



HAL
open science

Activité calcique et communication paracrine avant synaptogenèse dans le développement du néocortex murin

Jean-Claude Platel

► **To cite this version:**

Jean-Claude Platel. Activité calcique et communication paracrine avant synaptogenèse dans le développement du néocortex murin. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011566

HAL Id: tel-00011566

<https://theses.hal.science/tel-00011566>

Submitted on 8 Feb 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Activité calcique et communication paracrine avant synaptogenèse dans le développement du néocortex murin

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-Claude PLATEL

le 28/10/2005 devant le jury composé de :

Président :	Rémy Sadoul
Rapporteurs :	Michel Désarménien Alfonso Represa
Examineur :	Stéphane Dieudonné
Directeur de Thèse :	Alain Dupuis
Co-Directeur de Thèse :	Mireille Albrieux

Remerciements

Il me semble que c'était hier que je rentrais dans le labo. Tout juste le temps de faire quelques manips, et c'est déjà fini...je tiens donc à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyé pendant ces 4 années dans les labos:

Tout d'abord ma directrice de thèse Mimi:

Je me souviens en début de thèse, tu m'a mis en garde sur les rapports thésard directeur de thèse qui tendent à se compliquer en fin de thèse...et bien pas du tout, même si nous n'avons pas la même façon de travailler, même si la fin à été épique (notamment cette frayeur du 27 août...) j'ai passé 4 super années, et je crois finalement sans jamais la moindre engueulade. Ça a été vraiment un grand bonheur, à la fois professionnel mais aussi humain de travailler avec toi. Je ne sais pas de quoi l'avenir sera fait, mais c'est avec grand plaisir que je continuerai cet extraordinaire sujet...

Les membres de l'équipe "virtuelle" neurogénèse :

Michel qui m'a fait découvrir tant de chose...tout d'abord la neuro en me faisant venir dans son labo (au passage merci à Evelyne), j'ai peut-être vieilli précocement sur certains points mais appris tellement de chose. Ça a été un plaisir d'être dans le labo que tu dirigeais, de partager le même bureau, mais aussi de se balader sur les côtes adriatiques ou sur les flancs du Charmant-som!

Alain, mon directeur de thèse "officiel" qui a bienheureusement déteint sur moi en m'apportant sa rigueur, son entrain et je crois son impétuosité (je pense vraiment que ça peut être une qualité !). Je n'aurais jamais fini de te demander des conseils tant tu connais de chose !

Le petit Jacques sans qui ce projet n'aurait jamais pu aboutir. Je pense que c'est ainsi qu'il faut voir la science, s'appuyer les uns les autres. A certains moments, notre complémentarité m'a impressionné, on a ainsi pu vérifier que $1+1=3$. Si tu as du mal à programmer l'algorithme pour vérifier ça, je te donnerais un coup de main...

Sylvie avec qui j'ai pris plaisir à manipuler pendant une année.

Tous les membres de cette équipe sont maintenant dispersés aux 4 coins de la ville mais, sait-on jamais, peut-être nous retrouverons-nous plus tard pour former une équipe du tonnerre...nous verrons dans quelques années les directions que nous avons suivies...

Je souhaite vivement remercier les membres du jury pour la formidable discussion que nous avons pu avoir lors de cette soutenance de thèse; Rémy Sadoul pour avoir dirigé avec brio cette discussion, Michel Désarménien et Alfonso Represa pour avoir relu et corrigé mon manuscrit dans des temps records...mais aussi Stéphane Dieudonné.

Monsieur le directeur Marc Savasta, pour nous avoir accueilli Mireille et moi et pour m'avoir permis de finir cette thèse dans les meilleures conditions. Mais aussi en tant qu'avant centre de grande classe pour avoir parfaitement su se démarquer et inscrire ce magistral but suivi d'embrassade au sol !!!

Nicolas pour ces formidables discussions et pour tout ce qu'il a pu m'apprendre en si peu de temps. Quel dommage que nous n'ayons pas pu travailler ensemble plus longtemps !

Mes anciens collègues du labo CIS et tout particulièrement deux d'entre eux, Stef pour tous les délires qu'on a pu avoir et Séverine avec qui j'ai franchi ce cursus et qui est devenue depuis très proche de moi...

Tous mes collègues de l'U704, même si j'ai pas encore trop compris sur quoi vous travaillez tous, le développement des réseaux neuronaux, c'est ça ? Ca me plait bien alors...

Ma famille, mon grand frère (qui au passage s'il se souvient bien me doit une Ferrari suite à un pari d'une vingtaine d'années), ma soeur, ma mère et mon père pour m'avoir donné cette soif de connaissance, et tous pour m'avoir soutenu durant toutes ces années.

Table des matières

INTRODUCTION.....	7
<i>PREMIERE PARTIE : LE DEVELOPPEMENT DU NEOCORTEX.....</i>	8
I. STADES PRECOCES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CEREBRAL.....	8
II. LES PREMIERES ETAPES DE LA NEUROGENESE	11
A. Les cellules précurseurs	11
B. La formation de la préplaque	15
C. La migration neuronale	17
1. La migration radiaire.....	17
2. La migration tangentielle	19
III. LES ANOMALIES DU DEVELOPPEMENT CORTICAL	21
<i>DEUXIEME PARTIE : ROLE DES ACTIVITES ELECTRIQUES ET CALCIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....</i>	25
I. LE SYSTEME VISUEL	28
II. L'HIPPOCAMPE	30
III. LE CERVELET.....	32
IV. LA MOELLE EPINIÈRE.....	35
V. LE CORTEX CEREBRAL.....	38
PROBLEMATIQUE	43
RESULTATS	45
<i>PREMIERE PARTIE : EXPRESSION PRECOCE DE CANAUX SODIQUES DANS LES CELLULES DE CAJAL-RETZIUS AU STADE DE LA PREPLAQUE</i>	45
<i>DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE L'ACTIVITE CALCIQUE SPONTANEE ET DE SA SYNCHRONIE DANS LE NEOCORTEX EMBRYONNAIRE DE SOURIS.....</i>	55
I. MISE AU POINT D'UN LOGICIEL D'ANALYSE.....	55
II. ETUDE DES ACTIVITES CALCIQUES SPONTANEEES AU STADE E13.....	83
<i>TROISIEME PARTIE : ROLE DES CANAUX SODIQUES DANS LA SECRETION DE GLUTAMATE AU STADE DE LA PREPLAQUE</i>	85
<i>QUATRIEME PARTIE : ROLE DE LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS LA CORTICOGENESE</i>	111

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	115
BIBLIOGRAPHIE	121
ANNEXE	129

Liste des abréviations

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
CICR : calcium induced calcium release
CP : plaque corticale
GABA : gamma-aminobutyric acid
GDPs : giant depolarizing potentials
InsP3 : Inositol trisphosphate
LGE : éminence ganglionnaire latérale
MGE : éminence ganglionnaire médiale
NMDA : N-methyl-D-aspartate
MZ : zone marginale
PA : potentiel d'action
PP : préplaque
RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction
RyR : Récepteur de la ryanodine
SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SP : sous-plaque
SVZ : zone sous-ventriculaire
TTX : tétrodotoxine
VZ : zone ventriculaire

Liste des illustrations

Figure 1 : Neurulation de l'embryon de mammifère.....	8
Figure 2 : Schéma des vésicules cérébrales.	9
Figure 3 : Architecture et devenir d'un télencéphale d'un embryon de rat de 15 jours.....	10
Figure 4 : Schéma de Kölliker d'une imprégnation de Golgi d'un cerveau de fœtus humain (4 mois et 25 jours de gestation).....	12
Figure 5 : Les cellules gliales radiaires sont des précurseurs neuronaux in vivo.....	13
Figure 6 : Translocation nucléaire des cellules proliférantes au cours du cycle cellulaire dans le neuroépithélium.....	15
Figure 7 : La formation des différentes couches du néocortex. D'après Gupta et al., 2002. ...	16
Figure 8 : Les deux principaux modes de migrations radiaires au cours du développement néocortical.	19
Figure 9 : Origine extracorticale de neurones corticaux.	20
Figure 10 : Clichés IRM de cerveaux de patients lissencéphaliques.	21
Figure 11 : Schéma d'une section de cerveau humain adulte représentant différentes malformations corticales.	22
Figure 12 : Les défauts de lamination corticale dans les lissencéphalies et le double cortex..	23
Figure 13 : L'activité neuronale chez l'adulte.	26
Figure 18 : Le système visuel chez l'homme.....	29
Figure 19 : Activité spontanée dans l'hippocampe.....	30
Figure 20 : Le système de co-culture.	31
Figure 21 : Représentation schématique de la migration des cellules granulaires lors de leur migration dans le cortex cérébelleux en développement.	32
Figure 22 : La migration des neurones cérébelleux est dépendante des variations cytoplasmiques de calcium.....	34
Figure 23 : Différents profils d'activité présents lors du développement des neurones de la moelle épinière du xénope.....	35
Figure 24 : La différenciation neuronale est contrôlée par les activités calciques spontanées.	36
Figure 25 : Vagues calciques induites électriquement et se propageant dans la VZ.	39
Figure 26 : Expression et rôle du glutamate au stade E13 chez la souris.	40
Figure 27: Variations des concentrations de neurotransmetteurs lors du développement du cortex cérébral chez la souris.	41

