The role of the midbrain and the forebrain *Journal of Comparative Neurology*, 146:479-505.
- Oppenheim RW. (1973) Prehatching and hatching behavior: A comparative and physiological consideration. In: *Behavioral Embryology*. G. Gottlieb Ed, Academic Press, New York. p 166-244.
- Petrou A. (2006) Localisation des pools de motoneurones innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs des membres antérieurs et postérieurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*. MSc, Département de Sciences Biologiques. Université de Montréal, Montréal, 110p.
- Pflieger JF, Cabana T. (1996) The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy & Embryology*, 194:75-88.
- Pflieger JF, Cassidy G, Cabana T. (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica* *Behavioural Brain Research*. 80 (1-2):137-43.

- Pflieger JF, Clarac F, Vinay L. (2002a) Picrotoxin and bicuculline have different effects on lumbar spinal networks and motoneurons in the neonatal rat. *Brain Research*, 935:81-86.
- Pflieger J-F, Clarac F, Vinay L. (2002b) Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal development in the rat. *Journal of Neuroscience*, 22:5108-5117.
- Provine RR. (1972) Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Research*, 41:365-378.
- Provine RR, Rogers L. (1977) Development of spinal cord bioelectric activity in spinal chick embryos and its behavioral implications. *Journal of Neurobiology*, 8:217-228.
- Provine RR, Sharma SC, Sandel TT, Hamburger V. (1970) Electrical activity in the spinal cord of the chick embryo, in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 65:508-515.
- Purves D, and Litchman, J.W. (1984) *Principles of Neural Development*. Sinauer Associates INC., Massachusetts, 433 p.
- Rakic P. (1990) Principles of cell migration. *Experientia*, 46:882-891.
- Ramón y Cajal S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, édition française traduite de l'espagnol par L. Azoulay, A. Maloine, Paris.

- Ren J, Greer-JJ, (2003) Ontogeny of rhythmic motor patterns generated in the embryonic rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 89:1187-1195.
- Saito K. (1979) Development of spinal reflexes in the rat fetus studied *in vitro*. *Journal of Physiology (London)*, 294:581-594.
- Saunders NR, Adam E, Reader M, Mollgard K. (1989) *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anatomy & Embryology*, 180:227-236.
- Takahashi M, Narushima M, Oda Y. (2002) *In vivo* imaging of functional inhibitory networks on the mauthner cell of larval zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 22:3929-3938.
- Teng H, Cole JC, Roberts RL, Wilkinson RS. (1999) Endocytic active zones: hot spots for endocytosis in vertebrate neuromuscular terminals. *Journal of Neuroscience*, 19:4855-4866.
- 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 Research Developmental Brain Research*, 68:203-216.
- Wenner P, O'Donovan MJ. (2001) Mechanisms that initiate spontaneous network activity in the developing chick spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 86:1481-1498.
- Yvert B, Branchereau P, Meyrand P. (2004) Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur

within a specific developmental time window. *Journal of Neurophysiology*, 91:2101-2109.

Zhang LI, Poo MM. (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nature Neuroscience*, 4 Suppl : 1207-1214.