

Université de Montréal

**Rôle du système du trijumeau dans la locomotion chez le
nouveau-né d'opossum (*Monodelphis domestica*)**

Par

Thierry Ayiwanou Adadja

Département de sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

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

Mai, 2013

© Thierry Ayiwanou Adadja, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Rôle du système du trijumeau dans la locomotion chez le nouveau-né
d'opossum (*Monodelphis domestica*)

Présenté par :
Thierry Ayiwanou Adadja

sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Stéphane Molotchtnikoff, président-rapporteur

Dr Jean-François Pflieger, directeur de recherche

Dr Réjean Dubuc, membre du jury

Résumé

L'opossum *Monodelphis domestica* naît très immature et grimpe sans aide de la mère, du sinus urogénital à une mamelle où il va s'attacher pour poursuivre son développement. Des informations sensorielles sont nécessaires pour guider le nouveau-né vers la mamelle et les candidats les plus probables sont le toucher, l'équilibre et l'olfaction. Pour tester l'action des différents systèmes sur la motricité chez l'opossum nouveau-né, des régions céphaliques du trijumeau, du vestibulaire et de l'olfaction ont été stimulées électriquement sur des préparations *in vitro* en comparaison avec une stimulation seuil T (intensité minimale de la stimulation à la moelle épinière cervicale induisant le mouvement des membres antérieurs). Par comparaison, un mouvement similaire était induit par des stimulations à $\sim 2T$ du ganglion du trijumeau, à $\sim 20 T$ du complexe vestibulaire, et à $\sim 600 T$ des bulbes olfactifs. L'étude de l'innervation de la peau faciale et des voies relayant les informations du trijumeau vers la moelle épinière (ME) a été approfondie en utilisant de l'immunohistochimie pour les neurofilament-200 et du traçage rétrograde avec du Texas-Red couplé à des Dextrans Aminés. De nombreuses fibres nerveuses ont été révélées dans le derme de plusieurs régions de la tête. Quelques cellules du ganglion trigéminal projettent à la ME rostrale, mais la majorité projette vers la médulla caudale où se trouvent les neurones secondaires du trijumeau ou des cellules réticulospinales. Les résultats de cette étude indiquent une influence significative des systèmes du trijumeau et du vestibulaire, mais pas de l'olfaction, sur le mouvement des membres antérieurs des opossums nouveau-nés.

Mots clés : Tronc cérébral, Développement, Locomotion, Marsupiaux, Moelle épinière, Systèmes sensoriels

Abstract

The opossum *Monodelphis domestica* is born very immature and crawls, unaided by the mother, from the urogenital opening to a nipple where it attaches and pursues its development. Sensory information is needed to guide the newborn to a nipple and studies suggest that the vestibular, trigeminal, and olfactory systems are likely candidates. The trigeminal, vestibular and olfactory regions of the brain were electrically stimulated to test their relative effectiveness at eliciting forelimb movement in newborn opossums, using in vitro preparations of brain-spinal cord with the limbs attached. The minimal stimulation of the cervical spinal cord needed to induce forelimb movement was considered as threshold (T). Similar movement were obtained with stimulations of the trigeminal ganglion at $\sim 2T$ and of the vestibular complex at $\sim 20 T$ and at $\sim 600 T$ for the olfactory bulb. Neurofilament-200 immunohistochemistry and retrograde tracing with Texas-Red conjugated Dextran Amines were used to study trigeminal innervation of the facial skin and pathways by which trigeminal inputs may be relayed to the spinal cord. Numerous nerve fibers were observed in the snout dermis, elsewhere in the head skin. Some trigeminal ganglion cells project to the upper spinal cord, but more project to the caudal medulla where they could contact secondary trigeminal neurons or reticular cells projecting to the spinal cord. These results support a significant influence of the trigeminal and the vestibular systems, but not of olfaction, on forelimb movement of neonatal opossums.

Keywords: Brainstem; Development; Locomotion; Marsupials; Spinal cord; Sensory systems.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des figures	viii
Remerciements	ix
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Les Marsupiaux.....	2
1.2 L’opossum <i>Monodelphis domestica</i>	4
1.3 Le système squeletto-musculaire chez le nouveau-né opossum.....	6
1.4 Le comportement locomoteur à la naissance	8
1.5 La naissance chez les marsupiaux	9
1.6 Le système nerveux responsable du mouvement chez le nouveau-né opossum.....	12
- La moelle épinière	12
- Les voies descendantes	13
1.7 État des systèmes sensoriels céphaliques à la naissance chez les nouveau-nés marsupiaux.	16
1.7.1 Le système auditif.....	16
1.7.2 Le système visuel	16
1.7.3 Le système olfactif.....	17
1.7.4 Le système vestibulaire	18
1.7.5 Le système du trijumeau	20
1.8 Objectifs.....	21
2 PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	23
2.1 Électrophysiologie	23
2.2 Traçage anatomique et immunohistochimie	26
3. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT AU COURS DE CE TRAVAIL.....	29
Adaja T, Cabana T, Pflieger JF (2013). <i>Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, Monodelphis domestica</i> . Neuroscience, pp. 259-270 DOI	29
4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	78
- Système vestibulaire	79

- Systeme du trijumeau	81
- Systeme olfactif	84
- Systemes visuel et auditif	87
5. BIBLIOGRAPHIE	89

Liste des abréviations

3v, troisième ventricule (third ventricle)

5G, ganglion du nerf trijumeau (trigeminal ganglion)

5n, nerf trijumeau (trigeminal nerve)

7G, ganglion du nerf facial (facial ganglion)

7n, nerf facial (facial nerve)

8cG et 8vG, respectivement ganglions cochléaire et vestibulaire du nerf VIII (respectively cochlear and vestibular ganglia)

8n, nerf vestibulocochléaire (vestibulocochlear nerve)

BS, tronc cérébral (brainstem)

C4, quatrième segment cervical (fourth cervical segment)

Cbl, cervelet (cerebellum)

CD, canal cochléaire (cochlear duct)

Ep, épiderme (epidermis)

Hip, région hippocampale (hippocampal region (developing))

LT et MT respectivement portions latérale et médiane du télencéphale (respectively lateral and medial telencephalon)

LTer, lamina terminalis (lamina terminalis)

Mes, mésencéphale (mesencephalon)

N, cavité nasale (nasal cavity)

NF200, neurofilament lourd (heavy neurofilament) (~200 kDa)

OB, bulbe olfactif (olfactory bulb)

Oth, otholithes (otoliths)

RF, formation réticulaire (reticular formation)

Sp5, noyau trijumeau spinal (spinal trigeminal nucleus)

sp5, voie spinale du trijumeau (spinal trigeminal tract)

Tec, tectum;

To, langue (tongue)

VA, complexe vestibulaire (vestibular area of the brainstem)

Vs8, neurones vestibulospinaux (vestibulospinal neurons)

Liste des figures

Figure 1 : Nouveau-né <i>Monodelphis domestica</i>	6
Figure 2 : modèle 3D de la ceinture de l'épaule, du sternum et de l'humérus chez le nouveau-né <i>Sminthopsis virginiae</i>	12
Figure 3 : régions cérébrales projetant vers la moelle épinière cervicale à P0.....	15

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-François Pflieger pour tout le soutien attentif et les encouragements constants durant mes études et recherches. Je sais que cela n'a pas été toujours facile pour lui et je lui suis très reconnaissant de la patience qu'il a su montrer à mon égard. Je remercie la Dre Thérèse Cabana, pour ses encouragements et sa joie de vivre très contagieuse.

Je remercie le Dr Chris Cameron pour m'avoir permis d'utiliser le microscope de son laboratoire.

Je remercie mes très chers collègues : Alexe et Ha-Loan pour leur aide très précieuse et leurs conseils, Matthieu avec qui je me suis beaucoup amusé. N'oublions pas les étudiants du laboratoire Angers Guillaume, Rachel et Luc ainsi que les nombreux étudiants en initiation à la recherche que nous avons eu, avec qui j'ai eu le plaisir de passer un peu de temps.

Je remercie les membres de mon jury d'évaluation, le Dr Stéphane Molotchtnikoff et Dr Réjean Dubuc pour leur attention et leurs conseils.

Je remercie ma famille et mes amis pour le soutien constant qu'ils m'ont apporté. Surtout mes parents, ma femme Oumou pour m'avoir constamment poussé à aller plus loin et ma fille Érik

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les mammifères démontrent une variété de comportements locomoteurs complexes pour se déplacer, se nourrir, se protéger et se reproduire. Les nouveau-nés mammaliens ne présentent cependant pas tous le même degré de maturation : certains sont capables de soutenir leur poids et de marcher peu après la parturition alors que d'autres naissent très immatures et sont généralement incapables de se déplacer par eux-mêmes (Muir, 2000). Les premiers sont dits *précoces* comme les ongulés; les seconds sont dits *non précoces* ou *altriciels* comme les carnivores et les rongeurs qui ont un développement locomoteur plus long (Muir, 2000). Les marsupiaux appartiennent à la deuxième catégorie. Ils naissent dans un état très immature, mais doivent néanmoins se déplacer du sinus urogénital de la mère à une mamelle à laquelle ils vont s'accrocher pour poursuivre leur développement. Les sens nécessaires pour guider le nouveau-né lors de son périple ne sont pas encore identifiés avec précision.

Notre laboratoire s'intéresse à la motricité et au développement ultérieur des systèmes moteurs chez un mammifère, l'opossum *Monodelphis domestica*. Ce dernier naît après 13 à 15 jours de gestation, à un stade de développement comparable à un rat de jour embryonnaire 14 (E14) (Saunders et al., 1989). L'accès postnatal à des stades de développement des centres moteurs qui se déroulent *in utero* chez les mammifères euthériens est ainsi possible, ce qui facilite les études développementales.

Le sujet du présent mémoire s'inscrit dans le cadre d'une étude du développement de la motricité et des sens pouvant influencer les comportements locomoteurs précoces d'un marsupial, l'opossum *Monodelphis domestica*. Une description générale des marsupiaux sera donnée avant de détailler notre modèle animal. Nous discuterons ensuite des comportements moteurs chez les nouveau-nés marsupiaux pour terminer sur l'état des systèmes sensorimoteurs à la naissance. Les résultats de cette étude seront présentés sous forme d'article puis l'ensemble du travail fera l'objet d'une discussion et d'une conclusion générale.

1.1 Les Marsupiaux

Les Marsupiaux ou Métathériens forment une sous-classe des mammifères qu'on retrouve surtout en Australie, en Tasmanie ou en Nouvelle-Guinée, mais il existe aussi des familles américaines, comme les Didelphidés et les caénolestidés. L'une des caractéristiques de cette sous-classe est que le petit naît dans un état de développement très incomplet, embryonnaire, et migre vers une mamelle souvent recouverte par des replis de peau formant une poche. Le nouveau-né reste de longs mois dans cette poche, attaché à une mamelle, jusqu'à ce qu'il puisse se nourrir par lui-même. Bien que l'anatomie des marsupiaux présente assez d'homogénéité pour les regrouper en une même sous-classe, leur mode de vie, de locomotion, leur régime alimentaire et leur morphologie sont extrêmement variés (Tyndale-Briscoe, 2005).

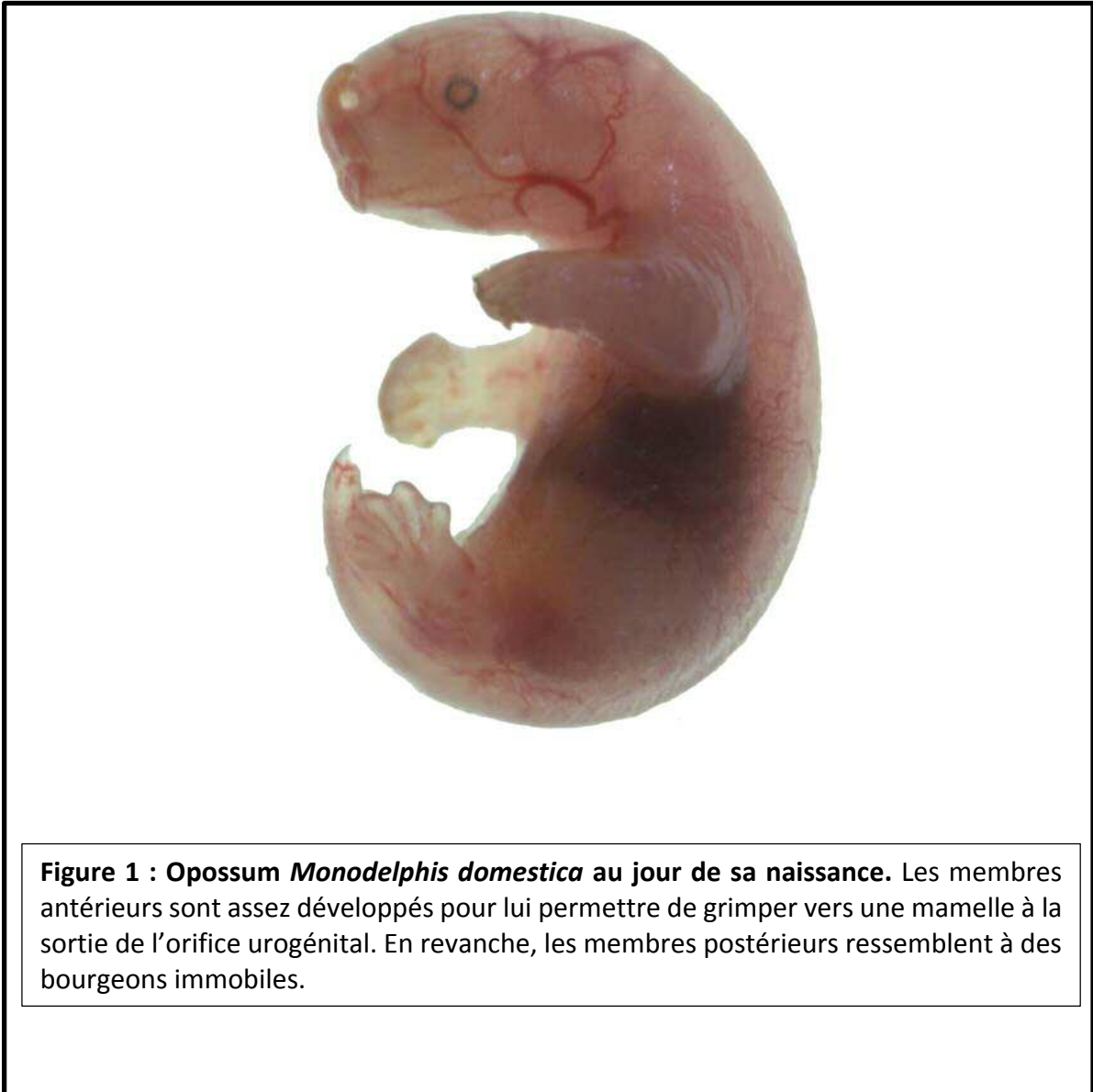
Chez tous les marsupiaux, les nouveau-nés sont très petits à la naissance. Les femelles des plus grands marsupiaux actuels, le kangourou gris oriental (*Macropus giganteus*) et le kangourou roux (*Macropus rufus*) qui pèsent près de 28 kg vont délivrer un petit pesant environ 830 mg, soit la moitié du poids d'un souriceau nouveau-né. Cela représente 0,003 % du poids de la mère, comparé à un bébé humain ou souris qui en fait environ 5%. La plupart des marsupiaux pèsent entre 200 mg et 400 mg à la naissance, mais les petits Dasyuridés peuvent peser autour de 100 mg et le plus petit nouveau-né marsupial, celui de la souris à miel (*Tarsipes rostratus*), pèse 5 mg (Tyndale-Biscoe and Renfree, 1987, Tyndale-Briscoe, 2005). Des données sur la naissance chez les marsupiaux sont disponibles pour seulement quelques espèces de cinq familles: une famille américaine (*Didelphidés*) et quatre familles australiennes (*Dasyuridés*; *Peramelidés*, les bandicoots; *Phalangeridés*, possums d'Australie; et *Macropodidés*, les wallabies et kangourous) (Nelson et Gemmell, 2004). Les didelphidés ont entre deux et douze petits, les Dasyuridés entre six et dix, les Péramélidés entre quatre et cinq, les Phalangéridés généralement un, mais certaines des espèces de petite taille peuvent en avoir jusqu'à quatre, et les kangourous ont généralement un seul petit (Nelson et Gemmell, 2004). La période de gestation est d'environ 13 jours pour les Didelphidés, entre 10.5 et 21 jours chez les Dasyuridés, 12.5 jours chez les Péramélidés, environ 18 jours chez les Phalangéridés et environ 30 jours chez les Macropodidés. La période de gestation est très courte par comparaison à celle des mammifères placentaires. Ce n'est cependant pas la durée de la période de gestation qui est le facteur le plus notable, car même si cette dernière peut être très courte, elle peut parfois être aussi longue que chez un mammifère

placentaire de taille comparable (Lillegraven et al, 1987). La différence principale se trouve surtout au niveau leur stade de développement à la naissance. Les mammifères placentaires produisent des petits relativement plus gros et à un stade de développement plus avancé, car les phases de croissance majeures se produisent durant la gestation (Tyndale-Biscoe et Janssens 1988). Chez les marsupiaux presque toute la période de croissance et de développement, particulièrement du système nerveux, s'effectue après la naissance durant une longue et complexe période de lactation où la composition et le volume de lait disponible varie pour s'adapter au besoin toujours changeant du jeune. Les femelles placentaires investissent donc majoritairement dans la reproduction durant la période de gestation alors que les femelles marsupiales investissent plus durant la période de lactation (Beckoff, 1985; Tyndale-Briscoe, 2005).

1.2 L'opossum *Monodelphis domestica*

Cet opossum est un marsupial originaire du Brésil. L'adulte a l'apparence d'un petit rat au museau allongé, au pelage vert-gris foncé, et pèse une centaine de grammes (Fadem et al., 1986; Kraus et Fadem, 1987; Harder et al., 1993). C'est un mammifère sans spécialisation motrice particulière, c'est-à-dire que ses membres antérieurs et postérieurs ne sont pas particulièrement développés vers un mode de locomotion particulier, comme c'est le cas chez le kangourou, chez qui les membres postérieurs sont beaucoup plus développés que les membres antérieurs et sont adaptés au saut, ou encore chez le koala, qui utilise ses membres pour grimper aux arbres. Le mode de locomotion de l'opossum

est comparable à celui d'un rat ou d'une souris bien que ses pattes et sa queue soient plus préhensiles que chez ces derniers.