Figure 28 : Expression fonctionnelle de canaux sodiques dans la préplaque au stade E13.....	47
Figure 29: Les activités calciques spontanées au stade E14.	58
Figure 30 : Mise en évidence de l'expression fonctionnelle des récepteurs glutamatergiques, GABA _A , glycinergiques et des canaux sodiques dans le néocortex au stade E13.	84
Figure 31: Représentation schématique de la cascade de signalisation survenant suite à l'activation des récepteurs glycinergiques dans les neurones néocorticaux au stade E13 chez la souris.....	87
Figure 32: Culture organotypique de tranche de cerveau.	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des activités calciques spontanées au stade E13.....	83
---	----

Introduction

Le cerveau est une machine biologique stupéfiante et de grande complexité. Chez l'homme, le cerveau ne compte pas moins de 100 milliards de neurones et cent fois plus de cellules gliales. Les avancées techniques et scientifiques des neurosciences durant la dernière décennie permettent d'espérer l'élucidation prochaine de quelques secrets de son fonctionnement. L'étude des processus développementaux permettant la construction coordonnée et relativement reproductible de cette architecture complexe est tout aussi fascinante. C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse.

Après avoir expliqué comment se mettent en place les ébauches architecturales du cerveau, je ferai un petit historique sur les premiers travaux concernant les cellules du neuroépithélium à partir de la fin du 19^{ème} siècle. J'aborderai ensuite les différents processus de la formation précoce du cortex, à savoir la prolifération des cellules précurseurs, la mise en place des premières cellules neuronales de la préplaque (PP), et enfin les migrations des neurones postmitotiques conduisant à la formation de la plaque corticale. Je dédierai un paragraphe de cette introduction aux malformations cérébrales congénitales afin de comprendre de quelle manière des perturbations du programme normal du développement - notamment de la migration neuronale - peuvent intervenir dans ces malformations. L'étude du rôle des activités électriques et calciques dans la formation du système nerveux central est devenu un champ particulier de la neurobiologie du développement. Je détaillerai dans une deuxième partie, le fonctionnement des canaux porteurs de ces activités, puis les résultats obtenus dans différentes parties du système nerveux central chez les vertébrés illustrant les rôles joués par l'activité dans le développement.

Première partie : Le développement du néocortex

I. Stades précoces du développement embryonnaire cérébral

Chez les vertébrés, la gastrulation va permettre la formation des 3 couches embryonnaires (début de la 3^{ème} semaine de gestation chez l'homme) : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La corde dorsale se forme à partir du mésoderme, et va émettre des signaux inducteurs vers l'ectoblaste, entraînant une différenciation de ses cellules en cellules précurseurs neurales. Durant ce processus appelé neurulation, l'ectoderme s'épaissit et devient la plaque neurale (milieu de la 3^{ème} semaine chez l'homme) (Figure 1A). Les bords de cette plaque neurale vont se redresser (stade de la gouttière neurale) (Figure 1B) et se rejoindre pour fermer le tube neural (milieu de la 4^{ème} semaine chez l'homme, 9^{ème} jour embryonnaire chez la souris (E9)) (Figure 1C-D).

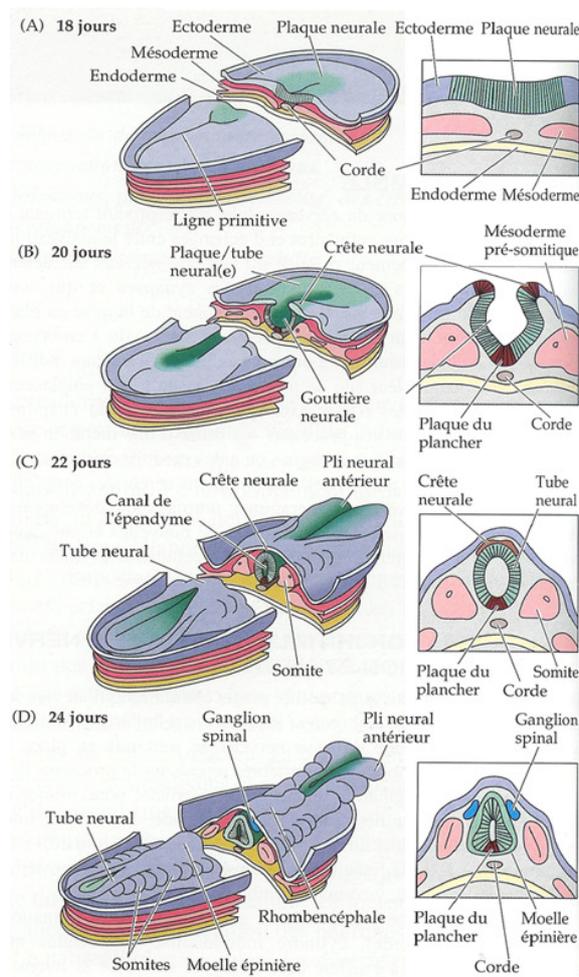


Figure 1 : Neurulation de l'embryon de mammifère.

Vues dorsales (à gauche) et transversales (à droite) de l'embryon à différents stades de la neurulation. D'après Purves et al., 1999.

Après la fermeture du tube neural antérieur, les ébauches des principales régions du cerveau prennent forme. Des divisions cellulaires successives au sein du neuroépithélium vont entraîner la formation des 3 vésicules cérébrales primaires : le prosencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau moyen et enfin le rhombencéphale ou cerveau postérieur (Figure 2). La partie la plus rostrale du prosencéphale donnera lieu au télencéphale.

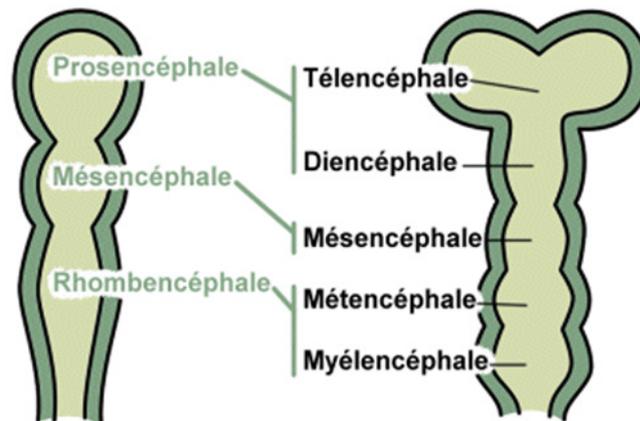


Figure 2 : Schéma des vésicules cérébrales.

Disponible sur le site http://www.apprentoile.u-bordeaux2.fr/WEmbryos/sys_nerv.htm

Chez les mammifères, ce dernier peut être subdivisé en deux structures : le sous-pallium côté ventral, et le pallium côté dorsal. Le sous-pallium est constitué de l'éminence ganglionnaire latérale, qui sera à l'origine du striatum, de l'éminence ganglionnaire médiane, futur globus pallidus, et de l'éminence ganglionnaire caudale qui deviendra l'amygdale (Deacon *et al.*, 1994). Le pallium regroupe l'archipallium, ébauche de l'hippocampe, le néopallium, ébauche du néocortex, et le paléopallium. Le diencephale donnera le thalamus et l'hypothalamus ainsi que les cupules optiques (Figure 3). Enfin, dans la région caudale, le métencéphale formera le cervelet et le pont alors que le myélocéphale donnera naissance au futur bulbe rachidien.

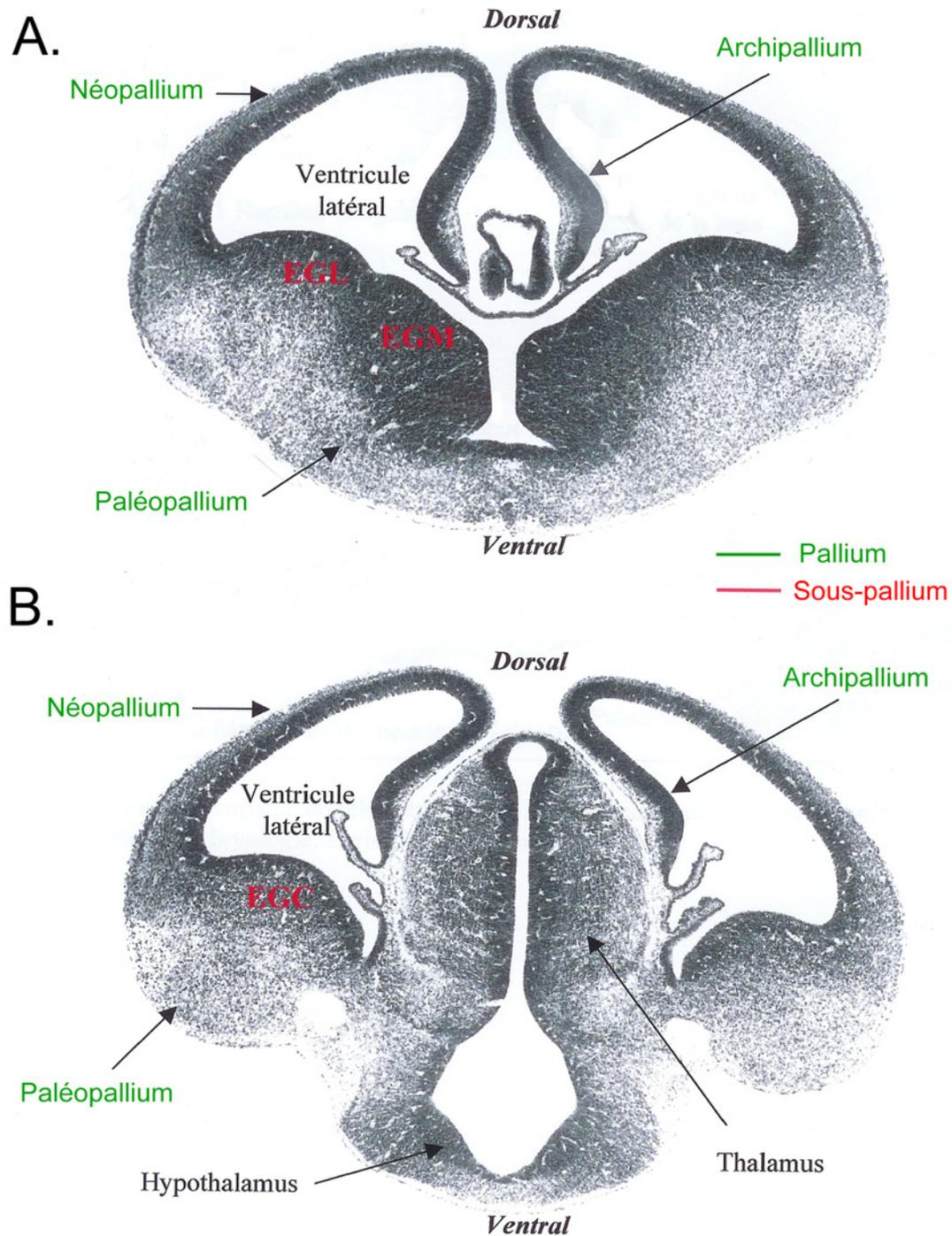


Figure 3 : Architecture et devenir d'un télencéphale d'un embryon de rat de 15 jours. Coupes frontales à un niveau médian (A) et à un niveau plus caudal (B). EGL : Eminence Ganglionnaire Latérale ; EGM : Eminence Ganglionnaire Médiale ; EGC : Eminence Ganglionnaire Caudale. D'après Altmann & Bayer, 1995.

II. Les premières étapes de la neurogenèse

A. Les cellules précurseurs

Chez la souris, le neuroépithélium apparaît à partir du 9^{ème} jour embryonnaire (E9). Il consiste alors en une couche unique de neuroblastes prolifératifs, appelée le neuroépithélium germinatif ou zone ventriculaire (VZ), en rapport avec sa localisation en bordure du ventricule. Ces neuroblastes ont été le sujet de nombreuses polémiques quant à leur appartenance gliale ou neuronale et sont toujours l'objet de débats actuels. Un petit rappel historique de leur découverte permettra de mieux comprendre cette dualité.

Les premières descriptions de ces cellules précurseurs datent de la fin du 19^{ème} siècle (pour revue voir Bentivoglio & Mazzarello, 1999). La mise au point de la coloration de Golgi (coloration au nitrate d'argent des membranes des neurones) a permis dans les années 1880 à de nombreux anatomistes tels que Kolliker, His, Golgi, Magini, Cajal, Retzius et bien d'autres encore, d'identifier des cellules épithéliales cylindriques avec un prolongement vers la surface du cerveau (Figure 4). Magini, travaillant à l'université de Rome, dénomma ces cellules des cellules gliales radiaires. Il put même, à l'aide de la coloration de Golgi et d'une contre coloration à l'hématoxyline (marquage des noyaux des cellules), apercevoir des varicosités présentes sur les prolongements de ces cellules qu'il supposa être de futures cellules neuronales associées étroitement aux fibres radiaires. Magini proposa donc que ces cellules épithéliales se divisent pour donner des neurones et servent ensuite de support à leur migration. Cajal contredit cette théorie et proposa que ces fibres radiaires n'aient qu'un rôle structural pour le cerveau en développement, interprétant les varicosités comme des accumulations protoplasmiques et non comme des cellules.

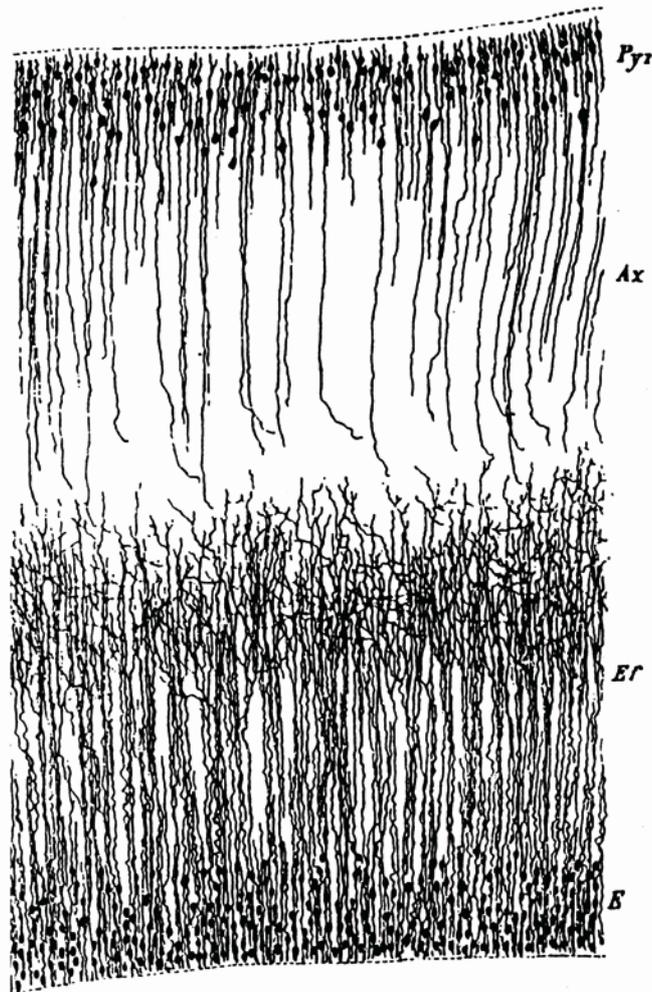


Figure 4 : Schéma de Kölliker d'une imprégnation de Golgi d'un cerveau de fœtus humain (4 mois et 25 jours de gestation).

La légende originale attire l'attention sur "des cellules épendymaires dans plusieurs couches et des cellules épendymaires qui traversent plus de la moitié de l'épaisseur" et sur "les cellules pyramidales (Pyr) avec leurs axones (Ax) et dendrites". D'après Bentivoglio & Mazzarello, 1999.

Ces cellules radiaires furent longtemps considérées, en accord avec la théorie de Cajal, comme ayant exclusivement un rôle structural dans le cerveau en développement. En effet, à l'instar des cellules gliales, ces cellules stockent des granules de glycogène (Bruckner & Biesold, 1981), établissent des contacts étroits avec les vaisseaux sanguins (Chanas-Sacre *et al.*, 2000), et sont couplées par des jonctions communicantes (Lo Turco & Kriegstein, 1991). Ces cellules radiaires furent donc logiquement appelées "gliales radiaires". Malgré ces caractéristiques gliales, ces cellules expriment plusieurs marqueurs de cellules précurseurs neuronales tels que la vimentine (Pixley & de Vellis, 1984), la nestine (Frederiksen & McKay, 1988), ainsi que RC2 (Hartfuss *et al.*, 2001). Ces cellules gliales n'ont jamais été considérées comme des progéniteurs neuronaux et ce, jusqu'à très récemment.

Depuis les années 2000, plusieurs laboratoires ont fourni les preuves que les cellules gliales radiaires étaient des précurseurs neuronaux majeurs. L'équipe de Magdalena Götz fut une des premières à montrer, en utilisant la technique du FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), que les cellules précurseurs ont une morphologie de cellule gliale radiaire, et que ces deux populations expriment les mêmes marqueurs. De plus, lorsque ces cellules radiaires sont isolées *in vitro*, elles peuvent se diviser pour donner naissance à des neurones et des astrocytes (Malatesta *et al.*, 2000). Peu après, Noctor démontra, en infectant les cellules gliales radiaires à l'aide d'un virus portant le gène de la GFP, que ces cellules radiaires étaient également *in vivo* des précurseurs neuronaux (Noctor *et al.*, 2001) (Figure 5). Les cellules radiaires ne sont plus présentes chez l'adulte puisqu'elles se transforment en cellules gliales astrocytaires (Schmechel & Rakic, 1979; Noctor *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2004). Plus de 100 ans après leur découverte, il est maintenant admis que ces cellules gliales radiaires sont des précurseurs neuronaux dans le néocortex.