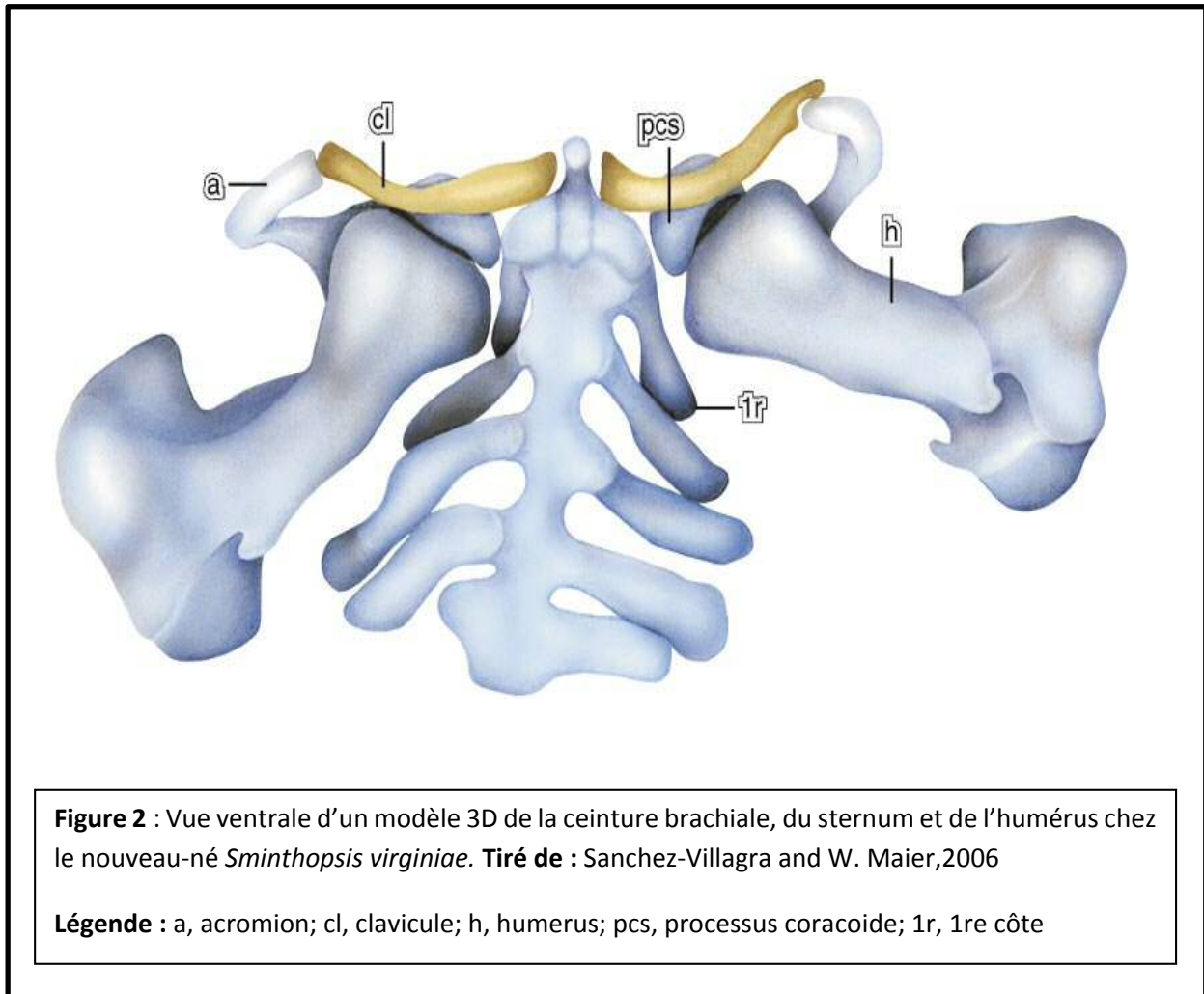
Son élevage aisé en captivité ainsi que l'absence de poche marsupiale, ce qui facilite le prélèvement des embryons en évitant les manipulations chirurgicales, en fait un modèle expérimental très intéressant (Cabana, 2000). Il se reproduit tout au long de l'année et peut avoir jusqu'à 4 portées par an, d'un maximum de 13 bébés chacune. La

période de gestation dure de 14 à 15 jours et le nouveau-né mesure environ 1cm et pèse approximativement 100 mg (figure1; Kraus et Fadem, 1987; Harder et al., 1993; Cassidy et al., 1994). Sa peau est rose, transparente et glabre. Ses yeux et méats auditifs ne s'ouvriront qu'aux alentours de la 5^{ème} semaine (Pflieger et al., 1996). Dans l'ensemble l'opossum nouveau-né naît à un stade de maturation qui équivaut à peu près à celui d'un embryon de rat de 13-14 jours ou d'un embryon de souris de 11-12 jours avec, cependant, un développement accéléré de la ceinture pectorale et des membres antérieurs (voir Smith, 2001, 2006; Lavallée et Pflieger, 2009; Nagarajan et al., 2010). Par comparaison avec les régions antérieures, la ceinture pelvienne et les membres postérieurs du nouveau-né sont très embryonnaires (revue dans Cabana, 2000).

1.3 Le système squeletto-musculaire chez le nouveau-né opossum

Le squelette de la région de l'épaule comprend une seule pièce cartilagineuse formée par les futures scapulas. Cette pièce présente un processus coracoïde assez proéminent qui représente une plus large partie de la scapula que chez l'adulte. La cavité glénoïde a un diamètre plus large que la tête de l'humérus qui s'y articule. Dans la partie dorsale, la future épine de la scapula est représentée par du tissu conjonctif qui forme un septum intermusculaire entre les muscles supraspinatus et infraspinatus. La clavicule est bien présente et s'articule avec l'acromion. Il n'y a pas de continuité entre la scapula et le sternum, mais la première côte est relativement large et présente une bosse transitoire entrant probablement en contact avec la tête de l'humérus lors de certains mouvements

des membres (Figure 2; Klima, 1987; Sanchez-Villagra et Maier,2006). Les muscles de l'épaule et des membres antérieurs ont la forme de ceux des mammifères adultes bien qu'ils soient encore très immatures, et les muscles du cou et du thorax sont assez bien développés (Tyndale-Biscoe, 2005).



Les articulations des membres antérieurs sont visibles (épaule, coude et poignet). Quant aux membres postérieurs, ils ressemblent à des bourgeons embryonnaires avec des orteils incomplètement formés et on ne peut distinguer d'articulation (Cassidy et al;

1994 ; Cabana, 2000). Sur les coupes histologiques effectuées par Barthélemy et Cabana (2005), les os des membres antérieurs ne sont que des ébauches cartilagineuses. Les muscles encore immatures apparaissent striés en microscopie photonique et le tissu conjonctif est mésenchymateux. Dans les membres postérieurs, aucune fibre musculaire n'est encore striée, le tissu musculaire est lâche dans la cuisse et la jambe, absent au niveau des pieds.

1.4 Le comportement locomoteur à la naissance

Les membres antérieurs sont suffisamment développés à la naissance pour permettre au nouveau-né de grimper le long du ventre de la mère par des mouvements rythmiques et alternés, du sinus urogénital à la mamelle. En effet, les épaules, les coudes et les poignets des membres antérieurs sont discernables même si leur flexion n'est pas optimale. Les doigts individualisés se terminent de fines griffes recourbées leur permettant de s'agripper à la fourrure de la mère. Les mouvements alternés des membres antérieurs s'accompagnent de mouvements de balancement rythmiques du tronc et les membres postérieurs suivent le tronc passivement. Lorsqu'il atteint une mamelle, le nouveau-né l'aspire et une fusion épithéliale s'effectue entre la mamelle et les lèvres (revue dans Cabana, 2000).

L'opossum passe les trois premières semaines de sa vie postnatale attaché à la mamelle de sa mère, puis il s'en détache mais reste dépendant de celle-ci jusqu'à son sevrage entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine (Pflieger et al., 1996). Durant la période allant de

P1 P10, l'opossum reste fixé à la mamelle et son tronc se balance tandis que ses membres antérieurs peuvent parfois effectuer des mouvements rythmiques et alternés sans occasionner de déplacement. Les membres postérieurs sont immobiles. Si l'opossum est détaché de sa mère durant les 10 premiers jours après sa naissance et qu'il est placé sur une surface, il tombe sur le côté, ne pouvant ni supporter son poids ni soulever sa tête (Pflieger et al., 1996).

1.5 La naissance chez les marsupiaux

La naissance a été observée et décrite en détail chez plusieurs espèces de marsupiaux, ce qui a permis de reconnaître trois modes de parturition. Le premier mode a été observé chez les Péramélidés qui ont une poche faisant face à l'arrière du corps, un placenta allantoïque et une période de gestation de 12.5 jours (Lyne ,1974; Lyne, 1976; Gemmell, 1982; Gemmell et Johnston, 1985; Gemmell et al, 1999). La mère se couche sur le côté, un membre postérieur soulevé et le corps penché de manière à ce que la tête soit proche de la poche. Le sinus urogénital se retrouve plus haut que la poche mais décalé horizontalement. Lorsque les nouveau-nés sont expulsés du sinus urogénital, ils se déplacent avec des mouvements sinusoïdaux latéraux sur la fourrure, mais demeurent attachés à leur cordon ombilical jusqu'à ce qu'ils soient fixés aux mamelons. La mère change de côté et peut se tenir droite durant la période où les jeunes naissent (environ trois minutes) et se déplacent vers la poche (environ cinq minutes). Ceci a pour conséquence que les nouveau-nés sont parfois balancés par les cordons ombilicaux dans

la poche, mais habituellement ils rampent le long d'une voie humide ouverte dans la fourrure, par les fluides du sinus urogénital et par le léchage de la mère, du sinus urogénital à la poche (Revue dans Nelson et Gemmell, 2004). Le deuxième mode d'accouchement est celui adopté par les chats marsupiaux Dasyuridés (Hutson, 1976; Williams et Williams, 1982; Nelson, 1992). Chez ces animaux, la poche se développe durant la grossesse sous la forme de replis peauciers incomplètement fermés autour et au-dessus de la région des mamelles. Plusieurs heures avant la naissance, la femelle du chat marsupial du nord (*D. hallucatus*) lèche ses pieds, l'intérieur des jambes, le sinus urogénital, la poche et la région entre le sinus urogénital et la poche, aussi appelée le « tunnel ». Cette région est couverte de poils relativement courts et bordée latéralement de poils plus longs. À la naissance, la mère se tient avec les membres postérieurs en extension, la queue tenue à l'écart du sinus urogénital, repliée vers le sol et la tête basse ou contre le sol. L'apparition du nouveau-né se fait dans une colonne de fluides gélatineux coulant du sinus vers le sol. La mère se tient avec les hanches en élévation pour permettre à cette colonne de couler vers le tunnel. Les nouveau-nés vont « nager » dans cette colonne par des mouvements latéraux sinusoïdaux, s'accrocher aux poils longs du tunnel et se déplacer dans la poche vers la mamelle (Revue dans Gemmell et Nelson 2004).

La naissance n'a pas été décrite chez *Monodelphis domestica*. Toutefois, le mode de naissance chez les opossums Didelphidés (proches parents de *Monodelphis d.*), Phalangéridés et Macropodidés montre de grandes similarités et est celui qui semble le plus répandu chez les marsupiaux (Harthman, 1920; Sharman et Calaby, 1964; Barnes et Barthold, 1969; Beeck, 1955; Gemmell, 1995; Veitch et al., 2000). Environ une heure avant

l'accouchement la mère lèche le sinus urogénital et la poche et s'assoit sur son bassin, généralement avec la queue tendue vers l'avant et la hanche relevée pour que le sinus urogénital soit orienté vers le haut mais toujours sous la poche. Quelques gouttes de fluide peuvent s'écouler du sinus urogénital juste avant que le nouveau-né ne soit expulsé de ce dernier, toujours dans le sac amniotique qui va se rompre grâce au mouvement du nouveau-né. À la sortie du sinus urogénital, l'orientation de la tête est aléatoire. Le nouveau-né se réoriente rapidement de façon à ce que sa tête soit dirigée vers le haut, en direction de la poche. Les membres antérieurs sont relativement bien développés avec des doigts possédant des griffes alors que les membres postérieurs sont pratiquement indifférenciés. Pour se déplacer, le nouveau-né soulève un membre du corps de la mère, balance ce membre fléchi vers l'avant tout en penchant la tête et la partie supérieure du corps dans la direction opposée. Lorsque ce membre est étendu en avant, approximativement aligné avec l'axe du corps, la patte se referme pour agripper la fourrure. La patte du membre opposé relâche alors sa poigne et exécute un mouvement similaire. Ce cycle se répète en alternance jusqu'à ce que le nouveau-né atteigne la poche et réussisse à se fixer à une mamelle (Revue dans Nelson et Gemmell, 2004).

Dans ces trois modes d'accouchement, les nouveau-nés présentent les mêmes mouvements de balancement alterné des membres pour s'accrocher aux poils mais à des rythmes différents. Les nouveau-nés de chaque espèce sont adaptés à la tâche qui se présente à eux. Un nouveau-né Dasyuridé plus lourd ne pourrait pas combattre la gravité pour remonter la colonne de fluides et un nouveau-né kangourou trop petit ne pourrait pas grimper la distance du sinus urogénital à la poche. Les espèces *M. domestica* et *D.*

virginiana ont un grand nombre de nouveau-nés, qui peuvent parfois être plus nombreux que le nombre de mamelles disponibles et ceux qui n'arrivent pas à atteindre une mamelle finissent par mourir (Hartman, 1920 ; Reynold, 1952).

1.6 Le système nerveux responsable du mouvement chez le nouveau-né opossum

Les mouvements des membres antérieurs continuent à être observés chez le nouveau-né d'opossum de Virginie (*D. virginia*) après le retrait des hémisphères cérébraux (Langworthy 1928). Des mouvements locomoteurs peuvent être induits sur des préparations in vitro de nouveau-nés de *M. domestica* ayant subi une ablation complète du prosencéphale (Amalric et al, 2011, 2012). De plus, les voies pyramidales, qui convoient les signaux provenant du cortex cérébral à la moelle, ne sont pas développées avant cinq semaines suivant la naissance chez ces deux espèces d'opossums, ce qui confirme l'absence d'un contrôle volontaire du mouvement à la naissance, le télencéphale étant extrêmement immature (Ward, 1954; Wang et al.,1992).

- La moelle épinière

À la naissance, la moelle épinière de *M.domestica* n'est pas complètement développée (Cabana, 2000). Néanmoins, une partie des connexions est déjà mise en place, au moins au niveau du renflement cervical, puisque des mouvements rythmiques et coordonnés des pattes antérieures sont observables chez l'animal intact (Pflieger et al.,

1996) ou sur des préparations *in vitro* de système nerveux avec pattes attachées (Amalric et al., 2012).

Ces comportements locomoteurs dépendent de l'activité coordonnée de réseaux neuronaux situés dans les renflements cervical et lombaire de la moelle épinière qui contiennent aussi les motoneurones innervant les membres, on appelle ces réseaux « générateurs centraux de rythme » (central pattern generators, CPG; revues dans Grillner, 1975; Orlovsky et al., 1999; Kiehn, 2006). Ces réseaux génèrent une grande partie du timing et du motif des activités musculaires qui sont complexes, rythmiques et coordonnées. Lorsque la locomotion est engagée, l'activité des CPG est induite puis maintenue par des inputs des commandes locomotrices descendantes ayant pour origine des neurones du tronc cérébral et du mésencéphale (Kandel et al., 2000).

- ***Les voies descendantes***

Les projections descendantes provenant de l'encéphale et innervant la moelle épinière (voies descendantes) et celles voyageant en direction opposée (voies ascendantes) ne sont pas toutes développées à la naissance de l'opossum (revue dans Cabana, 2000)

À l'aide de techniques de traçage axonique, plusieurs études faites sur *Monodelphis* ont mis en évidence les prolongements issus des régions du cerveau projetant vers la moelle épinière (Figure 3, Wang et al., 1992; Pflieger et Cabana, 1996; Cabana, 2000). Dans l'étude de Wang et al (1992), des applications de traceur (Fast Blue) au niveau cervical de la moelle épinière de nouveau-né ont permis de marquer des

cellules dans certaines régions de la formation réticulaire : le noyau réticulaire dorsal et ventral de la médulla, le noyau réticulaire gigantocellulaire, paragigantocellulaire latéral et pontique. Du marquage se retrouve aussi dans les noyaux du complexe vestibulaire et, dans une moindre mesure, le noyau spinal du trijumeau et le noyau hypothalamique paraventriculaire et le trijumeau spinal. Le nombre de neurones marqués est plus important après des applications similaires de traceurs à des âges plus avancés, ce qui indique que les voies descendantes se mettent en place graduellement et viennent modifier les réseaux neuronaux s'établissant dans la moelle épinière.

Chez le nouveau-né, le rythme locomoteur est donc probablement produit par des circuits de la moelle (CPG), comme les euthériens, même si on n'en est pas certain. Cependant pour que les nouveau-nés puissent se diriger vers la mamelle et s'y accrocher, un ou plusieurs systèmes sensoriels céphaliques sont nécessaires. Pour pouvoir influencer la locomotion, ces systèmes sensoriels doivent pouvoir agir directement ou indirectement sur la moelle épinière.

PD1 Cerv.

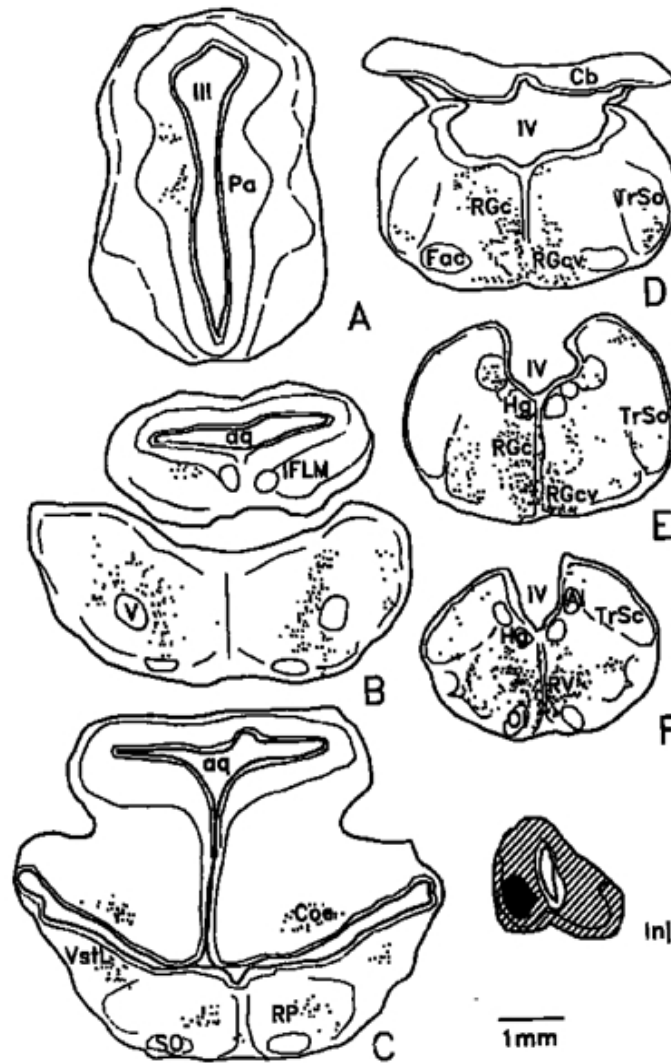


Figure 3 représentation des régions cérébrales projetant vers la moelle épinière cervicale suite à l'application d'un traceur neuronal FastBlue chez *Monodelphis domestica* à P0.
Tiré de : Wang et al, 1992

1.7 État des systèmes sensoriels céphaliques à la naissance chez les nouveau-nés marsupiaux.