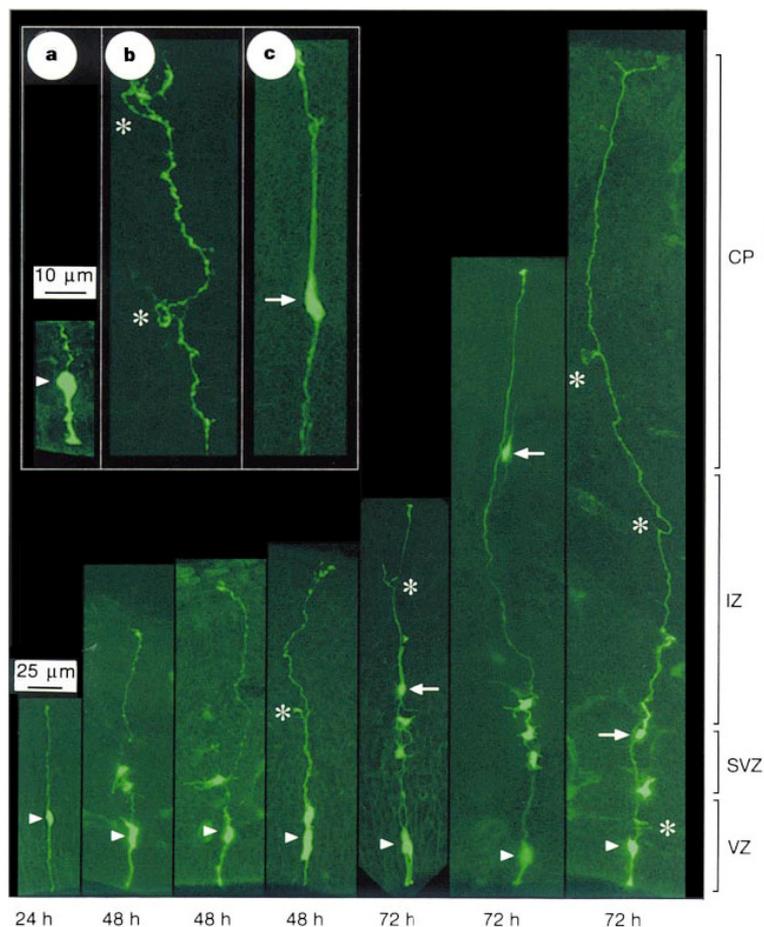


Figure 5 : Les cellules gliales radiaires sont des précurseurs neuronaux *in vivo*.
Exemple d'une cellule gliale radiaire, visible 24 heures après l'infection d'un virus exprimant la GFP. Le marquage GFP permet de suivre l'apparition de cellules filles marquées (des neurones) après 48h en culture. D'après Noctor *et al.*, 2001.

Dès 1935, Sauer observa que les noyaux des cellules du neuroépithélium semblent adopter une position oscillante dans l'épaisseur de l'épithélium et se divisent en bordure du ventricule (Sauer, 1935) (Figure 6, panneau du haut). Lors de la prolifération des précurseurs, le noyau des cellules se déplace au sein de la VZ au cours des phases du cycle cellulaire. La phase S se produit lorsque le noyau est à la frontière entre la VZ et la zone sous-ventriculaire (SVZ). L'incorporation de nucléotides marqués tels que la thymidine tritiée ou le bromo déoxy-uridine (BrdU) lors de la phase de synthèse de l'ADN (phase S) permet de suivre assez facilement les différentes phases du cycle cellulaire (Figure 6, panneau du bas). Au stade E13 la phase S dure environ 4h (Miyama *et al.*, 1997). Lors de la fin de la phase S/ début de la phase G2, le noyau se déplace vers la bordure ventriculaire où s'effectuera la future mitose (les phases G2+M durent 2h à E13). Lors de la phase G1, qui dure approximativement 5h30 à E13, le noyau se déplacera progressivement à nouveau vers la bordure externe de la VZ pour recommencer un cycle. La durée totale de ces cycles va augmenter au fur et à mesure de la neurogenèse et passer de 8h à E11 à 18h à E17 (Takahashi *et al.*, 1995) mais le noyau adoptera toujours le même mouvement au sein de la VZ.

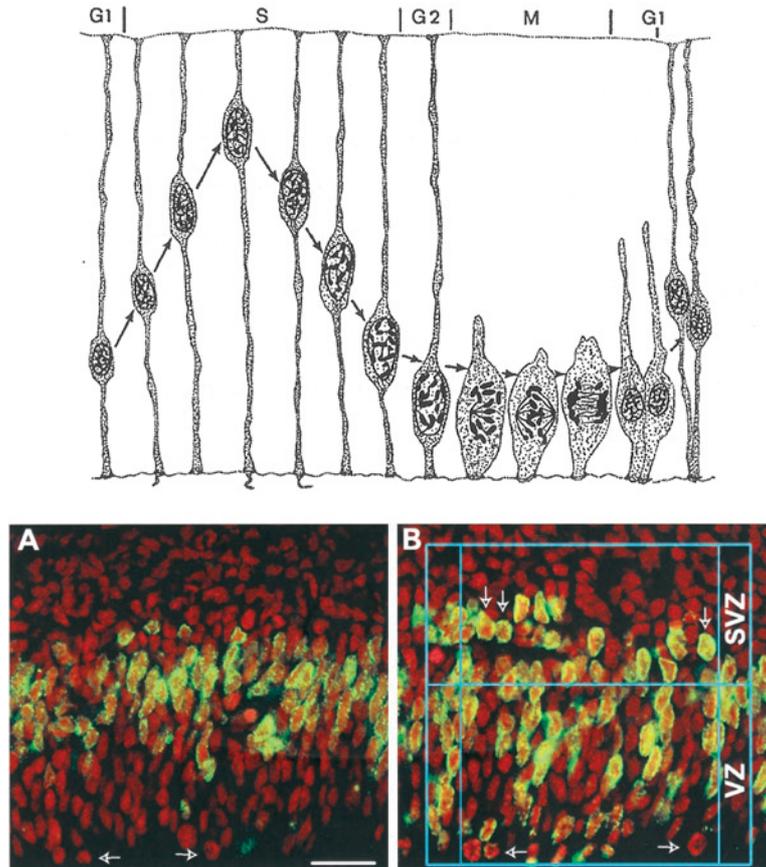


Figure 6 : Translocation nucléaire des cellules proliférantes au cours du cycle cellulaire dans le neuroépithélium.

En haut : lors de la phase S le noyau de la cellule précurseur se déplace en direction de la pia puis redescend en bordure du ventricule pour la division mitotique. D'après Sauer, 1935.

En bas : les cellules ayant incorporé le BrdU en phase S (en vert) sont localisées en bordure VZ/SVZ au bout d'1h (panneau de gauche). Au bout de 8h (panneau de droite), des cellules ont migré vers la bordure de la VZ pour se diviser. Les noyaux des cellules sont marqués par le iodure de propidium (en rouge). D'après Haydar et al., 2000.

B. La formation de la préplaque

Dès le stade E10 chez la souris, la division des cellules précurseurs va donner naissance aux premiers neurones pionniers qui vont se positionner sous la pia (Easter *et al.*, 1993). Cette couche de cellules neuronales est appelée la préplaque ou encore couche plexiforme primordiale (PP ; Marin-Padilla, 1983) et on parle ainsi du stade de la préplaque.

Chez le rat, l'apparition de ces neurones est détectée dès le 12^{ème} ou le 13^{ème} jour embryonnaire (Valverde *et al.*, 1995) et chez l'homme, dès la 6^{ème} semaine *in utero*. La mise

en place de cette couche se déroule en deux phases qui se chevauchent dans le temps. Tout d'abord, une première couche de cellules se dépose sous la pia (bordure externe du cerveau) (Figure 7b). Les cellules de la future sous-plaque (SP), viendront se déposer sous cette première couche (Figure 7b) pour former la PP. Les neurones de la préplaque constituent donc une population hétérogène de cellules qui sont les premières à se différencier et à acquérir des propriétés neuronales. Parmi celle-ci se trouvent des neurones GABAergiques (Haydar *et al.*, 2000; Hevner *et al.*, 2003) et les cellules de Cajal-Retzius (Caviness & Rakic, 1978).