1.7.1 Le système auditif

Un rôle de guidage pour l'appareil auditif est peu probable. Non seulement le méat auditif de l'opossum nouveau-né est fermé, l'oreille moyenne présumée est remplie de mésenchyme avec des osselets seulement partiellement formés (Sanchez-Villagra et al., 2002). La composante cochléaire de l'oreille interne semble encore plus immature (observations non publiées). Des potentiels auditifs évoqués ne sont pas enregistrés avant P24 dans le tronc cérébral (Reimer, 1996) ou dans les collicules inférieurs (Aitkin et al., 1997). Le méat auditif s'ouvre autour de P30.

1.7.2 Le système visuel

Un rôle de guidage pour le système visuel est également peu probable. Comme mentionné, les yeux de l'opossum nouveau-né sont couverts par la peau. Par ailleurs, des études de traçage neuroanatomique ont prouvé que les premières fibres rétiniennes croisent le chiasma optique seulement trois jours après la naissance (Taylor et Guillery, 1994) et les axones tectaux arrivent dans la moelle cervicale autour de P16 (Wang et al., 1992). Les paupières s'ouvrent autour de P35, quand des réflexes visuels commencent à être exprimés (Cassidy et al., 1994).

1.7.3 Le système olfactif

Des études comportementales chez quelques marsupiaux ont suggéré un rôle pour le système olfactif dans le guidage du nouveau-né. Par exemple, chez des chats marsupiaux (*Dasyurus hallucatus*) ou des opossums (*Didelphis virginiana*) nouveau-nés détachés des mamelles et replacés sur le ventre de la mère, à différentes positions par rapport à la poche marsupiale, la plupart des petits vont pouvoir remonter de nouveau vers la poche s'ils n'étaient pas trop éloignés de cette dernière. Cela se fait même si la mère est inclinée le museau vers le bas ou vers le côté, indiquant une chimioattraction causée par des signaux volatiles émanant de la poche (Cannon et al, 1976 ; Veicht et autres, 2000). Schneider et al (2009) ont observé que des wallabies nouveau-nés (*Macropus eugenii*) grimant sur une peau sont attirés par des tampons imbibés de fluides provenant de la poche. Ces chercheurs ont aussi étudié l'état de développement des organes olfactifs et vomeronasal par des techniques histologiques et immunohistochimiques (anticorps contre la protéine G_{oa}). Ils ont ainsi pu mettre en évidence que les structures chimiosensorielles du nez sont suffisamment développées pour expliquer l'attraction vers le fluide de la poche. Cependant, des études de traçage anatomique des voies olfactives centrales suggèrent que ce système n'est pas fonctionnel à la naissance (Ashwell et al., 2008). De plus, des enregistrements électrophysiologiques des neurones du bulbe olfactif suivant une stimulation olfactive indiquent que ces neurones deviennent fonctionnels seulement autour de la troisième semaine postnatale

chez les wallabies (Ellendorf et al, 1988) lorsque les glomérules commencent à être bien différenciés (Ashwell et al., 2008). Après, une étude morphologique de l'épithélium olfactif chez le bandicoot (*Péramélidés*), Kratzing (1986) a conclu que le système olfactif était trop immature pour jouer un rôle dans le guidage du nouveau-né vers la mamelle. Chez les nouveau-nés *Monodelphis domestica* quelques neurones récepteurs olfactifs et certaines cellules dans le bulbe olfactif expriment des marqueurs protéiniques olfactifs ainsi que d'autres marqueurs qui suggèrent tous un certain degré de différenciation et de connectivité entre ces deux régions (Tarozzo et al., 1995; Shapiro et al., 1997). Cependant, les plus importants développements de l'épithélium et des bulbes olfactifs se produisent entre la deuxième et la quatrième semaine postnatale (Brunjes et al., 1992). Ces différentes études chez l'opossum et d'autres marsupiaux montrent qu'il existe encore une ambiguïté quant au rôle du système olfactif dans le guidage des marsupiaux nouveau-né. Ce système ne peut pas être exclu sans des études plus approfondies, particulièrement après la démonstration comportementale qu'une stimulation olfactive peut induire des mouvements locomoteurs chez les euthériens, comme les rats nouveau-nés (Fady et al., 1998).

1.7.4 Le système vestibulaire

Le système vestibulaire est le principal sens de l'équilibre. Ce système sensoriel code l'orientation de la tête par rapport à la gravité et des mouvements de la tête. Les récepteurs sensoriels du système vestibulaire sont situés dans l'oreille interne. L'organe

sensoriel périphérique de ce système est le labyrinthe comprenant canaux semi-circulaires, utricule, et saccule. Les informations vestibulaires influencent notamment l'activité des muscles du cou et des membres par des signaux dépendants de la gravité (Wilson et Melvill-Jones, 1979).

Des études morphologiques du labyrinthe de certaines espèces de marsupiaux (*Dasyurus hallucatus*, Gemmell & Nelson, 1989; *Didelphis virginiana*, Krause, 1991; *Monodelphis domestica*, Pflieger et Cabana, 1996) ont montré que l'utricule est suffisamment développé à la naissance pour être fonctionnel. Pflieger et Cabana (1996) ont de plus montré que, chez le nouveau-né d'opossum *M. domestica*, les cellules ganglionnaires vestibulaires présentent des projections périphériques vers la macule utriculaire ainsi que des projections centrales vers les noyaux latéral, médian et inférieur du complexe vestibulaire, noyaux qui contiennent des cellules projetant vers la moelle épinière (Pflieger et Cabana, 1996). La fonctionnalité de cette voie utriculo-vestibulospinale putative n'a pas été examinée physiologiquement. Plus récemment, McCluskey et al. (2008) ont montré par des expériences de traçage neuroanatomique la présence d'afférences vestibulaires au niveau des noyaux vestibulaires, mais pas de projections vestibulospinales chez le wallaby nouveau-né. Ces auteurs suggèrent que l'influence vestibulaire est relayée vers la moelle épinière par les cellules réticulospinales. Toujours chez le wallaby, le développement des projections vestibulospinales se fait vers P5 (McCuskey et al., 2008). Il faut noter que, dans ces expériences, les applications de traceurs servant à tracer rétrogradement les cellules projetant à la moelle ont été faites

à des segments spinaux plus caudaux que dans le cas de l'étude de Pflieger et Cabana (1996).

1.7.5 Le système du trijumeau

Les informations sensorielles périphériques au niveau de la face, de grandes portions de la cavité orale et de la cavité nasale sont acheminées vers le tronc cérébral par le nerf trijumeau (Ve nerf crânien). Chez les mammifères, on reconnaît trois noyaux sensoriels reliés au système du trijumeau - le trijumeau spinal, le trijumeau principal et le trijumeau mésencéphalique – en plus du noyau moteur du trijumeau, qui innerve les muscles masticateurs (Kandel et al., 2000; Darian-Smith, 1973). Les prolongements périphériques des cellules sensorielles situées dans le ganglion du trijumeau (ganglion de Gasser) relaient des informations sensorielles tactiles, thermiques, chimiques et nociceptives. Elles relaient aussi des informations gustatives provenant des bourgeons gustatifs localisés dans la partie antérieure de la langue.

Le patron de développement précoce a peu été étudié chez les mammifères. Une étude utilisant le traçage neuroanatomique a mis en évidence la présence dans la peau du museau d'un dense réseau de fibres provenant du ganglion du trijumeau chez le wallaby nouveau-né (Waite et al., 1994). Cette étude a aussi montré que les prolongements centraux provenant du nerf (V) entrent dans le faisceau du trijumeau spinal dès la naissance et s'étendent du niveau du pons, rostralement, jusqu'aux premiers segments cervicaux de la moelle épinière, caudalement (Waite et al, 1994).

Des résultats préliminaires d'une étude utilisant des stimulations électriques sur des préparations *in vitro* d'opossums nouveau-nés (*M. domestica*), ont montré que des intensités relativement faibles du ganglion du trijumeau induisent des mouvements des membres (Pflieger, 2008). Sans permettre d'identifier précisément les sens impliqués, cela permet de supposer que le système trigéminospinal a une forte influence sur les comportements locomoteurs. Ces données, combinées avec l'existence de projections provenant des noyaux spinaux du trijumeau vers la moelle cervicale chez l'opossum nouveau-né mentionné par Wang et al (1992), donnent une preuve partielle du rôle du toucher et possiblement d'autres modalités sensorielles transmises par le système du trijumeau dans le guidage du comportement locomoteur chez les marsupiaux nouveau-nés.

Il y a peu d'étude sur le développement des voies trigéminospinales chez les mammifères. Une étude électrophysiologique *in vitro* chez le rat nouveau-né indique que la stimulation électrique du nerf V évoque des réponses bilatérales au niveau des motoneurones et des racines ventrales lombaires de la moelle épinière (Vinay et al, 1995). Toutefois, le rat a une gestation d'environ 21 jours, c'est-à-dire à peu près une semaine de plus qu'un opossum *M. domestica*, ce qui présuppose un état de maturité plus grand.

1.8 Objectifs

Tel qu'il a été dit, les nouveau-nés marsupiaux doivent effectuer le trajet du sinus urogénital à une mamelle sans aide directe de la part de la mère. Il existe encore des

inconnus quant aux systèmes sensoriels qui l'aident à atteindre son but. Parmi ces systèmes, trois semblent être suffisamment fonctionnels à la naissance à savoir le toucher, l'équilibre et l'olfaction. Les preuves que ces sens ont une influence proviennent essentiellement d'expériences comportementales et anatomiques.

Dans cette étude, nous avons testé physiologiquement les systèmes sensoriels mentionnés ci-dessus afin de vérifier une possible implication dans le contrôle locomoteur chez les opossums nouveau-nés. Comme une stimulation du ganglion du trijumeau s'est révélée très efficace pour l'induction de mouvement des membres antérieurs, nous avons aussi étudié l'étendue de l'innervation trigéminal périphérique au niveau de la face. Nous avons aussi investigué, par traçage neuronal, les voies permettant de relayer les inputs trigéminaux vers la moelle épinière.

2 PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Les opossums utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir d'un élevage maintenu au département en s'inspirant des directives de Fadem et al. (1982) et Kraus et Fadem (1987) (pour plus de détails, voir Cassidy et al., 1994). Toutes les procédures présentées dans ce mémoire respectent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et les protocoles ont été approuvés par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal.

2.1 Électrophysiologie

Neuf opossums provenant de 8 litières différentes ont été utilisés dans les 12h suivant la naissance pour les expériences électrophysiologiques. Après avoir été profondément anesthésié par hypothermie, chaque animal a été éviscéré avec des microciseaux puis placé dans un pot de pétri tapi de Sylgard et rempli d'une solution physiologique (NaCl 125mM, KCl 3mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM et Glucose 15mM; oxygéné avec du 95% O₂ / 5% CO₂; pH 7.4; adaptée de Nicholls et al., 1990; Stewart et al., 1991). Sous un microscope à chirurgie, la peau a été retirée au-dessus du crâne, de la moelle épinière et de la partie dorsale des membres antérieurs sans endommager les tissus sous-jacents. L'axe neural a été exposé par craniotomie et laminectomie mais laissé dans la carcasse à laquelle les membres et la

queue étaient toujours attachés. La portion dorsale des hémisphères cérébraux a été retirée laissant les aires ventrales contenant les régions olfactives et les bulbes olfactifs saillant à l'avant (Fig. 1B de l'article). La préparation a été fixée, face dorsale vers le haut, dans une chambre d'enregistrement perfusée avec la solution physiologique oxygénée, elle-même placée sous un microscope (Olympus BX61WIF) et laissée au repos pour une période allant de une à deux heures avant le début des stimulations. Toutes les manipulations ont été faites à température de la pièce (21-24°C).

Un microstimulateur (Master 8-cp, A.M.P.I.) a été utilisé pour délivrer des impulsions (2ms; 0.1 – 0.5 Hz) au travers d'électrodes de tungstène monopolaire enduites de parylène (1 M Ω ; World Precision Instruments). La moelle épinière de l'opossum nouveau-né mesure environ 500 μ m de diamètre, est non myélinisée (Lamoureux et al., 2005) et est suffisamment translucide pour que la colonne vertébrale soit visible à travers elle. L'électrode était placée au-dessus de la ligne médiane du quatrième segment cervical (C4, Fig. 1). Ce site a été choisi parce que c'était la façon la plus simple de stimuler bilatéralement les afférences segmentaires et les interneurons dorsaux projetant vers les neurones ventraux (motoneurons comme interneurons) du réseau locomoteur. En commençant à partir de 0 A un courant a été appliqué avec une augmentation progressive d'intensité jusqu'à l'obtention d'une contraction de l'épaule et de la région proximale des membres antérieurs suffisante pour bouger l'un ou l'autre des membres vers l'avant. Cette réponse ressemble à la composante d'extension du mouvement locomoteur chez le nouveau-né intact se déplaçant vers la mamelle (Fig. 1A). Pour chaque préparation, l'intensité minimale moyenne nécessaire pour invoquer une telle réponse après trois

répétitions a été considérée comme étant l'intensité seuil (T) servant de base pour la comparaison avec les stimulations du cerveau. La réponse des membres a uniquement été évaluée visuellement sous un microscope (grossissement 4X) parce que des tentatives préalables d'enregistrements électromyographiques ont donné des résultats inconsistants et peu fiables. Cela n'est pas surprenant vu l'immaturation du tissu des membres antérieurs chez le nouveau-né (Martin and MacKay, 2003; Barthélemy and Cabana, 2005) et la paucité de leur innervation motrice (Barthélemy et Cabana, 2005).

Une fois T déterminé, toujours sous le microscope à dissection, l'électrode était déplacée vers les régions d'intérêts du cerveau en suivant le même protocole utilisé pour déterminer T. Chaque région était stimulée trois fois, avec une période de repos de 2 à 5 minutes entre chaque stimulation. Les régions ont été stimulées unilatéralement, en suivant l'ordre suivant (Fig. 1B): le complexe vestibulaire (VA), le ganglion du nerf trijumeau (5G), le cervelet (Cbl), le tectum mésencéphalique (Tec), le télencéphale ventral médialement (MT) et latéralement (LT), et les bulbes olfactifs (OB). VA a été sélectionnée, car elle contient des neurones qui reçoivent des afférences primaires vestibulaires et envoient des axones à la région cervicale de la moelle des opossums nouveau-nés (Pflieger and Cabana, 1996), alors que le ganglion vestibulaire et le nerf sont difficilement accessibles à la stimulation car entourés par la capsule otique (voir Fig. 3A). En plus des OB, le MT et le LT ont été testés comme relais potentiels des inputs olfactifs vers des structures plus caudales. Il a été montré que des stimulations électriques du faisceau olfactif ou des OB induisent une réponse motrice chez les animaux aquatiques (poissons: Grimm, 1960, Døving et Selset, 1980; lamproie: Derjean et al., 2011). Même si

la vision a été exclue comme pouvant guider la locomotion du nouveau-né, le même protocole a été appliqué au Tec et au Cbl afin de disposer de contrôles. L'enregistrement des racines ventrales pour des mesures quantitatives de l'activité des membres était pratiquement impossible sur des préparations aussi immatures. En effet les préparations ont été placées avec la face dorsale vers le haut pour avoir un accès dorsal à la moelle épinière et aux régions cérébrales d'intérêt, et pour avoir une vue dorsale des membres afin de pouvoir comparer les mouvements induits par des stimulations aux mouvements de l'animal intact se déplaçant sur le ventre de la mère.

2.2 Traçage anatomique et immunohistochimie

Treize nouveau-nés provenant de cinq litières différentes ont été utilisés dans les 12h suivant la naissance pour ces expériences. Neuf d'entre eux ont été décapités à la base du cou. Les têtes ont été immergées dans la solution physiologique et les parties caudales du tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière ont été exposées par résection des tissus les recouvrant. Les têtes ont été retirées du bain et l'excès de liquide absorbé. Une section transverse de l'axe neural a été faite au niveau supérieur des premiers segments cervicaux dans trois cas (ligne pointillée "Spinal" sur la Fig. 1B) ou à un niveau légèrement rostral à l'obex dans les six autres cas (ligne pointillée "Brainstem" sur la Fig. 1B). Des cristaux de Texas Red couplés à des Dextrans Aminés (TRDA, 3000MW, Invitrogen) ont été appliqués sur toute la surface sectionnée. 3 à 4 minutes après l'application, les têtes ont été remises dans le bain et laissées dans l'obscurité pendant 6h

sous perfusion constante avec la solution physiologique oxygénée. Elles ont ensuite été fixées par immersion avec du paraformaldéhyde (4% dans une solution de tampon phosphate 0.1M (PB)) avant d'être transférées dans une solution de PB 30% sucrose. Quatre spécimens supplémentaires ont été traités tels que décrits ci-dessus, mais sans application de TRDA. Les têtes de chacun des treize opossums ont été enrobées dans de l'OCT de Tissu-Tek (Miles Scientific) solidifié dans un bain de 2-methylbutane refroidi par de la glace carbonique dissoute dans l'éthanol. Les échantillons enrobés ont été conservés à -80C. Des coupes de 16 µm ont été faites au cryostat (CM3050S Leica) et récupérées sur des lames Superfrost (Fisher). Les coupes de trois des neuf têtes marquées au TRDA et des quatre têtes non marquées ont été traitées par immunohistochimie pour révéler la distribution des neurofilaments lourds (NF200, 180~200 kDa). Ces neurofilaments sont des marqueurs des fibres nerveuses ayant atteint des stades plus matures lors du développement (voir le Szaro et fort, 2010). Les coupes ont été lavées pendant 20 minutes à la température ambiante avec une solution de 0,05 M Tris contenant 1,5% de NaCl et 0,3% de Triton X-100 (TBST, pH 7,4), incubées toute la nuit à 4°C avec des anticorps de lapin anti-NF200 (1:150, Sigma), lavées trois fois dans du TBST, puis incubées 2h à la température ambiante dans du TBST avec de l'albumine de sérum bovin à 3% et du sérum normal de chèvre à 10% contenant un anticorps secondaire anti-lapin produit dans la chèvre et couplé avec de Alexa Fluor-488 (1 :400, Invitrogen). Des contrôles ont été effectués en omettant l'anticorps primaire ou secondaire. Aucun marquage n'a été obtenu sur ces contrôles (voir Fig. 2).

En résumé, 6 spécimens ont servi au traçage neuronal au TRDA seul, 4 pour l'immunohistochimie NF200 seule, et 3 à du traçage neuronal combiné à de l'immunohistochimie. Les coupes ont été observées avec un microscope équipé pour l'épifluorescence (Olympe BX51) utilisant des filtres pour détecter sélectivement le marquage en vert (NF200) et rouge (TRDA). En plus, des coupes sérielles de têtes d'opossums nouveau-nés marquées au Nissl ont été utilisées pour contre vérifier l'identification des structures observées en fluorescence.