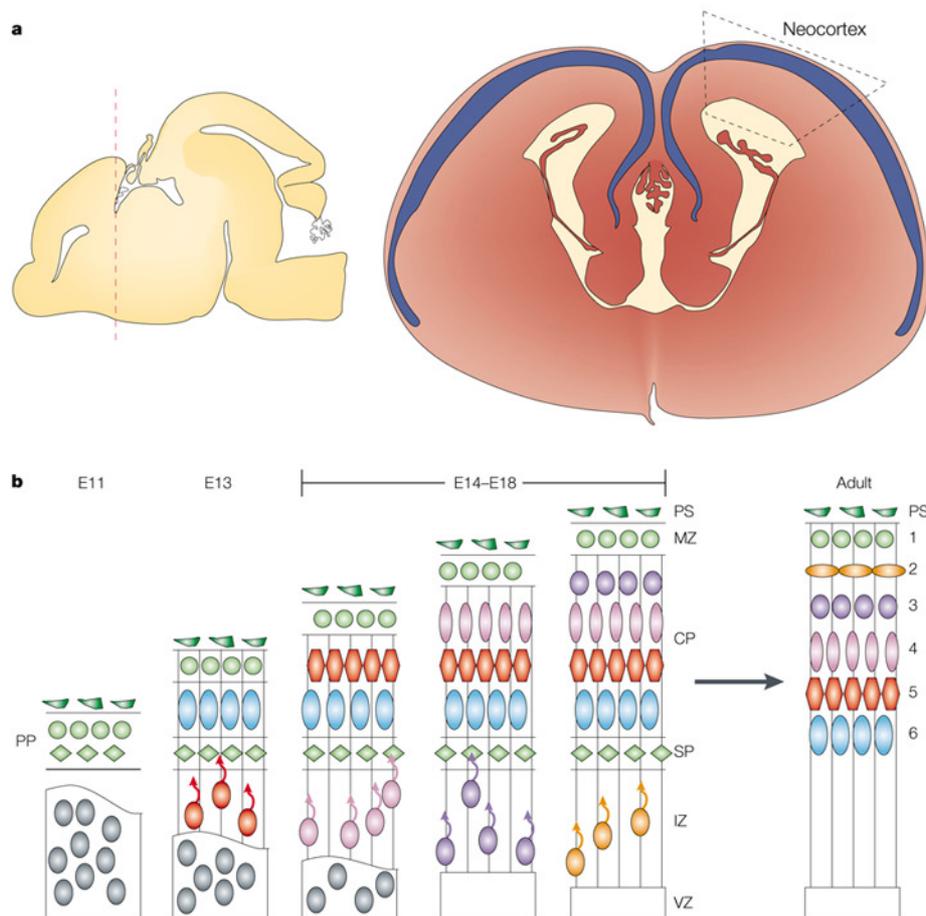


Figure 7 : La formation des différentes couches du néocortex. D'après Gupta *et al.*, 2002.

Les cellules de Cajal-Retzius contrôlent la migration neuronale et la formation des couches corticales (Marin-Padilla, 1998). Ces cellules sécrètent la réeline, une glycoprotéine de poids moléculaire important, qui, par un processus encore peu compris, stoppe la migration en provoquant le décrochage du neurone de la cellule gliale radiaire. L'absence de sécrétion de réeline, par exemple chez la souris mutante *reeler*, conduit à une accumulation sous la

préplaque des neurones migrants et donc à une lamination aberrante (pour revue, voir Frotscher, 1998). De plus, il a été proposé que les cellules de Cajal-Retzius sont responsables du gradient de glutamate qui servirait d'agent chimio-attractant pour les neurones migrant le long des cellules gliales radiaires et pourraient ainsi réguler la migration radiaire (Del Rio *et al.*, 1995). Les cellules de la sous-plaque, quant à elles, jouent un rôle essentiel dans la connexion des afférences thalamiques sensorielles avec leur cible située dans le néocortex (McConnell *et al.*, 1994).

C. La migration neuronale

Nous venons de voir que, dans le télencéphale, les zones de prolifération cellulaire se trouvent en bordure du ventricule. Cette configuration particulière impose aux cellules postmitotiques de migrer pour atteindre la plaque corticale où elles se différencieront et établiront des contacts synaptiques. La migration de plusieurs vagues de cellules nées en bordure du ventricule et migrant suivant une orientation radiale vers la pie-mère, va permettre la mise en place des différentes couches du néocortex.

1. La migration radiaire

Chez la souris, la plaque corticale se forme à partir du 14^{ème} jours embryonnaire. Les neurones postmitotiques vont migrer au sein de la PP et la séparer en deux couches cellulaires distinctes : la zone marginale (MZ), future couche I localisée sous la pie-mère, et la SP. L'hypothèse de Magini (1888) selon laquelle les neurones postmitotiques utilisent les cellules radiaires comme guide pour atteindre la surface du cerveau a été démontrée par Rakic en 1972 (Rakic, 1972). Ce dernier a mis en évidence, chez des foetus de primates, par microscopie électronique, des contacts étroits entre les cellules radiaires et des neurones postmitotiques. En 1992, O'Rourke a également observé, chez le furet nouveau-né, à l'aide d'un traceur lipophile, la migration radiaire de neurones en temps réel depuis la zone ventriculaire (O'Rourke *et al.*, 1992).

Ce mode de migration, dit par locomotion, qui se caractérise par le déplacement du corps cellulaire et de son prolongement, était considéré encore récemment comme le seul mode de migration radiaire. Pourtant, Sauer avait proposé un autre type de migration où seul le noyau migre : la translocation nucléaire (Sauer, 1935). Cette idée a été reprise par Morest lors de l'analyse des préparations Golgi de néocortex de jeunes embryons d'opossums (Morest, 1970). Peu après, Shoukimas et Hinds ont montré en microscopie électronique, à des stades précoces de la corticogenèse chez la souris des cellules migrant radiairement dans la zone intermédiaire mais ne présentant ni prolongement cytoplasmique apparent, ni contacts avec des cellules radiaires (Shoukimas & Hinds, 1978). L'équipe de Parnavelas a démontré, grâce à des enregistrements sur des tranches de néocortex en temps réel, à l'aide d'un traceur lipophile, l'existence de ces deux modes de migration radiaire par locomotion et par translocation nucléaire (Nadarajah & Parnavelas, 2002) (Figure 8). Le stade du développement semble déterminer le mode de migration. En effet, initialement les neurones migreraient rapidement par translocation nucléaire, puis à des stades de développement plus tardifs, ils se déplaceraient par locomotion le long des prolongements des cellules radiaires. Ces deux modes de migration sont probablement liés à l'existence de deux modes de division des cellules radiaires mises en évidence récemment (pour revue voir Gupta *et al.*, 2002). Certaines cellules radiaires effectuent une division au cours de laquelle la cellule fille hérite du prolongement ancré sous la pie-mère. Cette cellule postmitotique va migrer, par translocation nucléaire, à l'aide de son propre prolongement vers la plaque corticale. Une partie des cellules, nées en bordure du ventricule n'héritent pas de prolongement radiaire. Ce type de neurone postmitotique va alors migrer entièrement par locomotion le long du prolongement appartenant à la cellule gliale radiaire dont il est issu (Nadarajah & Parnavelas, 2002).

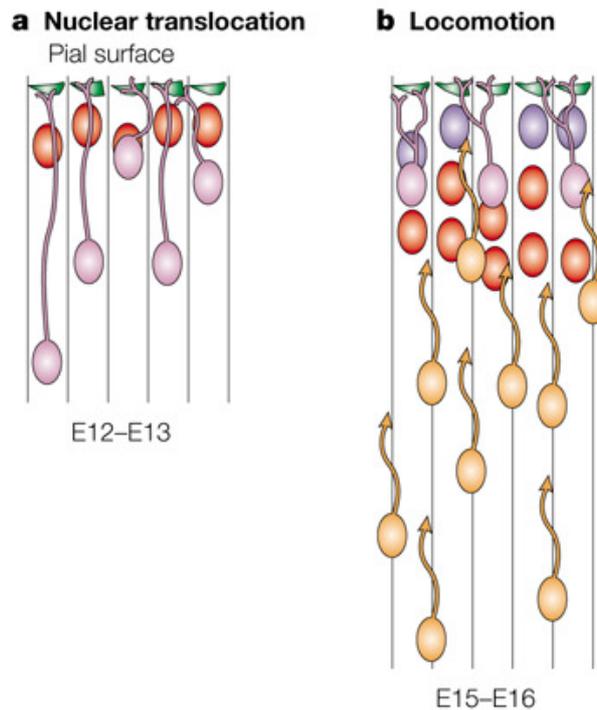


Figure 8 : Les deux principaux modes de migrations radiales au cours du développement néocortical.

La translocation nucléaire (a) est plus fréquente durant les phases précoces du développement. Plus tard dans le développement, les neurones migrent plutôt le long du prolongement de la cellule gliale radiaire (b). D'après Gupta *et al.*, 2002.

2. La migration tangentielle

Un autre type de migration a été découvert dans les années 1990. Plusieurs approches ont permis de démontrer que les cellules orientées tangentiellement, c'est-à-dire parallèlement à la pia, migraient non radiairement à partir de E12 chez la souris (Anderson *et al.*, 2001) et pour certaines avaient même une origine extra-corticale.

Le marquage d'un progéniteur et de sa descendance à l'aide d'un traceur lipophile, le DiI, a permis d'observer une dispersion des cellules filles (O'Rourke *et al.*, 1992). Certaines de ces cellules présentant une morphologie bipolaire migrent tangentiellement dans la zone intermédiaire. L'utilisation de rétrovirus (Walsh & Cepko, 1992) ou de souris chimériques (Tan & Breen, 1993) a permis d'aboutir aux mêmes conclusions. Alors que la frontière cortico-striatale était réputée comme infranchissable, plusieurs équipes ont montré qu'une partie des cellules migrant tangentiellement avait une origine extra-corticale (Figure 9). Toujours en utilisant des traceurs lipophiles, il a été démontré que ces neurones prenaient leur

origine dans les éminences ganglionnaires (De Carlos *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été observé que certaines cellules de la PP exprimant la calrétinine (protéine cytoplasmique liant le calcium) provenaient de l'éminence ganglionnaire latérale (Lavdas *et al.*, 1999). La majorité de ces neurones migrant tangentiellement sont en fait de futurs interneurons GABAergiques.

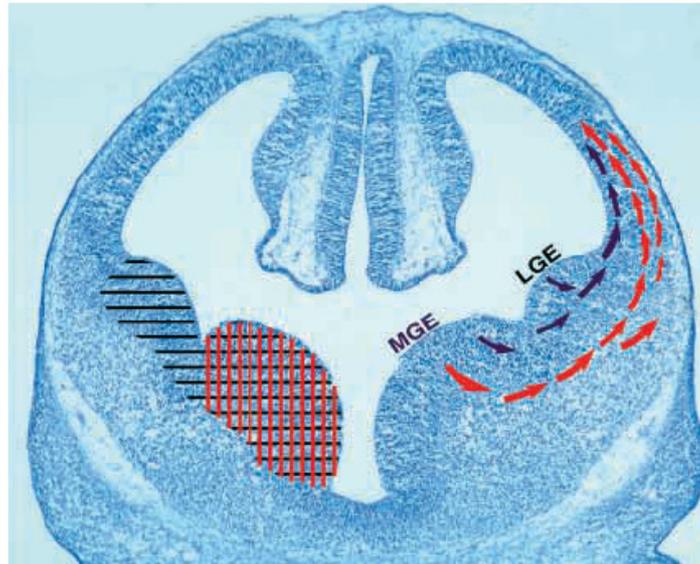


Figure 9 : Origine extracorticale de neurones corticaux.

Les interneurons migrant tangentiellement proviennent soit de la MGE (éminence ganglionnaire médiane) soit de la LGE (éminence ganglionnaire latérale). D'après Anderson et al., 2001.

Le déroulement spatiotemporel correct de ces différents modes de migrations est responsable de l'organisation laminaire du cortex, nécessaire à un cortex parfaitement fonctionnel. Nous allons voir dans le chapitre suivant que les défauts de migration sont à l'origine de la plupart des malformations corticales.

III. Les anomalies du développement cortical

Les malformations ou anomalies du développement d'un tissu sont regroupées sous le terme de dysplasie. L'étude du développement cortical s'enrichit considérablement si l'on prend en compte les informations apportées par l'étude des dysplasies chez l'homme. D'un autre côté leur étiologie est encore peu connue et reste très souvent liée exclusivement à la recherche de mutations génétiques. La prise en compte du rôle de l'environnement et notamment celui des activités électriques et calciques (cf. deuxième partie), pourrait apporter un éclairage nouveau sur les causes de certaines de ces malformations (Kriegstein, 1996). C'est pourquoi j'ai choisi de faire une description sommaire des malformations les plus connues et d'expliquer les principales hypothèses actuelles concernant leur étiologie. Je reviendrai dans la discussion sur l'interprétation de nos résultats pouvant contribuer à l'explication de certaines malformations.

Pendant longtemps, les anomalies du développement cortical aboutissant à des malformations ne pouvaient être identifiées qu'en *post-mortem* à partir de patients ayant eu d'importants désordres neurologiques ou de graves crises d'épilepsies. Aujourd'hui, elles peuvent être en partie révélées en utilisant les techniques d'imagerie *in vivo* tel que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Figure 10). Ces malformations sont des causes importantes d'épilepsie chez l'enfant et même plus tard chez l'adulte. Elles sont également parfois une cause de retard mental. L'analyse de ces malformations permet le plus souvent de déterminer la période du développement durant laquelle un problème est survenu.

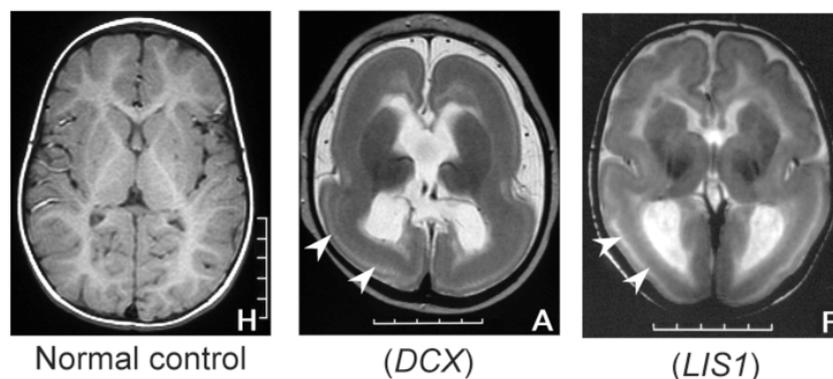


Figure 10 : Clichés IRM de cerveaux de patients lissencéphaliques.

Cerveau normal (à gauche) et atteint de lissencéphalie au milieu (mutation dans le gène DCX) et à droite (mutation dans le gène Lis1). Le cerveau représenté sur l'image de droite possède une partie postérieure normale. D'après Kato & Dobyns, 2003.

Il est assez difficile de classer ces dysplasies corticales car plusieurs types de malformations différentes peuvent se côtoyer dans un même cerveau. Néanmoins les descriptions de ces dysplasies permettent de les regrouper en 7 groupes majeurs que je vais décrire succinctement (schématisés Figure 11).

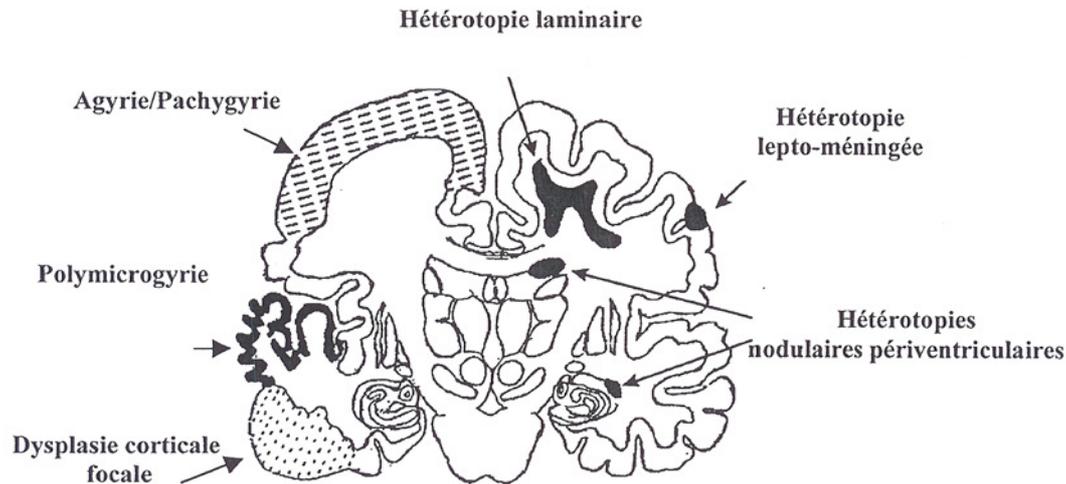


Figure 11 : Schéma d'une section de cerveau humain adulte représentant différentes malformations corticales.

D'après Copp et Harding, 1999.

- Les lissencéphalies sont des malformations caractérisées par l'absence (agyrie) ou une réduction (pachygyrie) des circonvolutions qui n'est pas forcément généralisée à l'ensemble du cerveau (Figure 10). En revanche, le cortex lissencéphalique est anormalement épais (jusqu'à 15 mm par rapport à 3-4 mm habituellement) et composé seulement de 4 couches (Leventer *et al.*, 2000) (Figure 12). Ces malformations surviennent lors de la formation de la plaque corticale. Si des mutations dans les gènes *Lis1* et *Doublecortin* sont souvent impliqués dans ces malformations, chez certains patients, aucune altération génétique n'a pu être mise en évidence (Leventer *et al.*, 2000).
- Les bandes hétérotopiques sous-corticales encore appelées "double cortex", présentent également une agyrie, mais cette fois-ci, seulement localisée à la surface du cerveau. On peut en effet voir des fusions des gyri. Ce groupe de malformations présente des phénotypes assez hétérogènes. Au niveau de la lamination, une couche de neurones n'ayant pas fini leur migration est retrouvée dans la matière blanche (Figure 12). Dans

cette malformation, les gènes *Lis1* et *Doublecortin* ont également été impliqués (Leventer *et al.*, 2000). D'autres formes résulteraient de lésions (d'origine chimique ou traumatique) survenues lors de la vie fœtale (Sisodiya, 2004).