Des microphotographies ont été acquises avec des caméras numériques monochrome (évolution QEI) ou couleur (QImaging) et ont été digitalisées utilisant un système d'analyse d'image (ImagePro plus 5.1). Lorsque nécessaire, la conversion en format monochrome et l'ajustement manuel du contraste ont été réalisés dans Corel PhotoPaint. Des figures ont été compilées avec CorelDraw. Le décompte des cellules marquées au TRDA dans le ganglion du trijumeau a été effectué à partir de coupes sérielles des ganglions entiers, bilatéralement, chez deux animaux pour chaque niveau d'application de TRDA (4 animaux, 8 ganglions au total). Le noyau de chaque cellule a été compté une fois utilisant une technique de dissection optique limitant les biais d'échantillonnage (Cogeshall et Lekan, 1996 ; Guillery, 2002). Les nombres donnés dans le texte et les tables sont sous la forme moyenne \pm s.e.m. L'analyse statistique a été faite avec le logiciel Prisme 5 (GraphPad).

3. ARTICLE SCIENTIFIQUE PRODUIT AU COURS DE CE TRAVAIL

Adadja T, Cabana T, Pflieger JF (2013). *Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, Monodelphis domestica*. *Neuroscience*, 228:259-270

Contributions des auteurs de l'article .

TAA a réalisé les expériences de traçage et d'immunohistochimie, analysé les résultats de ces expériences, écrit le premier jet de l'article et revu celui-ci. JFP a conçu le projet, réalisé les expériences d'électrophysiologie et analysé les résultats, participé à la rédaction de l'article et financé ces recherches (CRSNG #312015; FCI #10442). TC a été fortement impliquée dans la rédaction de l'article en plus de soutenir financièrement ces recherches (CRSNG #3595)."

**Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums,
*Monodelphis domestica***

Authors: Thierry Adadja, Thérèse Cabana and Jean-François Pflieger*

Affiliation: Département de Sciences biologiques, Université de Montréal.

Abbreviations

3v, third ventricle; 5G, trigeminal ganglion; 5n, trigeminal nerve; 7G, facial ganglion; 7n, facial nerve; 8cG and 8vG, respectively cochlear and vestibular ganglia; 8n, vestibulocochlear nerve; BS: brainstem; C4, fourth cervical segment; Cbl, cerebellum; CD, cochlear duct; Ep, epidermis; Hip, hippocampal region (developing); LT and MT, respectively lateral and medial telencephalon; LTer, lamina terminalis; Mes, mesencephalon; N, nasal cavity; NF200, heavy neurofilament (~200 kDa); OB, olfactory bulb; Oth, otholiths; RF, reticular formation; Sp5, spinal trigeminal nucleus; sp5, spinal trigeminal tract; Tec, tectum; To, tongue; VA, vestibular area of the brainstem; Vs8, vestibulospinal neurons.

Abstract

Like other marsupials, the opossum *Monodelphis domestica* is born very immature and crawls, unaided by the mother, from the urogenital opening to a nipple where it attaches and pursues its development. If the alternate, rhythmic movements of the forelimbs which allow this locomotion are generated by the developing spinal motor networks, sensory information is nonetheless needed to guide the newborn to a nipple. Behavioral, anatomical and physiological studies suggest that the auditory and the visual systems are insufficiently developed in newborn opossums to influence spinal motor centers, while the vestibular, trigeminal, and olfactory systems are likelier candidates. The trigeminal, vestibular and olfactory regions of the brain were electrically stimulated to test their relative effectiveness at eliciting forelimb movement in newborn opossums, using *in vitro* preparations of brain-spinal cord with the limbs attached. The minimal stimulation of the cervical spinal cord needed to induce forelimb movement was considered as threshold (T). Stimulations of the trigeminal ganglion at $\sim 2T$ and of the vestibular complex at $\sim 20T$ could induce the same movement, and were not statistically different, in contrast to the $\sim 600T$ necessary for the olfactory bulb. Neurofilament-200 immunohistochemistry and retrograde tracing with Texas-Red conjugated Dextran Amines were used to study trigeminal innervation of the facial skin and pathways by which trigeminal inputs may be relayed to the spinal cord. Numerous nerve fibers were observed in the snout dermis, especially in the maxillary region, but also elsewhere in the head skin. Some trigeminal ganglion cells project to the upper spinal cord, but more project to the caudal medulla where they could contact secondary trigeminal neurons or reticular cells projecting to the

spinal cord. These results support a significant influence of the trigeminal and the vestibular systems, but not of olfaction, on forelimb movement of neonatal opossums.

Keywords: Brainstem; Development; Locomotion; Marsupials; Spinal cord; Sensory systems.

Introduction

The grey short-tailed opossum *Monodelphis domestica* is a small marsupial from the Didelphidae family increasingly used in biomedical research, notably to investigate nervous system development and regeneration. Like other marsupials this opossum is born in a very immature state. The newborn's head makes up about one-third of the total body length. It is glabrous, and has a large snout with opened nostrils, but the eyes are unopened and covered by skin, and the external ears are not yet demarcated. Locomotion consists solely of rhythmical and alternating extension/flexion movements of low amplitude performed by the forelimbs while the trunk sways from side to side. The hindlimbs look almost like embryonic buds and are immobile. This simple and basic locomotion enables the newborn to climb on the mother's belly, unaided by her, from the urogenital opening to a nipple where it attaches (Fadem et al., 1982; Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). Overall the newborn opossum compares to a rat embryo of 13-14 days (see Smith, 2001, 2006; Lavallée and Pflieger, 2009) or to a mouse embryo of 11.5 days (Nagarajan et al., 2010), albeit with a slightly more developed brachial girdle and forelimbs and less developed pelvic girdle and hindlimbs. A large part of the opossum's somatic and nervous development unfolds postnatally, explaining its usefulness as a model of mammalian sensorimotor development (review in Cabana, 2000).

The spinal cord of the neonatal opossum contains few supraspinal inputs. Projections to the cervical cord originate from the brainstem raphe and adjacent reticular formation, the vestibular complex and, to a lesser extent, the spinal trigeminal nucleus and the paraventricular hypothalamic nucleus (Wang et al., 1992). The forelimb movements of

the newborn opossum must be generated by the presumptive central pattern generators in the cord, as demonstrated for perinatal rodents (reviews in Clarac et al., 2004; Falgairolle et al., 2006). Nonetheless, the opossum being unaided by the mother in its progression to the nipple, some sensory guidance must exist for the animal to reach its target.

A guiding role for the auditory system is unlikely. Not only is the auditory meatus of the newborn opossum closed, but the presumptive middle ear is comprised of mesenchyme with the ossicles only partially formed (Sánchez-Villagra et al., 2002), and the cochlear component of the inner ear appears even more immature (unpublished observations). Evoked auditory potentials are not recorded before P24 in the brainstem (Reimer, 1996) or in the inferior colliculus (Aitkin et al., 1997). The auditory meatus opens around P30 (Cassidy et al., 1994).

A guiding role for the visual system is also unlikely. As mentioned, the eyes of the newborn opossum are covered by skin. Moreover, anatomical studies have shown that the first retinal fibers cross the optic chiasm only three days postnatally (Taylor and Guillery, 1994) and tectal axons arrive in the cervical cord around P16 (Wang et al., 1992). The eyelids open around P35, when visual placing reflexes begin to be expressed (Cassidy et al., 1994).

Studies in some marsupials could suggest a role for the olfactory system in guiding the newborn. When removing newborn quokkas or brushtail possums from the nipples and putting them elsewhere on the mother's belly, whether the mother is facing downward

or upward, most pups climbed back to the pouch if they were not too remote from it, indicating negative geotropism and/or chemoattraction from cues emanating from the pouch (Cannon et al., 1976; Veicht et al., 2000). Schneider et al. (2009) demonstrated that newborn wallabies climbing on a pelt are attracted to swabs soaked with pouch fluid and proposed, based on histological and immunohistochemical observations, that the olfactory or the vomeronasal organs are sufficiently mature to explain this response. However, electrophysiological recordings of olfactory bulb neurons following olfactory stimulation revealed that these neurons become functional only around the third postnatal week in wallabies (Ellendorf et al., 1988), when the glomeruli start to be well differentiated (Ashwell et al., 2008). After a morphological study of the olfactory epithelium in the bandicoot, Kratzing (1986) concluded it was too immature for the olfactory system to play a role in guiding the newborn to the teat. However, in neonatal *Monodelphis domestica* some olfactory receptor neurons and some cells in the main olfactory bulb express the olfactory marker protein and other markers that indicate a certain degree of differentiation and the presence of connections between the two regions (Tarozzo et al., 1995; Shapiro et al., 1997). Nonetheless, significant development of the olfactory epithelium and bulbs occurs during the second to the fourth postnatal weeks (Brunjes et al., 1992). Thus these various studies in the opossum and other marsupials lead to believe that a role for the olfactory system in guiding the newborn cannot be excluded without further investigation, especially in the light of the behavioral demonstration that olfactory stimulation can induce locomotor-like movements in newborn rats (Fady et al., 1998).

We have already provided evidence for a possible role of the vestibular system in steering the newborn opossum to a nipple. Indeed, a sensory epithelium is seen only in the utricle, but not yet in the more immature saccule or the semicircular canals, and vestibular ganglion cells project peripheral processes to the utricular macula (but not to the other components of the vestibular labyrinth) and central processes to parts of the brainstem vestibular complex that contain spinal-projecting cells (Pflieger and Cabana, 1996). This utriculo-vestibulospinal pathway has not been tested physiologically in newborn opossums. However, it has been known for decades that this pathway in mammals influences the activity of neck and limb muscles in relation to gravity clues (Wilson and Melvill-Jones, 1979). The finding of vestibulospinal axons in the cervical cord in newborn opossums contrasts with the later development of vestibulospinal projections reported in wallabies by McCluskey et al. (2008), but their tracer was applied to more caudal spinal segments, which may explain the later arrival of vestibular axons therein.

A study in newborn wallabies has revealed the presence in the snout skin of a dense network of fibers arising from the trigeminal ganglion and of central processes in the spinal trigeminal tract down to the upper cervical cord (Waite et al., 1994). An earlier study using electron microscopy in neonatal opossums revealed fibers innervating mechanosensory Merkel cells in the snout skin (Jones and Munger, 1985), but the origin of this innervation in the trigeminal ganglion and the central projections were not investigated. These reports, combined to the existence of a projection from the spinal trigeminal nucleus to the cervical cord in newborn opossums already mentioned (Wang

et al., 1992), provide partial evidence for a role of touch and possibly other sensory modalities conveyed by the trigeminal system in locomotor guidance.

The first aim of the present study was to test physiologically the above sensory systems for a possible implication in locomotor control in newborn opossums. Using the same kind of *in vitro* preparation developed by Lavallée and Pflieger (2009), the minimal intensities of stimulation needed for these sensory brain regions to elicit forelimb movement have been determined. Since stimulation of the trigeminal ganglion revealed to be very efficient, we then aimed to verify the trigeminal innervation of the snout and the possible pathways by which trigeminal inputs are relayed to the spinal cord, using immunohistochemistry and anatomical tracing. These experiments also provided information on the other sensory systems.

Preliminary results have been presented in abstract form (Pflieger, 2008; Adadja and Pflieger, 2010).

Experimental procedures

Gray, short-tailed opossums *Monodelphis domestica* were obtained from a colony maintained at the Department according to Fadem et al. (1982) and Kraus and Fadem (1987) (for further details, see Cassidy et al., 1994). All procedures followed the guidelines of the NIH and the Canadian Council on Animal Care as approved by the University Animals Ethics Committee.

Electrophysiology

Nine newborn opossums from 8 different litters were used within 12 hours from birth for electrophysiological experiments. After deep anesthesia by hypothermia, each animal was placed in a Sylgard-lined petri dish filled with physiological solution (NaCl 125mM, KCl 3mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM and Glucose 15mM; oxygenated with 95% O₂ / 5% CO₂; pH 7.4; adapted from Nicholls et al., 1990; Stewart et al., 1991) and eviscerated with microscissors. Under a surgical microscope, the skin was removed from the cranium, the spine and the dorsal part of the forelimbs without damaging the underlying tissues. The neuraxis was exposed by craniotomy and laminectomy but left in the carcass with the limbs and tail attached. The dorsal portion of the cerebral hemispheres was removed, leaving intact the ventral areas containing the olfactory regions and the olfactory bulbs protruding in front (fig. 1). The preparation was then pinned, dorsal side up, in a recording chamber perfused with renewed oxygenated physiological solution, put under a microscope (Olympus BX61WIF) and left undisturbed for 1-2h before starting the stimulations. All manipulations were carried out at room temperature (21-24°C).

A microstimulator (Master 8-cp, A.M.P.I., with Iso-Flex isolation unit) was used to deliver square-pulses (2ms; 0.1 – 0.5 Hz) through monopolar parylene-coated tungsten electrodes (1 MΩ; World Precision Instruments). The spinal cord of a newborn opossum measures about 500μm in diameter, is not myelinated (Lamoureux et al., 2005) and is

translucent enough for the vertebral bodies to be visible through it. The electrode was placed over the dorsal midline of the fourth cervical segment (C4, fig. 1), a site chosen because it was the simplest way to stimulate bilaterally segmental afferents and dorsal interneurons projecting to the ventral neurons, either motoneurons or interneurons, of the locomotor network. Starting from 0 A, current was applied in increasing intensity until it elicited a contraction of shoulder and proximal forelimb muscles sufficient to move the limb forward, as judged visually under the microscope (magnification: 20X). This limb response resembled the extension component of the locomotor movement performed by the intact newborn crawling to the pouch (Fig. 1A). The average minimal intensity required to evoke such forelimb movement after three repetitions for each preparation was considered as the threshold (T) that served as the basis of comparison for the brain stimulations. The limb responses were solely evaluated visually under the microscope because attempts at electromyographic recording yielded very inconsistent and unreliable results. This is not entirely surprising in light of the great immaturity of forelimb tissues in newborn opossums (Martin and MacKay, 2003; Barthélemy and Cabana, 2005) and the paucity of their motor innervation (Barthélemy and Cabana, 2005).

Once T was determined, the electrode was moved to the brain regions of interest one after the next, using the same protocol of gradual increase of stimulus intensity until movement of one or both forelimbs comparable to that described above was induced. Each brain region was stimulated three times in each preparation and the preparation was left undisturbed for 2-5 minutes after each set of stimulations. The brain regions were stimulated unilaterally, from the surface as judged under the dissecting microscope, in

the following order (fig. 1): vestibular area of the brainstem (VA), trigeminal ganglion (5G), cerebellum (Cbl), mesencephalic tectum (Tec), ventral telencephalon medially (MT) and laterally (LT), and olfactory bulb (OB). VA was chosen because it contains the neurons that receive vestibular primary afferents and send axons to the cervical cord in newborn opossums (Pflieger and Cabana, 1996), whereas the vestibular ganglion or nerve, being surrounded by the otic capsule (see fig. 3A), were not easily accessible for stimulation. In addition to the OB, the MT and LT were tested as possible relays of olfactory inputs to more caudal structures. Electrical stimulation of the olfactory tracts or the OB have been shown to induce motor responses in aquatic animals (fish: Grimm, 1960, Døving and Selset, 1980; lamprey: Derjean et al., 2011). Even if the visual system has been excluded as a guidance cue for newborn locomotion, the same protocol of stimulation was applied to the mesencephalic tectum (Tec) as a control. Stimulation of the cerebellum also served as a control (Cbl). Recording from the ventral roots as a possible quantitative measure of limb activity in these very immature preparations was nearly impossible. Indeed, the preparations were placed dorsal side up in the *in vitro* dish to access dorsally the spinal and brain regions stimulated and to have a dorsal view of the forelimbs in order to compare the movement elicited by the stimulations performed here to the movement observed in the intact animal crawling on the mother's belly.

Anatomical tracing and immunohistochemistry

Thirteen newborns from five litters were used within 12 hours from birth for these experiments.

Nine of them were decapitated at low neck level. The head was put in physiological solution and the caudal part of the hindbrain and the rostral spinal cord were exposed by dissection of overlying tissues. The head was then removed from the bath and the excess liquid over the tissue was drained. A complete transection of the neuraxis was made at the upper level of the first cervical segment in three cases (dashed line "Spinal" on Fig. 1B) or slightly rostral to the obex in the other six cases (dashed line "Brainstem" on Fig. 1B), and crystals of Texas Red coupled to Dextran Amines (TRDA, 3000MW, Invitrogen) were applied to the whole cut surface. 3-4 minutes after application, the heads were put back in the bath and left in the dark for 6h under constant perfusion with oxygenated physiological solution. They were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1M (PB) before being transferred to a 30% sucrose solution in PB. Four additional specimens were treated as above, but without TRDA application. The heads of all thirteen opossums were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Miles Scientific) solidified in a 2-methylbutane bath frozen in carbon ice-ethanol. Sections 16 μm thick were made on a cryostat (CM3050S Leica) and mounted onto Superfrost slides (Fisher).

Sections from three of the nine TRDA-labeled heads and from the four non-TRDA-labeled heads were immunohistochemically processed to reveal the 180~200 kDa microfilament subunit of heavy neurofilaments (NF200). These neurofilaments are

markers of relatively more mature fibers during development (see Szaro and Strong, 2010). The sections were washed 20 min at room temperature in 0.05 M Tris buffer with 1.5% NaCl and 0.3% Triton X-100, pH 7.4 (TBST), incubated overnight at 4°C with rabbit anti-NF200 antibodies (1:150, Sigma), washed three times in TBST and incubated 2h at room temperature in TBST with 3% Bovine Serum Albumin and 10% Normal Goat Serum containing a goat anti-rabbit anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor-488 (Invitrogen). Controls were performed by omitting the primary or the secondary antibody. No labeling was obtained in these controls (see Fig. 2).

In summary, 6 specimens served for TRDA neuronal tracing, 4 for NF200 immunohistochemistry and 3 for both TRDA tracing and NF200 immunohistochemistry. The sections were observed with a microscope equipped for epifluorescence (Olympus BX51) using filters to detect selectively the labeling in green (Alexa Fluor-488 for NF200: Excitation. 450–490 nm, Emission 520 nm) and red (TRDA: Excitation 510–560 nm, Emission 590 nm). In addition, paraffin-embedded Nissl-stained serial sections of newborn opossums were available for plain histological observation.

Microphotographs were acquired with either monochrome (Evolution QEI) or color (QImaging) digital cameras and were digitized using a PC-running image analysis system (ImagePro Plus 5.1). Conversion to monochrome format and manual adjustment of contrast were made in Corel PhotoPaint. Figures were compiled with CorelDraw.

Counts of TRDA-labeled trigeminal ganglion cells were made from serial sections of the whole ganglia bilaterally in two animals for each TRDA application level. The nucleus of

each cell was counted once using an optical dissector technique to limit sampling biases (Cogeshall and Lekan, 1996; Guillery, 2002). All numbers in the text and tables are given as average \pm s.e.m. Statistical analysis was done with Prism 5 software (GraphPad).

Results

The average minimal intensity of stimulation of the dorsal spinal cord at C4 necessary to induce a forelimb movement comparable to that performed by the intact newborn opossum was 0.4 ± 0.04 μ A (0.2-0.6 μ A; table 1). The average intensity was similar whether the left or the right forelimb responded, therefore the data for both limbs were pooled (I+C). The value of 0.4 ± 0.04 μ A is thus used as threshold (T) with which the brain stimulation intensities below are compared. It can be noted that a single shock at 5 T applied to the dorsal C4 induced short bouts of rhythmical movements in either one or both forelimbs, which were accompanied by undulating movement of the trunk and hindquarter in six of the nine specimens but not in the other three. When both forelimbs responded, no reliable alternation between the two limbs was observed.