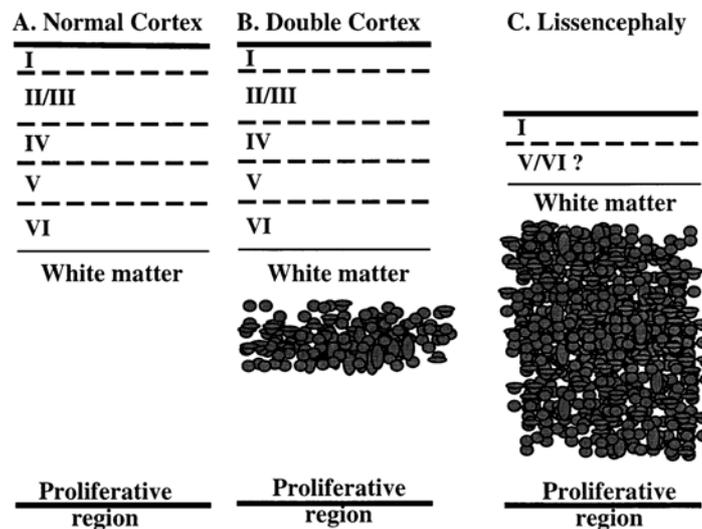


Figure 12 : Les défauts de lamination corticale dans les lissencéphalies et le double cortex.
D'après Allen & Walsh, 1999

- Dans les hétérotopies, le cerveau présente des foyers ectopiques de neurones qui deviennent très fréquemment le centre d'activités épileptogènes. Les hétérotopies périventriculaires peuvent être liées à une mutation sur le chromosome X touchant le gène de la filamine, une protéine liant l'actine (Fox *et al.*, 1998).
- Les dysplasies corticales focales représentent des malformations liées à des défauts de lamination, associés à une hypertrophie astrocytaire et à la présence de larges neurones orientés de manière atypique. Une nouvelle fois, des perturbations de la migration radiaire semblent être un des déterminant de cette malformation (Cotter *et al.*, 1999).
- Les schizencéphalies sont des fissures dans le cerveau qui s'étendent du ventricule jusqu'à la surface du cerveau. A priori causées par une blessure, il existe néanmoins plusieurs autres hypothèses dont une mutation dans le gène *Emx2*, ou encore une infection par le CMV (cytomegalovirus). Ce genre de malformation se produirait à un stade précoce du développement.

- Dans les polymicrogyries, les gyri sont petits, irréguliers et souvent fusionnés. Il existe plusieurs formes de polymicrogyries avec une atteinte de la lamination plus ou moins sévère en fonction du moment où est survenu le traumatisme. Les polymicrogyries peuvent être focales et pas forcément généralisées à l'ensemble du cerveau.
- Les microdysgénésies sont des dysplasies où le cerveau n'a subi que des anomalies mineures incluant : une augmentation du nombre de neurones dans la couche I, la présence de neurones dans la matière blanche, un regroupement anormal des neurones corticaux ainsi qu'une altération de la proportion entre neurones excitateurs et inhibiteurs. Ce genre d'altération se retrouve plus fréquemment chez les patients épileptiques que dans la population générale.

L'étiologie de la plupart de ces malformations corticales est encore mal connue. Une des caractéristiques les plus courantes de ces dysplasies est un mauvais positionnement des neurones, d'où l'hypothèse principale qui implique des anomalies de migration neuronale au cours du développement embryonnaire. Certains traumatismes ou infections peuvent également être impliqués dans des malformations (Sisodiya, 2004). Cependant, ces différentes causes ne peuvent expliquer à elles seules certains troubles (Kriegstein, 1996). Notamment, le même phénotype pathologique peut s'accompagner d'une augmentation importante du nombre de neurones ou au contraire d'une diminution de neurones dans la même région.

Comme nous allons le voir dans le prochain chapitre, les activités neuronales précoces sont des acteurs essentiels de l'embryogenèse cérébrale et leur perturbation pourrait être une cause de malformation.

Deuxième partie : Rôle des activités électriques et calciques dans le développement du système nerveux central

Chez l'adulte, les cellules nerveuses sont capables de transmettre rapidement des informations sous la forme de signaux électriques. A l'état basal, les neurones ont un potentiel de membrane négatif (entre -40 et -90 mV), appelé potentiel de repos, qui est dû aux différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique. L'ouverture de certains canaux entraîne des flux d'ions au travers de cette membrane, pouvant rendre localement et transitoirement le potentiel transmembranaire positif. Lorsque le potentiel membranaire dépasse un certain seuil, les canaux sodiques dépendants du voltage s'ouvrent et amplifient transitoirement cette dépolarisation. Ce signal, appelé potentiel d'action (PA), se propage le long de la membrane neuronale par un processus d'ouverture en cascade évoquant la chute des dominos. Le flux de sodium (Na^+) à travers ces canaux est de courte durée alors que l'ouverture plus lente des canaux potassiques (sortie de K^+) permet de rétablir le potentiel de membrane à son niveau négatif habituel. Les PA se propagent le long des axones en direction des synapses. Au niveau synaptique, l'arrivée d'un potentiel d'action induit l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et l'entrée de calcium (Ca^{2+}) extracellulaire dans l'élément présynaptique. Cette augmentation de calcium conduit à la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et à la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs libérés se lient aux récepteurs de la membrane postsynaptique et médient la transmission de l'information d'une cellule nerveuse à une autre en déclenchant l'émission d'un potentiel post synaptique (PPS) (Figure 13).

L'activité neuronale chez l'adulte est sous-tendue par l'émission des PA et des PPS. Cette activité est très souvent couplée, tant au niveau du soma que de la terminaison synaptique, à des augmentations cytoplasmiques de calcium dues à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Lors du développement, le terme activité regroupe l'activité électrique, c'est-à-dire des changements du potentiel de membrane, et l'activité calcique, qui correspond à des augmentations de calcium intracellulaire. Ces augmentations de calcium peuvent être causées par des entrées de calcium du milieu extracellulaire mais elles peuvent aussi résulter de la libération de calcium des stocks intracellulaires (Faure *et al.*, 2001) ou du passage de calcium par des jonctions communicantes de type gap (Yuste *et al.*, 1995).