Table 1 gives the minimal stimulation intensities needed for the various brain regions to induce movement of the ipsilateral (I) or contralateral (C) forelimb, in terms of absolute values in μ A and relative to T. It can be seen that stimulation intensities of 2.1 ± 0.3 T and 2.4 ± 0.4 T were necessary for the trigeminal ganglion (5G) to induce movement of the ipsilateral or contralateral forelimb, respectively. A stimulation of 22.8 ± 4.1 T was required for the vestibular area (VA) to elicit a comparable forelimb movement, either

ipsi- or contralaterally. Much higher stimulations were needed for the olfactory bulb (OB) to provoke ipsi- or contralateral forelimb movement: 615.6 ± 246.1 T and 566.6 ± 194.0 T, respectively. The lateral telencephalon (LT) elicited ipsi- or contralateral forelimb movement with respective stimulations of 181.9 ± 55.8 T and 291.0 ± 129.7 T, whereas the medial telencephalon (MT) had to be stimulated at 571.3 ± 214.2 T and 595.3 ± 255.4 T to evoke similar responses. In one preparation, no forelimb movement was observed after stimulation of OB, LT or MT. Cerebellar (Cbl) stimulations of 61.2 ± 12.1 T and 65.8 ± 13.2 T and tectal (Tec) stimulations of 439.7 ± 231.7 T and 220.9 ± 55.2 T were required to elicit ipsilateral or contralateral forelimb movement, respectively, thus lower values than for the OB and MT. By far the trigeminal ganglion was the most effective site of stimulation to elicit forelimb movement, followed by the vestibular complex, but all other regions needed much stronger stimulations, especially the telencephalon.

In order to conduct an analysis of variance (Friedman non-parametric test for repeated measures) to determine if differences are significant between the stimulation values of different regions, the data for all stimulated regions must be available, a condition that was met in seven of the nine specimens. The statistical analysis of these seven sets of data reveals that, overall, the stimulation values vary significantly between regions ($P < 0.0001$). Dunn's post-test was applied to determine more precisely which groups differ from the others (table 2). Thus the minimal stimulation intensities required for Tec, OB and MT to elicit forelimb movement differ significantly from T, as is the case for LT for the contralateral forelimb, but the intensities for 5G, VA, Cbl and ipsilateral LT do not differ from T. Moreover, the intensities needed to induce either ipsi- or contralateral forelimb

movement by stimulation of 5G differ significantly from those of OB and MT, but other intergroup differences are not statistically significant.

On horizontal Nissl-stained sections of the head of a newborn opossum, trigeminal ganglion cells (5G in fig.3A) are more darkly stained than vestibular ganglion cells (8vG), suggesting that 5G cells are somewhat more mature (vestibular and trigeminal ganglia stain comparably in the mature animal). The branches of the trigeminal nerve are relatively well developed, especially the mandibular and maxillary branches, and the latter could easily be followed in the skin dermis or epidermis close to developing hairs (fig. 3B).

Nerve fibers were better visualized when stained to reveal NF200, which confirmed the important number of nerves in the snout skin (fig. 3C), notably around the follicles of developing hairs, comprising putative vibrissae (asterisks in fig. 3D). Labeled fibers in the snout distributed mainly in the dermis and at the base of the epidermis, but sometimes entered the latter (fig. 3C, D). To better appreciate the extent of skin innervation, we plotted the distribution of NF200-labeled fibers on serial, transverse sections of whole heads. Figure 4 illustrates such results on drawings of sections from one animal, the levels of the sections selected being indicated on the photograph of the head from another opossum at the lower left. Most rostrally NF200-labeled fibers are seen in and around the nostrils (N in fig. 4A). Proceeding more caudally until eye level (fig. 4B-D) labeling is observed mostly around the snout, especially laterally, whereas caudal to eye level it is found mostly around the lower jaw (fig. 4E, F) and on the ventral portion of the neck (Fig.

4G, H). Other than in the skin, NF200-labeled fibers were observed in the immature head muscle tissue but difficult to detect under the microscope; they are not plotted in figure 4, except the numerous ones in the tongue (To in fig. 4C-F).

The immunolabeling of NF200 also revealed staining in the three branches of the trigeminal nerve that could be followed back to the ganglion (empty arrows in fig. 3E) as well as in the central processes of the ganglion cells forming the spinal trigeminal tract (sp5 on fig. 3F). Trigeminal fibers were not the only ones labeled. NF200-positive fibers belonging to the facial nerve and, more important for the present study, the vestibular nerve are photographed in figure 3E. Peripherally, immunolabeling was seen in the utricular macula of the vestibular labyrinth (fig. 3H) and, centrally, vestibular fibers were followed into the brainstem near vestibulospinal neurons (Vs8 in fig. 3F-G, I), in the dorsolateral brainstem towards the cerebellar primordium as well as into the commissural fascicle (arrows in fig. 3F) identified by Pflieger and Cabana (1996). NF200-labeled fibers of uncertain origin were sparse in the medial medulla, and in the ventral and lateral mesencephalon (Mes in fig. 3F), as well as in the ventral diencephalon up to the level of the optic stalks. No labeling was seen in the telencephalon, except in the ventrocaudal part of olfactory bulbs (Fig.5A) and, from there, in a small fascicle running to the lamina terminalis (LTer; open arrows in Fig. 5A) at the external margin of the hippocampal germinal zone (Hip; open arrows in Fig.5B). Labeled structures looking like growth cones were observed close to the LTer (open arrowheads in Fig. 5C). A few growth cone-like endings exited the fascicle before the LTer and were followed into the

developing septal region. A few labeled fibers from the olfactory epithelium and the vomeronasal organ were also seen going to the OB (not shown).

In order to determine how trigeminal inputs could be relayed to the spinal cord in the newborn opossum, descending projections were retrogradely labeled by application of TRDA crystals on transections made either at the level of the first cervical segment or at the level of the brainstem just rostral to the obex (Fig 1B, dashed lines). When TRDA was applied on the first cervical segment, labeled neurons were found bilaterally in the medullary (mostly gigantocellular) and pontine reticular formation, the spinal trigeminal nucleus, the lateral vestibular nucleus and the presumptive locus coeruleus (fig. 3G, I-J). TRDA applications rostral to the obex labeled more neurons in these regions, as well as a few cells in the medial mesencephalic tegmentum ventral to the aqueduct.

The cell bodies within the trigeminal ganglia being clearly labeled by the marker (Fig. 6A), they were counted. TRDA applied to the cut cervical cord labeled an average of 121.5 ± 17.1 cells per trigeminal ganglion, whereas an average of 668.0 ± 117.0 cells were labeled following brainstem application of the dye (fig. 6B).

In addition to neurons, TRDA labeled fibers in the spinal trigeminal tract (fig. 3G, I) up to the trigeminal ganglion, and then the peripheral processes into the three branches of the trigeminal nerve, particularly the mandibular and maxillary branches (Fig. 3K). The intense fluorescent background made it difficult to trace TRDA fibers in the peripheral mesenchymal tissues, and fibers in the skin were too faint to be photographed.

Discussion

In the present study we compared the influence of three head sensory systems, vestibular, trigeminal and olfactory, on forelimb movement in order to determine which system is most likely to guide the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, from the birth canal to the nipple where it attaches. In *in vitro* preparations of the neuraxis with the limbs attached to the carcass, we measured the minimal intensities of stimulation of different brain regions needed to induce forelimb movement similar to what is performed by the intact newborn in relation to the threshold intensity (T) necessary for the dorsomedial cervical cord (C4) to evoke the same response. Stimulation of the trigeminal ganglion at ~ 2 T proved to be the most efficient, followed by the vestibular area at ~ 20 T, but the olfactory areas, either the olfactory bulb or the cortex, necessitated stimulations hundreds of times T. However, the values for the trigeminal ganglion and the vestibular area do not differ statistically from each other and from T.

The efficacy of vestibular stimulation in eliciting forelimb movement in our *in vitro* preparations came as no surprise in view of our earlier demonstration, from neuroanatomical tracing in intact newborn opossums, of vestibular peripheral processes in the inner ear utricle and of central processes (vestibular primary afferents) in parts of the vestibular complex, as well as of projections from neurons in these areas of the vestibular complex to the cervical spinal cord (Pflieger and Cabana, 1996). Since the journey of the newborn opossum from the urogenital opening to the nipple is effected at least partly against gravity, it was expected that the vestibular system plays a guidance

role, but the present study is the first physiological evidence of its ability to induce motor activity in the forelimbs of newborn opossums. The demonstration, in the former neuroanatomical investigation (Pflieger and Cabana, 1996) corroborated here with the NF200 immunolabeling, of vestibular primary afferents in the cerebellum may explain why the value of cerebellar stimulation, which was used here as a control, did not differ statistically from the value of vestibular complex stimulation (and of the trigeminal ganglion). Indeed the cerebellum of the newborn is so immature, with its external granular layer in formation, that its functionality is doubtful. Only vestibular pathways can explain the forelimb movement observed after cerebellar stimulation in the present preparations.

In spite of the above mentioned presence of Merkel cells in the facial skin of newborn opossums (Jones and Munger, 1985) and of trigeminal fibers in the facial skin of newborn wallabies (Waite et al., 1994), it was surprising that the most efficient brain area which stimulation induced forelimb movement was the trigeminal ganglion, considering the absence of a significant trigeminospinal pathway in mammals (compared to vestibulospinal pathways, for example). Nonetheless, the potency of the trigeminal system in influencing the movement of the newborn opossum is clear. The minimal trigeminal stimulation ($\sim 2T$) was about 10 times less than the minimal vestibular stimulation ($\sim 20T$).

The principal sensory cues relayed by trigeminal afferents are very likely mechanosensory. Merkel cells transduce touch (see Jones and Munger, 1985), but

thermoreception or chemoreception cannot be excluded (see Gemmell et al., 2002; Nelson and Gemmell, 2004). The abundant trigeminal fibers observed in association with the follicles of developing hairs and vibrissae, revealed by Nissl-staining and NF200 immunohistochemistry, speak for the importance of touch, as also suggested for the newborn wallaby (Waite et al., 1994). It is particularly relevant, in terms of locomotor influence, that the presence of trigeminal fibers in the skin, notably near developing hair follicles, was densest in the snout, the most developed part of the head and the one leading the newborn in its progression to the nipple, and which comes in contact with the mother's belly. However, the skin of the newborn being glabrous, it may not be touch of the hairs themselves, still inside the skin, that affects the trigeminal afferents, but touch of the skin in general. In five *in vitro* preparations used for the physiological study, we consistently induced forelimb extension following gentle tapping of the snout with fine forceps (not done in the other four preparations). Our demonstration of trigeminal fibers immunopositive for the relatively mature neurofilaments NF200 (Szaro and Strong, 2010), peripherally in the skin as well as centrally in the spinal trigeminal tract, supports a certain degree of development of the system.

The latter experiments as well as TRDA tracing revealed a direct trigeminal pathway from the facial periphery to the trigeminal ganglion neurons and to the upper cervical spinal cord in newborn opossums. However, such direct connection is very tenuous in the adult opossum, in which only rare trigeminal ganglion neurons are labeled after tracer application at cervical levels (unpublished observation). A direct, but very modest, projection from trigeminal primary afferents to the rostral spinal cord has been reported

in developing wallabies (Waite et al., 1994). Whether this projection is functional in newborn marsupials, perhaps contributing to influencing locomotor behavior, remains to be substantiated electrophysiologically by performing specific stimulations and recordings of the neural substrates.

Our TRDA tracing experiments revealed about five times as many labeled cells in the trigeminal ganglia after application in the caudal brainstem than after application in the cervical cord. This shows that trigeminal ganglion cells send many more processes to the brainstem than to the cord (the latter can be direct processes or collaterals of processes going to the brainstem). Likewise, and expectedly, a greater number of neurons were labeled in the brainstem areas known to project to the spinal cord in neonatal opossums (Wang et al., 1992) after TRDA applications to the caudal brainstem than to the cervical cord. These results provide evidence for an indirect action of the trigeminal system on the cord, notably through the reticular formation and, to a lesser extent, through the spinal trigeminal nucleus (see also Cabana and Martin, 1984 for the opossum *Didelphis virginiana*). Trigeminal projections to areas of the reticular formation containing spinal projecting neurons (Stewart and King, 1963; Shammah-Lagnado et al., 1987; Zerari-Mailly et al., 2001) as well as projections from the sensory trigeminal nuclei to the upper cervical segments and vestibulospinal neurons (Diagne et al., 2006) exist in adult rats. The importance of the trigeminal network in locomotor control has been elegantly demonstrated in lampreys, both anatomically and electrophysiologically (Viana di Prisco et al., 2005). In neonatal rats a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to the cord has been evidenced (Vinay et al., 1995). However, as mentioned in

Introduction, rats are born more mature than opossums and comparisons between them must be made cautiously when the functionality of a system is concerned. It can be noted that the vestibular system too can impinge on the cord indirectly via the reticular formation, as shown in eutherian mammals (Peterson, 1984; Wilson, 1993).

The very high stimulation intensities needed for the olfactory regions to provoke forelimb movement suggest that, instead of an effect of olfactory relays on the cord *per se*, current spread to subcortical structures which project to the cord. Without absolutely excluding a role for olfaction in guiding the newborn opossum to a nipple, this casts doubt on a powerful effect of olfaction on forelimb motility. If the studies of Tarozzo et al. (1995) and Shapiro et al. (1997) pleaded for some relatively developed components of the olfactory system in neonatal opossums, the study of Brunjes et al. (1992) pointed differently. The latter is supported by earlier (Ellendorf et al 1988) as well as more recent (Ashwell et al., 2008) investigations in the wallaby, whose gestation period is longer than that of the opossum. Here, we report in newborn opossums the presence of some NF200 immunoreactive fibers in the olfactory epithelium and vomeronasal organ as well as in tracts linking the olfactory bulbs to some telencephalic targets. However, in contrast to the more mature looking trigeminal or vestibular NF200-labeled fibers, the labeled fibers in the telencephalon have growth cone-like endings and may not be synaptically connected with their target neurons. In contrast to the vestibular system and even to the trigeminal system, the relays between the olfactory periphery and the spinal cord are numerous and the pathways longer, making the olfactory system a less potent influence on locomotion. Along these pathways, for example, we did not see NF200-labeled fibers

between the telencephalon and the diencephalon. If connections between the two areas have started to develop in the newborn opossum, they are not mature enough to possess NF200. How can the behavioral studies that have apparently shown a guiding influence of olfactory cues on locomotion of newborn marsupials (quokka: Cannon et al., 1976; brushtail possum: Veicht et al., 2000; wallaby: Schneider et al., 2009) be interpreted? The volatile compounds emanating from the mother's pouch could stimulate chemosensory systems other than the olfactory system, such as the gustatory system, whose brainstem relays are in better position to influence the spinal-projecting regions. Noteworthy, there are indications that Merkel cells may have some chemosensory properties (review in Lucarz and Brand, 2007). Due to the thinness of the skin in these newborn marsupials, Merkel cells could be the ones that reacted to the external compounds. The influence of the trigeminal system on locomotion of newborn opossums may have been underestimated, but makes sense in light of the findings of Waite et al. (1994) in wallabies. The trigeminal system may not act as a true guide of locomotion of the newborn on the mother's belly to a nipple. Indeed, guiding would require central networks that compare incoming inputs from different parts of the head and compensate for deviation from a defined goal, such as the vestibular system accomplishes in analyzing deviations from a course against gravity by comparing vestibular inputs from the left and right sides. Such elaborate trigeminal networks may not exist or be functional in the very immature brain. However, facial tactile inputs conveyed by the trigeminal system could serve as a driving force to sustain locomotion until a nipple is reached. Each contact of the newborn's head with the mother's belly would stimulate head mechanoreceptors and sustain motor

activity. Once near a nipple, trigeminal afferents may serve to trigger the suction reflex needed for the pup to attach to the nipple and remain fastened. The influence of the trigeminal system on precocious locomotor behaviors is probably a general rule in marsupials, and may be true in eutherian mammals as well.

Our investigation did not seek to verify the role of the visual system in locomotor guidance of the newborn opossum, since all previous studies of its development and our own observation concurred to show it was too immature. The mesencephalic tectum was nevertheless stimulated as a control. It is interesting to realize that the strength of tectal stimulation necessary to elicit forelimb movement compares to those of the medial or lateral olfactory telencephalon and may be unspecific (due to current spread), in line with the demonstration of tectal fibers growing into the cervical cord only around P16 (Wang et al., 1992).

4. Conclusion

As summarized in figure 7, the results obtained from the present physiological, immunohistochemical and tract tracing experiments in the opossum *Monodelphis domestica* does not support the olfactory system as a major guide of newborn locomotor behavior, but support our previous suggestion of the implication of the vestibular system. More significantly, these results show a much better developed trigeminal system than suspected.

Acknowledgments

This work was undertaken by T.A. in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree. It is funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #312015) and the Canadian Foundation for Innovation (#10442) to JFP, and NSERC (#3595) to TC.

References

- Adadja TA, Pflieger JF (2010), Trigeminal sensory innervation of the head in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Soc Neurosci Abstr 36:32.22.
- Aitkin L, Cochran S, Frost S, Martsi-McClintock A, Masterton B (1997), Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*: evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus. Hear Res 113:69-73.
- Ashwell KWS, Marotte LR, Cheng G (2008), Development of the olfactory system in a wallaby (*Macropus eugenii*). Brain Behav Evol 71:216–230.
- Barthélemy D, Cabana T (2005), Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: Immunohistochemical localization of acetylcholine. Dev Brain Res 155:87-98.

- Brunjes PC, Jazaeri A, Sutherland MJ (1992), Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *J Comp Neurol* 320:544-554.
- Cabana T (2000), The development of mammalian motor systems: the opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Res Bull* 53:615-626.
- Cabana T, Martin GF (1984), Developmental sequence in the origin of descending spinal pathways. Studies using retrograde transport techniques in the North American opossum (*Didelphis virginiana*). *Brain Res* 317:247-63.
- Cannon JR, Bakker HR, Bradshaw SD, McDonald IR (1976), Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka. *Nature* 259:42.
- Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T (1994), The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Behav Brain Res* 43:243-253.
- Coggeshall RE, Lekan HA (1996), Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364:6-15.
- Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L (2004) The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190:343-57
- Diagne M, Valla J, Delfini C, Buisseret-Delmas C, Buisseret P (2006) Trigemino-vestibular and Trigemino-spinal Pathways in Rats: Retrograde Tracing Compared with Glutamic Acid Decarboxylase and Glutamate Immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 496: 759-772.

- Døving KB, Selset R (1980) Behavior patterns in cod released by electrical stimulation of olfactory tract bundlets. *Science* 207:559-560.
- Ellendorff F, Tyndale-Biscoe CH, Mark RF (1988), Ontogenetic changes in olfactory bulb neural activities of pouched young tammar wallabies. In: *The endocrine control of the fetus* (Künzel W, Jensen A, eds), pp 193-200. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, VandeBerg JL, Hayssen V (1982), Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 32:405-409.
- Fady JC, Jamon N, Clarac F (1998) Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Dev Brain Res* 108:111-23.
- Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D, Cazalets JR (2006), Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J Physiol (Paris)* 100:304-16.
- Grimm RJ (1960) Feeding behavior and electrical stimulation of the brain of *Carassius auratus*. *Science* 131:162-163.
- Guillery RW (2002), On counting and counting errors. *J Comp Neurol* 447:1-7.
- Jones TE, Munger BL (1985), Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosens Res* 3:169-184.
- Kratzing JE (1986) Morphological maturation of the olfactory epithelia of Australian marsupials. In: Breipohl W (ed) *Ontogeny of Olfaction*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 57-70.

- Kraus DB and Fadem BH (1987), Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Lab Anim Sci* 37: 478- 482.
- Lamoureux S, Gingras J, Cabana T (2005), Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol* 65:143-56.
- Lavallée A, Pflieger JF (2009), Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: An anatomical study. *Brain Res* 1282:1-9.
- Lucarz A, Brand G (2007), Current considerations about Merkel cells. *Europ J Cell Biol* 86:243-251.
- Martin KEA, MacKay S (2003), Postnatal development of the fore-and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Anat* 202:143-152.
- McCluskey SU, Marotte LR, Ashwell KWS (2008), Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain Behav Evol* 71:271-286.
- Nagarajan R, Darlington RB, Finlay BL, Clancy B (2010) ttime: an R package for translating the timing of brain development across mammalian species. *Neuroinformatics* 8: 201–205.
- Nelson and Gemmell (2004), Implications of marsupial births for an understanding of behavioural development. *Int J Comp Psychol* 17: 53-70.

Nicholls JG, Stewart RR, Erulkar, SD, Saunders NR (1990), Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained in vitro. *J Exp Biol* 152:1-15.

Peterson BW (1984), The reticulospinal system and its role in the control of movement. In: *Brainstem control of spinal cord function* (Barnes CD ed), pp 27-86. Orlando: Academic Press.

Pflieger JF (2008), Trigeminal and vestibular inputs provide the major sensory cues to guide the locomotor behavior of newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Soc Neurosci Abstracts* 34:29.18.

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

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

Reimer K (1996), Ontogeny of hearing in the marsupial, *Monodelphis domestica*, as revealed by brainstem auditory evoked potentials. *Hear Res* 92:143-150.

Sánchez-Villagra MR, Gemballa S, Nummela S, Smith KK, Maier W (2002), Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in marsupial mammals. *J Morphol.* 251:219-238.

Shammah-Lagnado SJ, Negrao N, Silva BA, Ricardo JA (1987), Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neurosci* 20:961-989.

Shapiro LS, Roland RM, Halpern M (1997), Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *J Morphol* 234:109-129.

Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2009), The olfactory system of the tammar wallaby is developed at birth and directs the neonate to its mother's pouch odours. *Reproduction* 138:849-857.

Smith KK (2001), Early development of the neural plate, neural crest and facial region of the marsupials. *J Anat* 199:121-131.

Smith KK (2006), Craniofacial development in marsupial mammals: Developmental origins of evolutionary change. *Develop Dyn* 235:1181-1193.

Stewart WA, King RB (1963), Fiber projections from the nucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 121:271-286.

Stewart RR, Zou DJ, Treherne JM, Mollgard K, Saunders NR, Nicholls JG (1991), The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity. *J Exp Biol* 161:25-41.

Szaro BG, Strong MJ (2010), Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* 33:27-37.

- Tarozzo G, Peretto P, Biffo S, Varga Z, Nicholls JG, Fasolo A (1995), Development and migration of olfactory neurones in the nervous system of the neonatal opossum. *Proc Biol Sci Lond B* 262:95-101.
- Taylor JS, Guillery RW (1994), Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 350:109-121.
- Veicht CE, Nelson J, Gemmell RT (2000), Birth in the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula* (Marsupialia; Phalangeridae). *Aust J Zool* 48:691-700.
- Viana di Prisco G, Boutin T, Petropoulos D, Brocard F, Dubuc R (2005), The trigeminal sensory relay to reticulospinal neurons in lampreys. *Neurosci* 131:535-546.
- Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel JC, Pearlstein E, Pflieger JF (2002), Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res Rev* 40:118-129.
- Vinay L, Cazalets JR, Clarac F (1995), Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat. *Europ J Neurosci* 7:143-151.
- Waite PME, Marotte LR, Leamey CA (1994), Timecourse of development of the wallaby trigeminal pathway. I. Periphery to brainstem. *J Comp Neurol* 350:75-95.
- 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*. *Dev Brain Res* 68:203-216.

Wilson VJ (1993), Vestibulospinal reflexes and the reticular formation. *Prog Brain Res* 97:211–217.

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

Zerari-Mailly F, Pingaud G, Dauvergne C, Buisseret P, Buisseret-Delmas C (2001), Trigemino-reticulo-facial and trigemino-reticulohypoglossal pathways in the rat. *J Comp Neurol* 429:80-93.

	C4	VA	5G		OB		Cbl		Tec		LT		MT	
	I+C (n=9)	I+C (n=9)	I (n=9)	C (n=9)	I (n=8)	C (n=8)	I (n=9)	C (n=9)	I (n=9)	C (n=9)	I (n=7)	C (n=7)	I (n=8)	C (n=8)
T	0.4 ±	9.5 ±	0.7 ±	0.9 ±	167.4 ±	158.0 ±	20.3 ±	21.7 ±	116.2 ±	67.8 ±	59.4 ±		155.6 ±	158.6 ±
(μA)	0.0	1.8	0.1	0.2	45.8	37.2	4.4	4.5	44.4	10.3	14.2	90.9 ± 34.3	45.3	50.3
T	1.0 ±	21.1 ±	2.1 ±	2.4 ±	615.6 ±	566.6 ±	61.2 ±	65.8 ±	439.7 ±	220.9 ±	181.9 ±	291.0 ±	571.3 ±	595.3 ±
(nC4)	0.0	3.8	0.3	0.4	246.1	194.0	12.1	13.2	231.7	55.2	55.8	129.7	214.2	255.4

Table 1: Minimal intensities needed to induce ipsilateral (I) or contralateral (C) forelimb movements according to different stimulation sites in *in situ* preparations of newborn opossums. The values are given in absolute intensities (μA) and normalized to the spinal cord threshold (nC4). Sites of stimulation are fourth cervical segment (C4, threshold), vestibular area (VA), trigeminal ganglion (5G), olfactory bulb (OB), cerebellum (Cbl), mesencephalic tectum (Tec), and lateral (LT) and median (MT) ventral telencephalon.

Table 2: Minimal intensities needed to induce ipsilateral (I) or contralateral (C) forelimb movements according to different stimulation sites in *in situ* preparations of newborn opossums (n=7). The values are normalized to the spinal threshold (nC4). Sites of stimulation are as for table 1. Statistical analysis: Friedman repeated measures test (nonparametric ANOVA) with Dunn's post-tests. Results are only given for intergroup comparisons with C4, TrG - I and TrG - C as other comparisons are not statistically significant. n.s.: not significant; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.0001.

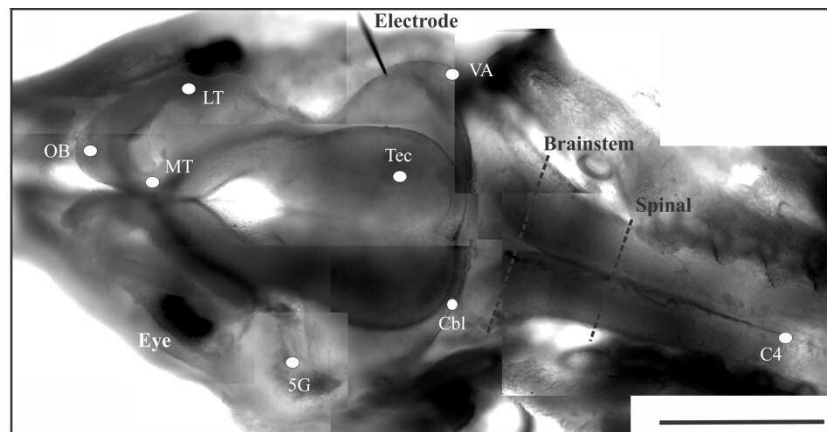


Fig. 1. Dorsal view of the head and neck regions of an *in vitro* preparation of a newborn opossum illuminated from below. The regions electrically stimulated to produce forelimbs movements are indicated on the photomontage. Abbreviations: see list. Scale bar: 1 mm.

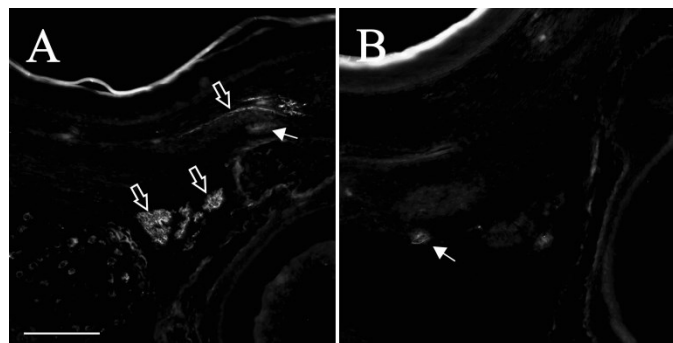


Fig. 2. Transverse sections of the head of a newborn opossum processed for NF200 immunohistochemistry with (A) or without (B) the primary antibody. Open arrows point to labeled nerve fibers and filled arrows to blood vessels. Scale bar: 100 μm .

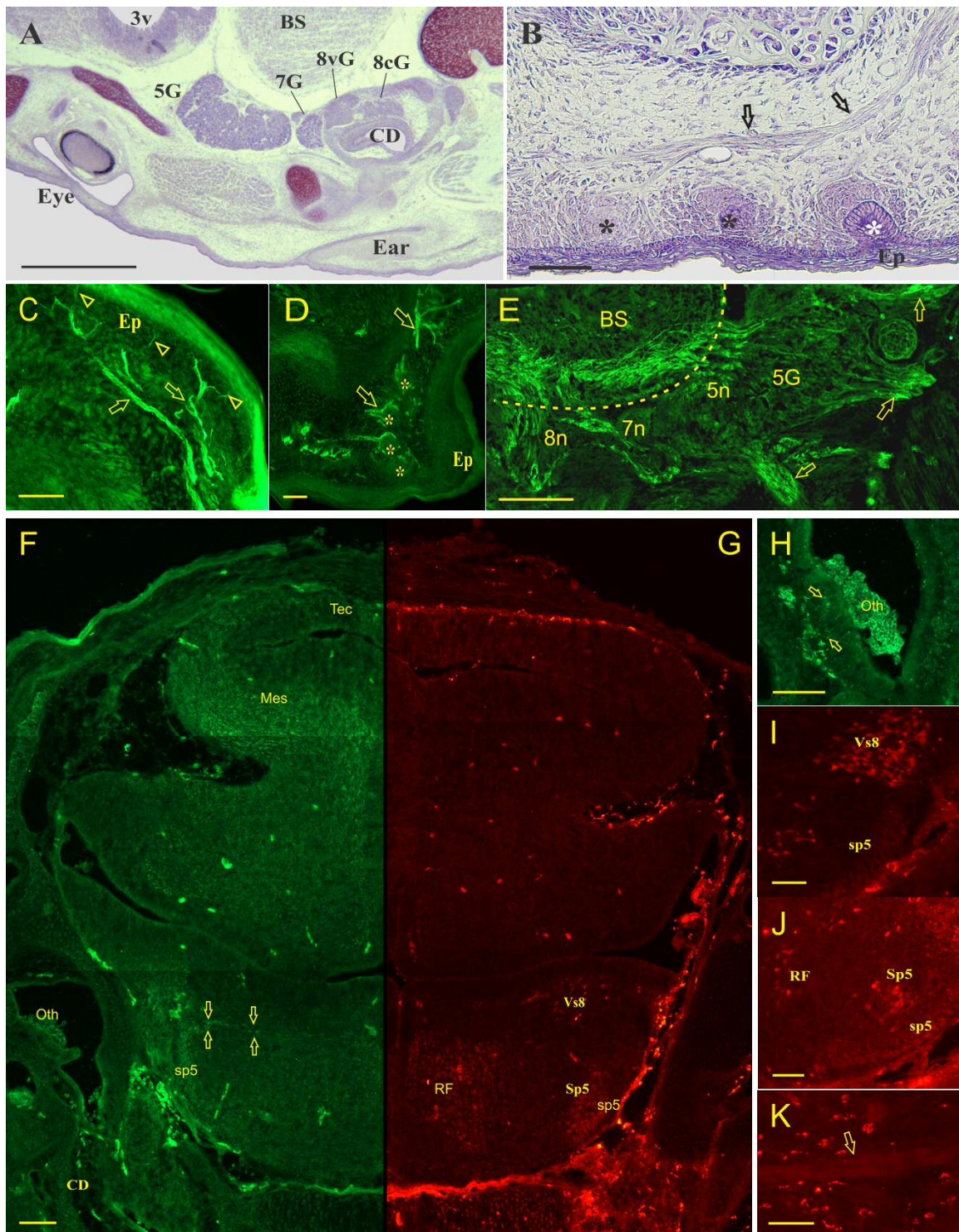


Fig. 3. (A) Horizontal Nissl-stained section of a newborn opossum's head showing various cranial ganglia. The trigeminal ganglion (5G) is larger, more accessible and the cytoplasm of its cells more darkly stained than the vestibular and cochlear components of the eighth nerve ganglion (8vG and 8cG, respectively). (B) Horizontal Nissl-stained section of a littermate showing fibers from the maxillary branch of the trigeminal nerve (open arrows) distributing in the dermis near putative developing vibrissae (stars). (C) Transverse section through the head skin showing distribution of NF200-labeled nerve fibers (open arrows). (D) NF200-labeled nerves (open arrows) around putative developing vibrissae (stars). (E) Parasagittal section through a newborn's head showing NF200-labeled fibers (open arrows) in the three branches of the trigeminal nerve (5n) as well as in the brainstem (BS). Note that fibers in the facial (7n) and vestibular (8n) nerves are also labeled. The dashed line delimits the brainstem. (F, G) Transverse section of a newborn's brain (in the head) which received TRDA application at the upper cervical level and was immunoprocessed for NF200. Different filters were used to visualize the NF200 labeled fibers (green, F) and the retrogradely labeled neurons and fibers (red, G) on the same section, but to help comparison G is shown in mirror image to F. (H) The arrows point to NF200 labeled nerve fibers (peripheral processes of vestibular ganglion cells) in the utricular macula of the vestibular labyrinth. (I-J) Retrogradely labeled cells in the spinal trigeminal (I) and vestibular nuclei (J) after TRDA application rostral to the obex. (K) TRDA labeled nerve fibers (open arrow) in the maxillary branch of the trigeminal nerve. Abbreviations: see list. Scale bars: A 500 μm ; B 50 μm C-K 100 μm .

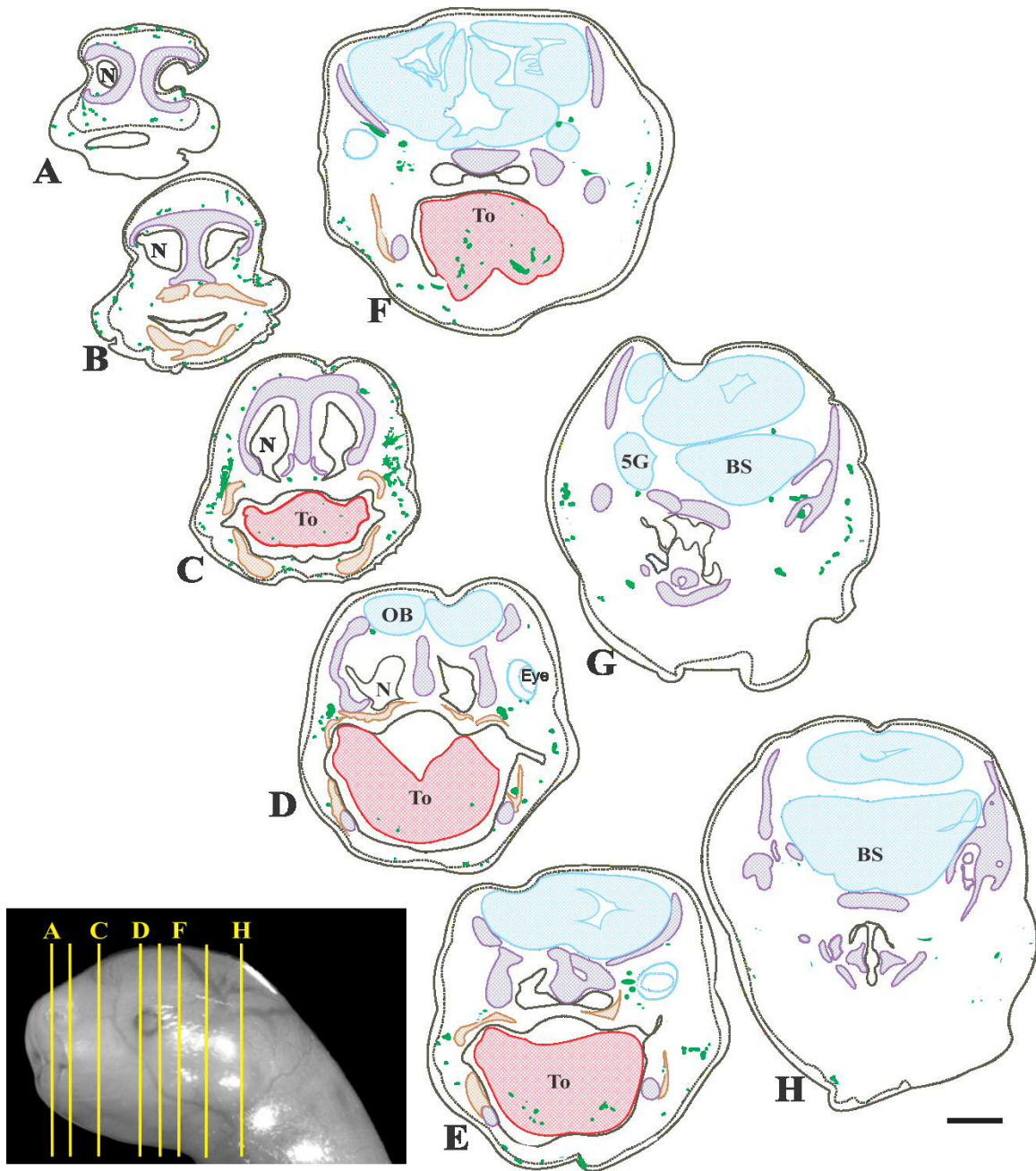


Fig. 4. Schematic drawings of transverse sections from the head of a newborn opossum processed to reveal NF200. The rostrocaudal levels of the sections are indicated on the photograph of another opossum's head at the bottom left. The NF200 labeling is in green. The brain is in blue, the cartilage in violet, the bone in brown and the muscle (tongue) in red. The dotted line delineates the epiderm from the derm. Abbreviations: see list. Scale bar: 500 μm .

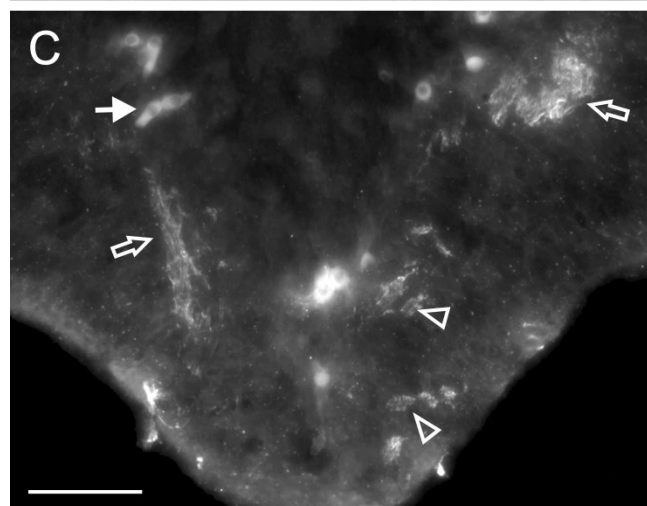
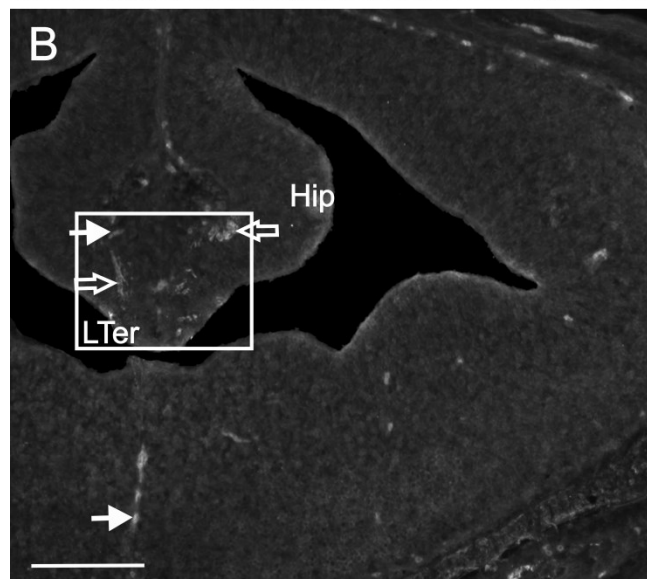
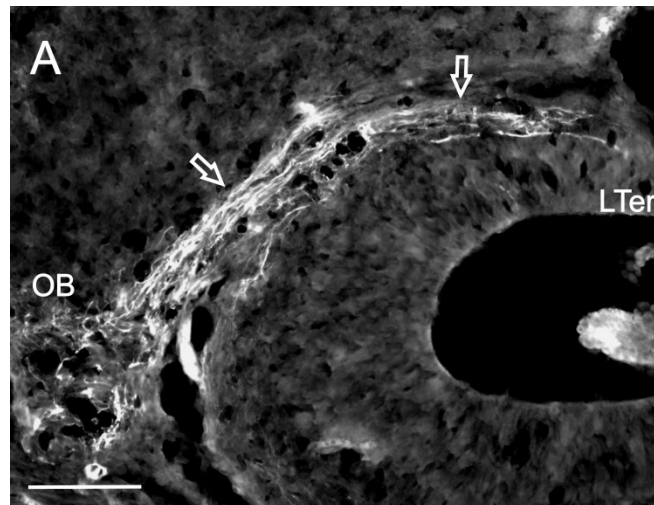


Fig. 5. (A) Parasagittal section of a newborn opossum's forebrain showing a fascicle of F200-labeled nerve fibers (open arrows) running from the olfactory bulb (OB) to the lamina terminalis (LTer). Dorsal is up and rostral is to the left. (B) Transverse section of the telencephalon of another specimen showing that the labeled fibers run at the margin of the hippocampal (Hip) germinal zone. Note the absence of NF200 labeling in other telencephalic regions. The inset is shown at higher magnification in (C), where the open arrows point to NF200 labeled fibers, the arrowheads to putative growth cones and the filled arrows to blood vessels. Scale bars: A and B 200 μm ; C 50 μm .

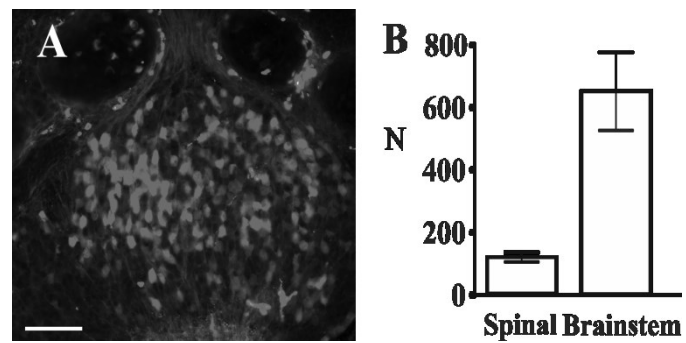


Fig. 6. (A) Section through the trigeminal ganglion from a specimen in which TRDA was applied just rostral to the obex. (C) Average number of labeled ganglion cells per trigeminal ganglion after TRDA applications rostral or caudal to the obex (n = 4 in each case). Scale bar: 100 μ m.

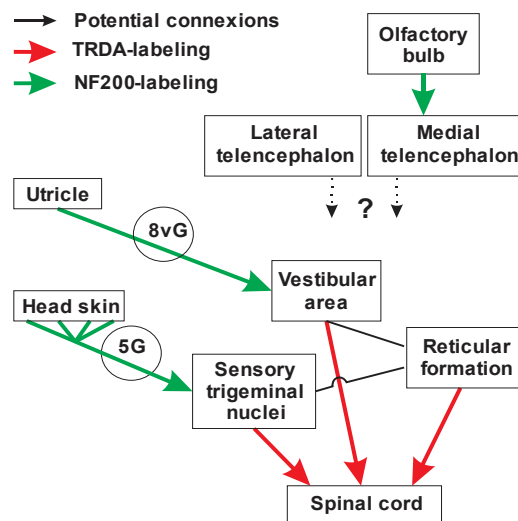


Fig. 7. Schematic representation of the different head sensory system projections in the opossum at birth that may influence forelimb movements.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Dans la présente étude, nous comparons l'influence de trois systèmes sensoriels de la tête, le vestibulaire, le trijumeau et l'olfaction sur le mouvement des membres antérieurs dans le but de déterminer ceux qui seraient suffisamment développés pour guider l'opossum nouveau-né, *Monodelphis domestica*, du sinus urogénital à la tétine de la mère. Dans des préparations *in vitro* d'axe neural avec les membres attachés à la carcasse nous avons stimulé électriquement la région dorsomédiane du segment cervical (C4) de la moelle épinière pour identifier le seuil d'intensité (T) qui induit des mouvements d'extension des membres antérieurs semblables à ceux du nouveau-né intact. Nous avons ensuite stimulé différentes régions céphaliques, associées aux sens ou servant de contrôle, pour mesurer les intensités nécessaires pour reproduire ces mouvements. Des stimulations du ganglion du trijumeau, à environ deux fois le seuil (2T), donnent les résultats les plus efficaces, suivis par des stimulations de la région des noyaux vestibulaires à environ 20T et du cervelet à environ 60T. D'un point de vue statistique, ces valeurs ne diffèrent pas de T. Par contre, l'induction des mouvements des membres nécessite des stimulations des centaines de fois plus élevées que l'intensité seuil T lorsque nous stimulons les bulbes olfactifs et des régions ventrales du télencéphale pouvant relayer les inputs olfactifs vers des régions motrices caudales. Des stimulations du tectum nécessitent aussi des valeurs très élevées (> 180T) pour induire des mouvements. L'étude de l'innervation de la peau faciale et des voies relayant les informations du trijumeau vers la moelle épinière en utilisant de l'immunohistochimie pour les neurofilament-200

(NF200) a permis de révéler de nombreuses fibres nerveuses dans le derme du museau, particulièrement dans la région maxillaire, mais également ailleurs dans la peau de la tête. Le traçage au Texas-Red couplé à des Dextrans Aminés (TRDA) révèle que quelques cellules du ganglion du trijumeau projettent à la moelle épinière supérieure, mais la majorité innerve la médulla caudale où elles pourraient entrer en contact avec les neurones secondaires des noyaux trijumeaux ou des cellules réticulaires projetant à la moelle épinière. Des cellules dans certains noyaux du complexe vestibulaire et dans la formation réticulaire sont marquées.

- ***Système vestibulaire***

La présente étude offre la première évidence physiologique de la capacité du système vestibulaire à induire une activité motrice au niveau des membres antérieurs chez l'opossum nouveau-né. Les inputs vestibulaires seraient à la base de comportements antigravitaires lors du passage entre le sinus urogénital à la mamelle. La présence de fibres exprimant NF200 au niveau de la macula utriculaire qui peuvent être suivies jusqu'à proximité des cellules vestibulospinales supporte l'hypothèse avancée par Pflieger et Cabana (1996) qu'une voie utriculo-vestibulospinale est suffisamment mature à la naissance pour influencer les comportements moteurs. Cette hypothèse demeure cependant à vérifier chez l'animal intact. Des expériences similaires à celles effectuées par Veitch et al 2000 pourraient permettre de vérifier si la gravité influence réellement l'animal intact. Des mères venant juste de mettre bas seraient anesthésiées et maintenues dans une position redressée. Les nouveau-nés seraient alors retirés des

tétines auxquelles ils sont fixés. Ces derniers seraient alors replacés sur le ventre de la mère à différentes distances et positions des tétines. Chez *Trichosurus vulpecula*, ces expériences ont montré que lorsqu'on place les nouveaux nés proche du sinus urogénital ou au-dessus des tétines, ils continuent de se déplacer vers le haut, impliquant ainsi une influence du système vestibulaire sur leur orientation lors du mouvement.

L'examen de l'ultra structure du système vestibulaire chez d'autres marsupiaux indique que la macule de l'utricule est aussi plus mature à la naissance que le reste de l'oreille interne et serait suffisamment développée pour permettre au nouveau-né de détecter et de répondre à la gravité (Gemmell et Nelson, 1989; Krause, 1991; Gemmell et Nelson, 2004). Mais comme l'a observé McCluskey et al. (2008), on rencontre certaines variations entre les différentes espèces concernant les régions projetant les informations vestibulaires vers la moelle épinière. Les noyaux vestibulaires n'ayant pas de projection spinale avant P5 chez le wallaby, contrairement à ce qui est observé chez *M. domestica* (Pflieger et Cabana, 1996). De plus, le développement du saccule et des canaux semi-circulaires se trouvent à différents stades chez les nouveau-nés de différentes espèces de marsupiaux ce qui peut signifier que l'importance de la gravité pour guider les nouveau-nés n'est pas la même pour toutes les espèces (revue dans Nelson et Gemmell, 2004)

Les résultats de notre étude montrent qu'une stimulation au niveau du cervelet peut entraîner des réponses motrices à environ 60T. Toutefois, le cervelet du nouveau-né est si immature, qu'il est peu probable qu'il soit fonctionnel. Il est plus probable que les afférences primaires vestibulaires qui se distribuent dans cet organe (Pflieger et Cabana,

1996) aient été stimulées et que le signal ait été transmis rétrogradement aux cellules vestibulospinales.

- ***Système du trijumeau***

Nos résultats montrent que des stimulations du ganglion du trijumeau induisent des mouvements des membres presque aussi facilement que des stimulations de la moelle épinière. Cela suggère que le système du trijumeau influence fortement la motricité chez l'opossum nouveau-né. Toutefois, la stimulation du ganglion ne nous renseigne pas sur les modalités sensorielles qui sont impliquées. Parmi ces modalités, se trouvent les sensations tactiles, mais aussi la thermoréception et la chimioréception qui ne peuvent pas être exclues (voir Gemmell et al., 2002; Nelson et Gemmell, 2004).

Des récepteurs sensoriels du toucher, les cellules de Merkel, ont été décrits dans la peau entourant la bouche de six espèces représentant cinq familles de marsupiaux (Gemmell et al, 1988, Hughes et Hall 1988, Jones et Munger, 1985). De nombreuses fibres trigéminales en association avec des follicules pileux et des vibrisses en développement, révélées par la coloration de Nissl et l'immunohistochimie contre NF-200, suggèrent que le toucher joue un rôle important, comme cela a été suggéré chez le wallaby nouveau-né (Waite et al., 1994). D'ailleurs, les fibres trigéminales sont plus denses au niveau de la peau du museau donc de la région de la tête en contact avec le substrat lors de la progression du nouveau-né vers la tétine. C'est aussi la région de la tête qui entrera en premier en contact avec la tétine, ce qui doit déclencher les comportements nécessaires à l'accrochement. Il est possible d'induire des mouvements d'extension des membres

antérieurs sur des préparations in vitro, en faisant de légères tapes sur le museau, mais ce genre de stimulation induit difficilement la locomotion. À cause de la taille des spécimens et du peu d'ouverture de la bouche, il est difficile d'évaluer si ce type de stimulation provoque des comportements de succion.

Nos expériences de traçage au TRDA ont révélé environ cinq fois plus de cellules marquées dans le ganglion du trijumeau après une application dans la partie caudale du tronc cérébral qu'après une application dans la région cervicale de la moelle épinière. Cela montre que les cellules ganglionnaires du trijumeau envoient plus de projections vers le tronc cérébral que vers la moelle épinière de l'opossum nouveau-né. Cependant, cette connexion directe est presque inexistante chez l'opossum adulte, chez qui seules de rares cellules du ganglion du trijumeau sont marquées après l'application de traceurs au niveau cervical de la moelle épinière. Une projection directe, mais modeste, des afférences primaires trigéminales à la moelle épinière rostrale a été rapportée pour le wallaby en développement et semble persister chez l'adulte (Waite et al., 1994). La fonctionnalité de ces projections chez les nouveau-nés marsupiaux ainsi que leur possible influence sur le comportement locomoteur reste à prouver par des stimulations spécifiques et des enregistrements des substrats neuraux. Des projections directes des afférences primaires trigéminales à la moelle épinière sont aussi observées chez le rat adulte au niveau des premiers segments cervicaux ainsi que des projections provenant du noyau mésencéphalique du trijumeau. Ces projections ont été observées comme relayant des inputs de la branche mandibulaire du trijumeau, mais aussi de la branche ophtalmique. De nombreuses projections trigémino-vestibulospinales sont aussi observées chez le rat

adulte (Diagne et al, 2006). Ce qui laisse à penser que, chez le rat adulte et probablement les marsupiaux adultes aussi, ces projections ont un rôle dans le contrôle du mouvement du cou et de la posture de la tête.

Les expériences de traçage au TRDA à partir de la moelle ont aussi révélé un grand nombre de neurones dans les régions du tronc cérébral connues pour projeter vers la moelle épinière chez l'opossum nouveau-né (Wang et al., 1992). Ces projections sont plus nombreuses vers la moelle cervicale que la moelle épinière. Les inputs relayés par les afférences du trijumeau peuvent être transmis à la moelle épinière par le biais de la formation réticulée et du noyau spinal du trijumeau (voir Cabana & Martin, 1984 pour l'opossum *Didelphis virginiana*). Les projections du trijumeau vers des structures pouvant influencer la moelle épinière chez les mammifères sont, étonnamment, mal connues. Toutefois, des enregistrements physiologiques extra- et intracellulaires sur des préparations *in vitro* de rats nouveau-nés couplés à des stimulations électriques du nerf trijumeau ont permis de mettre en évidence une voie polysynaptique fonctionnelle des afférences du trijumeau vers la moelle lombaire (Vinay et al., 1995). Dans cette étude, des expériences plus approfondies utilisant des bloqueurs pharmacologiques et des lésions spécifiques du tronc et de la moelle suggèrent que ces voies comprennent un relais ipsilatéral GABAergique dans le tronc cérébral et un autre relais, bilatéral, dans la moelle au niveau des régions cervicale et thoracique. Des études anatomiques chez le rat adulte ont permis de décrire des projections des noyaux sensoriels du trijumeau vers la formation réticulaire, particulièrement les noyaux contenant les neurones réticulospinaux (Stewart et King, 1963; Shammah-Lagnado et al., 1987; Zerari-Mailly et

al., 2001), ainsi que des projections vers les segments cervicaux supérieurs et même vers les neurones vestibulospinaux (Diagne et al., 2006). On peut noter que le système vestibulaire peut lui aussi affecter la moelle indirectement par le biais de relais vers la formation réticulaire, comme montré chez les mammifères euthérien (Peterson, 1984; Wilson, 1993).

- ***Système olfactif***

Les stimulations des bulbes olfactifs demandent de très fortes intensités pour provoquer des mouvements des membres antérieurs. De telles intensités ne permettent pas de garantir une stimulation précise et circonscrite, le courant pourrait donc stimuler d'autres structures sous-corticales qui projettent vers la moelle épinière. Sans absolument exclure le rôle de l'olfaction dans le guidage du nouveau-né vers la tétine, cela entraîne un doute quant à un effet significatif de l'olfaction sur la motilité des membres antérieurs. Si les études de Tarozzo et al. (1995) et Shapiro et al. (1997) plaident pour un développement relatif des composantes du système olfactif chez l'opossum nouveau-né, les études de Brunjes et al. (1992) suggèrent au contraire que les bulbes sont encore dans un état très immature. L'immaturité des bulbes à la naissance est supportée par des études électrophysiologiques (Ellendorf et al., 1988) et anatomiques (Ashwell et al., 2008) chez le wallaby, qui démontrent un développement tardif des structures des bulbes olfactifs ainsi que de leurs réponses physiologiques à des stimulations de l'épithélium olfactif par des substances volatiles.

Nous rapportons chez le nouveau-né d'opossum la présence de fibres immunoréactives au NF200 dans l'épithélium olfactif, ainsi que dans les voies reliant les bulbes olfactifs à certaines régions télencéphaliques. Cependant, les fibres marquées dans le télencéphale montrent parfois des terminaisons ressemblant à des cônes de croissance ce qui suggère qu'elles pourraient ne pas avoir établi de connexions synaptiques avec des neurones cibles à ce stade. De plus, l'absence de fibres exprimant NF200 entre le télencéphale et le diencephale suggère que les connexions potentielles entre les bulbes olfactifs et les centres moteurs situés plus caudalement sont relativement peu développées ou encore très immatures. Pour vérifier une possible implication de l'olfaction par ces fibres, des expériences subséquentes à celles de ce travail ont été menées au laboratoire par Hour et al (2013). Il est connu que chez les opossums nouveau-nés, les neurones exprimant les gonadolibérines (GnRH) migrent des placodes olfactives au cerveau le long du nerf terminal, qui sert aussi de substrat pour la croissance des fibres de ces neurones (Schwanzel-Fukuda et al. 1988; Tarozzo et al. 1995). Des expériences immunohistochimiques contre NF200 et GnRH ont été effectuées chez des opossums allant de 2 à 11 jours dans le but de vérifier si les fibres visibles chez le nouveau-né dans ces régions pourraient être associées aux voies de migration des neurones GnRH. Les résultats ont confirmé la présence de fibres exprimant NF200 allant du septum nasal aux bulbes olfactifs et, de là, de manière centrale, le long de l'épithélium à partir duquel se développera l'hippocampe jusqu'à la région présomptive du septum. Ces fibres changent peu de taille entre P2 et P11 et ne semblent pas exprimer GnRH. Elles sont chevauchées sur toute leur longueur par des faisceaux de fibres exprimant GnRH qui,

à partir de P11, se retrouvent encore plus caudalement vers les régions ventrales de l'hypothalamus où elles se diffusent. Le cortex olfactif ne présente toujours pas de fibres exprimant NF200 à P11. Ces résultats supportent l'idée que les afférences neuronales précoces observées dans le bulbe olfactif des opossums nouveau-nés servent de substrat à la croissance des fibres exprimant GnRH vers leurs cibles dans les noyaux hypothalamiques et que le système olfactif est encore trop immature à la naissance pour influencer le comportement moteur du nouveau-né.

Alors comment doit-on interpréter les études comportementales ayant apparemment montré une influence sur la locomotion des marsupiaux nouveau-nés de signaux olfactifs (quokka: Cannon et al., 1976; brushtail possum: Veicht et al., 2000; wallaby: Schneider et al., 2009)? Les produits volatils émanant de la poche de la mère pourraient stimuler des systèmes chimiosensoriels autres que le système olfactif, comme le système gustatif dont les relais sont situés dans le tronc cérébral et peuvent avoir un impact plus direct sur la moelle épinière.

Le système gustatif n'est peut-être pas le seul impliqué. En effet, plusieurs études suggèrent que les cellules de Merkel pourraient posséder quelques propriétés chimiosensorielles (revue dans Lucarz et Brand, 2007). Vu la fine épaisseur de la peau chez les nouveau-nés marsupiaux, les cellules de Merkel pourraient être celles qui réagissent à des molécules externes émanant de la région des tétines.

- ***Systèmes visuel et auditif***

Il n'a pas été possible de stimuler directement les systèmes visuel et auditif vu que leur développement se fait bien après la naissance (voir introduction). Le tectum mésencéphalique a toutefois été stimulé comme contrôle. L'intensité des stimulations nécessaires pour induire un mouvement des membres antérieurs est comparable à celle utilisée pour le télencéphale ventral médian et latéral et la réponse motrice obtenue est probablement due à une stimulation non spécifique de régions tegmentaires ou tectales. Le locus cœruleus est une des structures qui peut avoir été stimulée, et il est connu que certains des neurones de ce noyau projettent vers la moelle chez l'opossum nouveau-né (Wang et al., 1992).

Comme résumé dans la figure 7 de l'article, les résultats obtenus lors de la présente étude chez l'opossum *Monodelphis domestica* ne supportent pas l'implication du système olfactif pour guider le comportement locomoteur du nouveau-né. Ils confirment la possible implication du système vestibulaire. Plus significativement, ces résultats pointent vers une implication du système du trijumeau plus importante qu'on ne le soupçonnait. Une étude menée au laboratoire (Desmarais et al., 2013) montre, grâce à des expériences électrophysiologiques, l'implication des cellules de Merkel dans la sensibilité tactile de la face et suggère leur forte influence sur les comportements moteurs des opossums nouveau-nés, et leur possible contribution dans le guidage du nouveau-né dans son périple vers la tétine et son attachement à cette dernière. D'autres études sont

nécessaires pour identifier spécifiquement toutes les modalités sensorielles qui pourraient être relayées par ce système et influencer la locomotion.

5. BIBLIOGRAPHIE

Adadja TA, Pflieger JF (2010), *Trigeminal sensory innervation of the head in newborn opossums, Monodelphis domestica*. Soc Neurosci Abstr 36:32.22.

Aitkin L, Cochran S, Frost S, Martsi-McClintock A, Masterton B (1997), *Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, Monodelphis domestica: evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus*. Hear Res 113:69-73.

Amalric M, Cabana T, Pflieger JF (2011). *Is the mesencephalic locomotor region necessary for locomotion of newborn opossums (Monodelphis domestica)?* Soc Neurosci Abstr 37: 335.20.

Amalric M, Cabana T, Pflieger JF (2012). *Electrical stimulation of the MLR and pharmacological manipulation induce locomotion in newborn opossums Monodelphis domestica*. Soc Neurosci Abstr 38: 734.22.

Ashwell KWS, Marotte LR, Cheng G (2008), *Development of the olfactory system in a wallaby (Macropus eugenii)*. Brain Behav Evol 71:216–230.

Barnes RD, Barthold SW, (1969). *Reproduction and breeding behaviour in an experiment colony of Marmosa mitis Bangs (Didelphidae)*. J Reprod Fert Suppl. 6: 447–482.

Barthélemy D, Cabana T (2005), *Postnatal development of limb motor innervation in the opossum Monodelphis domestica: Immunohistochemical localization of acetylcholine*. Dev Brain Res 155:87-98.

Beckoff A (1985), *Development of locomotion in vertebrates: A comparative perspective*. Dans E. S. Gollin (Ed), *The comparative development of adaptive skills: evolutionary implications*. London, UK: Erlbaum, pp. 57-94.

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

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

Cabana T, Martin GF (1984), *Developmental sequence in the origin of descending spinal pathways. Studies using retrograde transport techniques in the North American opossum (Didelphis virginiana)*. Brain Res 317:247-63.

Cannon JR, Bakker HR, Bradshaw SD, McDonald IR (1976), *Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka*. Nature 259:42.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T (1994), *The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum Monodelphis domestica*. Behav Brain Res 43:243-253.

Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L (2004) *The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms*. J Comp Physiol 190:343-57.

Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L (2004) *The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 190:343-57

Coggeshall RE, Lekan HA (1996), *Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review*. J Comp Neurol 364:6-15.

Darian-Smith I 1973, *The trigeminal system*. Handbook of Sensory Physiology, 2:271-314.

Diagne M, Valla J, Delfini C, Buisseret-Delmas C, Buisseret P (2006) *Trigeminovestibular and Trigeminothalamic Pathways in Rats: Retrograde Tracing Compared with Glutamic Acid Decarboxylase and Glutamate Immunohistochemistry*. J Comp Neurol 496: 759-772.

Desmarais MJ, Cabana T, Pflieger JF (2013) *Facial mechanosensory influence on forelimb movement in newborn opossums, Monodelphis domestica*. Soc Neurosci Abstr 610.07.

Døving KB, Selset R (1980) *Behavior patterns in cod released by electrical stimulation of olfactory tract bundles*. Science 207:559-560.

Ellendorff F, Tyndale-Biscoe CH, Mark RF (1988), *Ontogenetic changes in olfactory bulb neural activities of pouched young tammar wallabies*. Dans: *The endocrine control of the fetus* (Künzel W, Jensen A, eds). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 193-200.

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

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

Fady JC, Jamon N, Clarac F (1998), *Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat*. Dev Brain Res 108:111-23.

Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D, Cazalets JR (2006), *Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective*. J Physiol (Paris) 100:304-16.

Gemmell RT (1982). *Breeding bandicoots in Brisbane (Marsupialia: Peramelidae)*. Aust. Mammal. 5: 187–194.

Gemmell R, Johnston G (1985), *The development of thermoregulation and the emergence from the pouch of the marsupial bandicoot, Isoodon macrourus*. Physiol. Zool. 8: 299–302.

Gemmell RT (1995), *Breeding biology of brushtail possums Trichosurus vulpecula (Marsupialia: Phalangeridae) in captivity*. Aust. Mammal. 8: 1–7.

- Gemmell RT, Peters B, Nelson J (1988), *Ultrastructural identification of Merkel cells around the mouth of the newborn marsupial*. *Anatomy and Embryology* 177: 403-408.
- Gemmell RT, Nelson J (1989). *Vestibular system of the newborn marsupial cat Dasyurus hallucatus*. *Anatomical Record* 225: 203-208.
- Gemmell RT, Veitch CE, Nelson J (1999), *Birth in the northern brown bandicoot, Isoodon macrourus (Marsupialia: Peramelidae)*. *Aust. J. Zool.* 47:517–528.
- Gemmell R T, Veitch C, Nelson, J (2002), *Birth in marsupials*. *Comp Biochem Physiol* , 131: 621-630.
- Gingras J , Cabana T (1999,) *Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, Monodelphis domestica*. *J Comp Neurol* 414: 551-560.
- Grillner S (1975), *Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction*. *Physiol Rev* 55(2): 247-304.
- Grillner S, Wallen P (1985), *Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates*. *Anny Rev Neurosci* 8:233-61.
- Grimm RJ (1960) *Feeding behavior and electrical stimulation of the brain of Carassius auratus*. *Science* 131:162-163.
- Guillery RW (2002), *On counting and counting errors*. *J Comp Neurol* 447:1-7.
- Hartman CG (1920). *Studies in the development of the opossum Didelphys virginiana V. The phenomena of parturition*. *Anat. Rec.* 19: 1–11.
- Hour N, Cabana T, Pflieger JF (2013), *Olfactory fibers as a substrate for the growth of GnRH fibers in neonatal opossums?*. *Soc Neurosci Abstr* 610.03.
- Hughes R L, Hall LS (1988), *Structural adaptations of the newborn marsupial*. Dans C.H. Tyndale-Biscoe CH, Janssens PA(Eds), *The developing marsupial. Models for biomedical research*. Berlin, Germany: Springer Verlag, pp. 8-27.
- Hughes RL, Hall LS, Tyndale-Biscoe CH, Hinds L A (1989), *Evolutionary implication of macropodid organogenesis*. In G. Grigg, P. Jarman, & I. Hume (Eds), *Kangaroos, wallabies and rat-kangaroos*. Sydney, Australia: Surrey Beatty & Sons, pp. 377-405.
- Hultborn H, Conway BA, Gossard JP, Brownstone R, Fedirchuk B et al. (1998), *How do we approach the locomotor network in the mammalian spinal cord?* *Ann NY Acad Sci* 860: 70 82.
- Hutson GD (1976), *Grooming behaviour and birth in the dasyurid marsupial Dasyuroides byrnei*. *Aust. J. Zool.* 24: 277–282.

- Jones TE, Munger BL (1985), *Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (Monodelphis domestica)*. Somatosens Res 3:169-184.
- Kandel ER, Swartz JH, Jessell TM (eds) (2000), *Principles of neural science*. McGraw Hill 4e edition.
- Kiehn O (2006), *Locomotor circuits in the mammalian spinal cord*. Annu Rev Neurosci 2: 279-306.
- Klima M, (1987), *Early development of the shoulder girdle and sternum in marsupials (Mammalia: Metatheria)*, Springer Verlag, Berlin and New York, 91p.
- Kratzing JE (1986), *Morphological maturation of the olfactory epithelia of Australian marsupials*. In: Breipohl W (ed) *Ontogeny of Olfaction*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 57-70.
- Kraus DB and Fadem BH (1987), *Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (Monodelphis domestica)*. Lab Anim Sci 37: 478- 482.
- Krause W J (1991), *The vestibular apparatus of the opossum (Didelphis virginiana) prior and immediately after birth*. Acta Anatomica 142: 57-59.
- Lamoureux S, Gingras J, Cabana T (2005), *Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum Monodelphis domestica*. Brain Behav Evol 65:143-56.
- Langworthy OR (1928), *The control of posture by the central nervous system*. Physiol. Rev., vol . 8, pp. 151-190.
- Lavallée A, Pflieger JF (2009), *Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, Monodelphis domestica: An anatomical study*. Brain Res 1282:1-9.
- Leblond H and Cabana T (1997), *Myelination of the ventral and dorsal roots of the C8 and L4 segments of the spinal cord at different stages of development in the gray opossum, Monodelphis domestica*. J Comp Neurol 386: 203 216.
- Lillegraven JA, Thompson SD, McNab BK, Patton JL (1987), *The origin of eutherian mammals*. Biol J Linnean Soc 32: 281-n336.
- Lucarz A, Brand G (2007), *Current considerations about Merkel cells*. Europ J Cell Biol 86:243-251.
- Lyne, AG (1974), *Gestation period and birth in the marsupial Isoodon macrourus*. Aust. J. Zool. 22, 303–309.
- Lyne AG (1976), *Observations on oestrus and the oestrous cycle in the marsupials Isoodon macrourus and Perameles nasuta*. Aust. J. Zool. 24: 513–521.

- Martin KEA, MacKay S (2003), *Postnatal development of the fore-and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, Monodelphis domestica*. J Anat 202:143-152.
- McCluskey SU, Marotte LR, Ashwell KWS (2008), *Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (Macropus eugenii)*. Brain Behav Evol 71:271-286.
- Muir GD (2000), *Early ontogeny of locomotor behavior : a comparison between altricial and precocial animals*. Brain Res Bull 53(5): 719–26.
- Nagarajan R, Darlington RB, Finlay BL, Clancy B (2010), *time: an R package for translating the timing of brain development across mammalian species*. Neuroinformatics 8: 201–205.
- Nelson J (1992), *Developmental staging in a marsupial Dasyurus hallucatus*. Anat. Embryol 185: 335–354.
- Nelson and Gemmell (2004), *Implications of marsupial births for an understanding of behavioural development*. Int J Comp Psy 17: 53-70.
- Nicholls JG, Stewart RR, Erulkar, SD, Saunders NR (1990), *Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, Monodelphis domestica, isolated and maintained in vitro*. J Exp Biol 152:1-15.
- Orlovsky GN, Deliagina TG, Grillner S (eds) (1999), *Neuronal control of locomotion in: From mollusc to man*. Oxford UP; Oxford.
- Peterson BW (1984), *The reticulospinal system and its role in the control of movement*. In: *Brainstem control of spinal cord function* (Barnes CD ed), pp 27-86. Orlando: Academic Press.
- Pflieger JF (2008), *Trigeminal and vestibular inputs provide the major sensory cues to guide the locomotor behavior of newborn opossums, Monodelphis domestica*. Soc Neurosci Abstracts 34:29.18.
- Pflieger JF, Cabana T (1996), *The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, Monodelphis domestica*. Anat Embryol 194:75-88.
- Pflieger JF, Cassidy G, Cabana T (1996), *Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, Monodelphis domestica*. Behav Brain Res 80:137-143.
- Reimer K (1996), *Ontogeny of hearing in the marsupial, Monodelphis domestica, as revealed by brainstem auditory evoked potentials*. Hear Res 92:143-150.
- Renfree MB, Fletcher TP, Blanden DR, Lewis PR, Shaw G, Gordon K, Short R., Parer-Cook E, & Parer D (1989), *Physiological and behavioural events around the time of birth in macropodid marsupials*. In G. Grigg, P. Jarman, & I. Hume (Eds.), *Kangaroos, wallabies and rat-kangaroos*. Sydney, Australia: Surrey Beatty and Sons, pp. 323-337.

Reynolds HC (1952), *Studies on reproduction in the opossum (Didelphis virginiana)*. Univ. Calif. Publ. Zool. 52, 223–284.

Sánchez-Villagra MR, Gemballa S, Nummela S, Smith KK, Maier W (2002), *Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in marsupial mammals*. J Morphol. 251:219-238.

Sánchez -Villagra MR and Maier M. (2003), *Ontogenesis of the Scapula in Marsupial Mammals, With Special Emphasis on Perinatal Stages of Didelphids and Remarks on the Origin of the Therian Scapula*. J Morphol. 258:115; K.E Sears (204) Evolution 18 : 2353.

Shammah-Lagnado SJ, Negrao N, Silva BA, Ricardo JA (1987), *Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat*. Neurosci 20:961-989.

Shapiro LS, Roland RM, Halpern M (1997), *Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, Monodelphis domestica*. J Morphol 234:109-129.

Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2009), *The olfactory system of the tammar wallaby is developed at birth and directs the neonate to its mother's pouch odours*. Reproduction 138:849-857.

Schwanzel-Fukuda M, Fadem BH, Garcia MS , Pfaff, DW (1988), *Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the brain and nervus terminalis of the adult and early neonatal gray short-tailed opossum (Monodelphis domestica)*. J. comp. Neurol. 276, 44–60 .

Sharman GB, Calaby JH (1964), *Reproductive behaviour in the red kangaroo, Megaleia rufa, in captivity*. CSIRO Wildlife Res. 9: 58–85.

Smith KK (2001), *Early development of the neural plate, neural crest and facial region of the marsupials*. J Anat 199:121-131.

Smith KK (2006), *Craniofacial development in marsupial mammals: Developmental origins of evolutionary change*. Develop Dyn 235:1181-1193.

Stewart WA, King RB (1963), *Fiber projections from the nucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus*. J Comp Neurol 121:271-286.

Stewart RR, Zou DJ, Treherne JM, Mollgard K, Saunders NR, Nicholls JG (1991), *The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity*. J Exp Biol 161:25-41.

Szaro BG, Strong MJ (2010), *Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease*. Trends Neurosci 33:27-37.

- Tarozzo G, Peretto P, Biffo S, Varga Z, Nicholls JG, Fasolo A (1995), *Development and migration of olfactory neurones in the nervous system of the neonatal opossum*. Proc Biol Sci Lond B 262:95-101.
- Taylor JS, Guillery RW (1994), *Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, Monodelphis domestica*. J Comp Neurol 350:109-121.
- Tyndale-Biscoe CH, Renfree MB. (1987), *Reproductive physiology of marsupials*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 476p.
- Tyndale-Biscoe CH (2005), *Life of Marsupials*. Csiro Publishing. 442p.
- Veicht CE, Nelson J, Gemmell RT (2000), *Birth in the brushtail possum, Trichosurus vulpecula (Marsupialia; Phalangeridae)*. Aust J Zool 48:691-700.
- Viana di Prisco G, Boutin T, Petropoulos D, Brocard F, Dubuc R (2005), *The trigeminal sensory relay to reticulospinal neurons in lampreys*. Neurosci 131:535-546.
- Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel JC, Pearlstein E, Pflieger JF (2002), *Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways*. Brain Res Rev 40:118-129.
- Vinay L, Cazalets JR, Clarac F (1995), *Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat*. Europ J Neurosci 7:143-151.
- Waite PME, Marotte LR, Leamey CA (1994), *Timecourse of development of the wallaby trigeminal pathway. I. Periphery to brainstem*. J Comp Neurol 350:75-95.
- 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*. Dev Brain Res 68:203-216.
- Ward JW (1954), *The development of the cortico-spinal tract in the pouch-young of the Virginia opossum, Didelphys virginiana*. J Comp. Neur. 101(2):483-494.
- Williams R, Williams A (1982), *The life cycle of Antechinus swainsonii (Dasyuridae:Marsupialia)*. Dans : Archer, M. (Ed.), *Carnivorous marsupials*, Royal Zoological Society, Sydney, Australia pp. 89-95.
- Wilson VJ (1993), *Vestibulospinal reflexes and the reticular formation*. Prog Brain Res 97:211-217.
- Wilson VJ, Melvill-Jones G (1979), *Mammalian vestibular physiology*. Plenum Press, London.
- Zerari-Mailly F, Pingaud G, Dauvergne C, Buisseret P, Buisseret-Delmas C (2001), *Trigemino-reticulo-facial and trigemino-reticulohypoglossal pathways in the rat*. J Comp Neurol 429:80-93