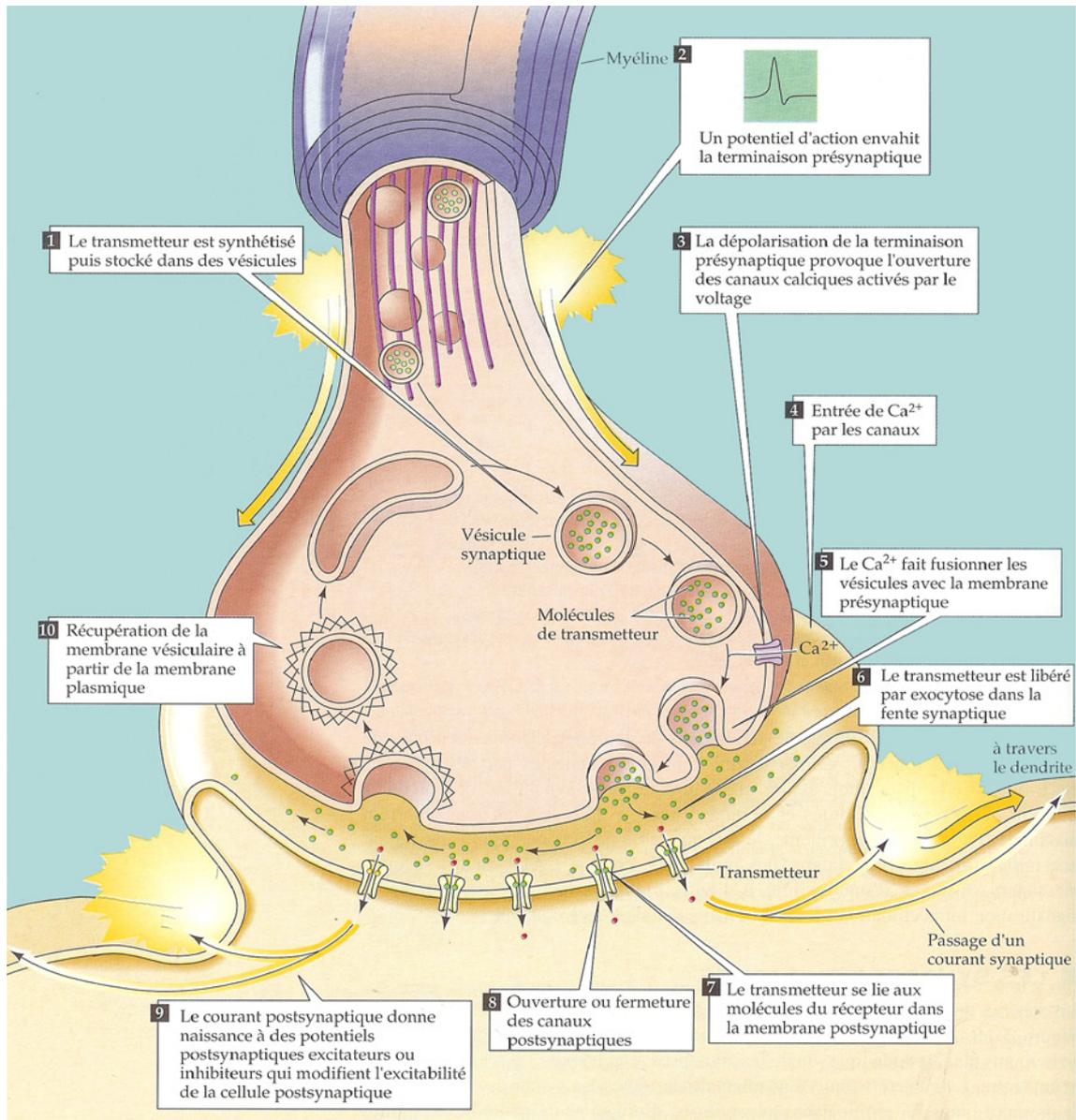


Figure 13 : L'activité neuronale chez l'adulte.

Le potentiel d'action se propage le long de l'axone en direction de la synapse. Au niveau synaptique, l'arrivée d'un PA provoque l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. L'ouverture de ces canaux permet une entrée de Ca^{2+} dans l'élément présynaptique. Cette augmentation de Ca^{2+} conduit à la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et à la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs libérés vont se lier aux récepteurs de la membrane postsynaptique et permettre la transmission de l'information d'une cellule nerveuse à une autre. D'après Purves et al., 1999.

Le terme activité "spontanée" signifie que l'activité n'est pas induite par un stimulus sensoriel ou moteur identifié mais intervient de façon apparemment autonome. Ce terme cache souvent le fait que l'on ne connaît pas l'élément déclencheur de ces activités (Moody, 1998).

Il est maintenant largement admis que les activités électriques précoces jouent un rôle central lors du développement du système nerveux central. En 1963, Hubel et Wiesel ont observé que dans les instants qui suivent la naissance, si un chaton subit une déprivation monoculaire, les connexions des neurones de son cortex visuel en sont irréversiblement altérées (Hubel & Wiesel, 1963). Ces résultats constituaient la première démonstration de la nécessité d'une activité neuronale durant une période critique du développement précoce pour une structuration normale du cortex visuel adulte. Ces découvertes ont ouvert la porte à un vaste champ d'investigation sur le rôle de l'activité neuronale dans le développement du système nerveux. A partir de ces premiers résultats, des études complémentaires ont montré que les stimuli influençant le développement du système visuel n'étaient pas limités aux stimuli sensoriels mais pouvaient provenir aussi des activités spontanées présentes durant le développement précoce.

Nous allons voir, au travers des résultats obtenus chez les vertébrés dans 5 structures anatomiques différentes (la rétine, l'hippocampe, le cervelet, la moelle épinière et le néocortex), de quelle manière l'activité est impliquée dans le développement du système nerveux central.

I. Le système visuel

Avant d'aborder le rôle de l'activité, je vais tout d'abord décrire brièvement l'anatomie du système visuel chez l'homme. Les cellules ganglionnaires de la rétine envoient leurs axones vers plusieurs zones du cerveau. Les projections les plus importantes se font vers le prétectum pour le contrôle du réflexe pupillaire à la lumière, vers l'hypothalamus pour la régulation des rythmes circadiens, vers le colliculus supérieur pour la régulation des mouvements de la tête et des yeux, et enfin, ces dernières étant les plus importantes de toutes, vers les corps genouillés latéraux (droite et gauche) du thalamus pour l'élaboration des perceptions visuelles (Figure 14). Les axones des cellules ganglionnaires forment le nerf optique et se rendent au chiasma optique à la base du diencephale. Chez l'homme, on observe une décussation de 60% des fibres au niveau du chiasma (voie contralatérale) alors que 40% continuent du même côté du cerveau (voie ipsilatérale). Ainsi, au-delà du chiasma optique, le tractus optique contient des fibres provenant des deux yeux. Le corps genouillé latéral reçoit donc des fibres issues de chaque œil, mais celles-ci se terminent sur des couches séparées de sorte que les neurones demeurent monoculaires. Enfin, les neurones du corps genouillé latéral projettent leurs axones, par la capsule interne, vers le cortex visuel primaire (encore appelé cortex strié), situé dans le lobe occipital (Figure 14).

Les premiers résultats de Hubel et Wiesel ont montré l'implication de l'expérience postnatale comme facteur majeur du développement des colonnes de dominance oculaire (Hubel & Wiesel, 1963). Chez le singe toutefois, les colonnes de dominance oculaire sont déjà formées avant la naissance et donc avant même l'ouverture des yeux (Rakic, 1974). Il semble donc évident que la connectivité neuronale du système visuel embryonnaire est réalisée en absence de toute stimulation lumineuse. C'est une activité électrique spontanée qui assure le guidage de cette connectivité.

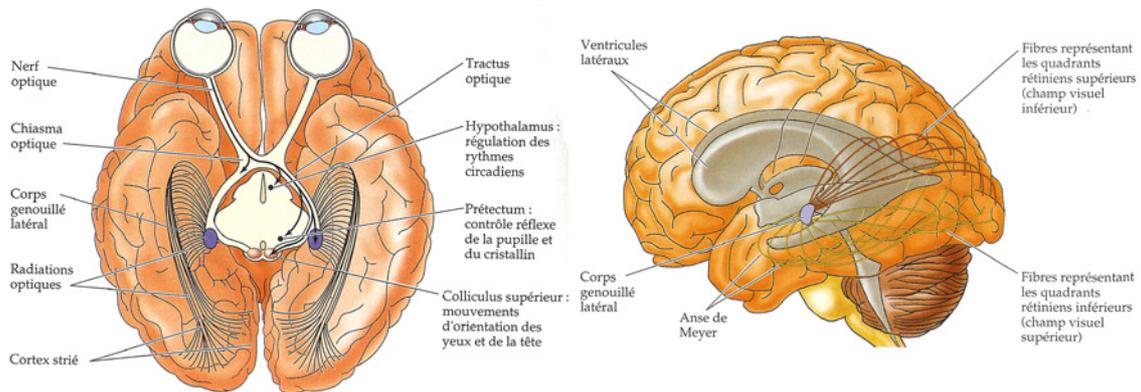


Figure 14 : Le système visuel chez l'homme.

D'après Purves et al. (2003) in Neurosciences , pp 200, 206.

De fait, les cellules neuronales du système visuel immature sont spontanément actives et émettent des potentiels d'action : en 1988, Galli et Maffei ont montré que les cellules ganglionnaires de la rétine d'embryons de rat possédaient une activité électrique bien avant que les photorécepteurs ne se développent (Galli & Maffei, 1988). Ces activités prennent la forme de vagues de potentiels d'action et de pics calciques corrélés qui se propageaient dans la rétine à une vitesse d'environ $100\mu\text{m/s}$ (Meister *et al.*, 1991). Des premières expériences semblaient montrer que ces activités étaient sensibles à la tétrodothine (TTX, inhibiteur spécifique des canaux sodiques dépendants du voltage) (Meister *et al.*, 1991), mais il a été ensuite démontré que la TTX réduisait l'amplitude des activités calciques sans les supprimer (Stellwagen *et al.*, 1999). En revanche, l'application de TTX empêche la transmission de ces activités vers les corps genouillés latéraux. Ces activités persistent pendant une longue période du développement avant l'apparition de la vision, mais les mécanismes qui les soutiennent ne sont pas les mêmes en fonction du stade développemental. Initialement, c'est l'acétylcholine qui est le premier neurotransmetteur impliqué dans la transmission de ces vagues d'activité (Meister *et al.*, 1991). Au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux types cellulaires, et donc de nouvelles connexions, ces activités vont progressivement devenir GABAergiques puis dépendante de l'AMP cyclique (cAMP) (Stellwagen *et al.*, 1999) et enfin du glutamate (Lee *et al.*, 2002). Les jonctions communicantes de type gap ont également été impliquées dans la propagation de ces vagues. Ces résultats démontrent une stabilité extrême des activités spontanées qui ne changent pas de profil et qui peuvent, en cas de déficit, se compenser.

II. L'hippocampe

Dans l'hippocampe, il a été clairement démontré que la formation du réseau neuronal est fortement dépendante de l'activité électrique et en particulier de la présence de synapses GABAergiques (pour revue, voir Ben-Ari, 2001; Ben-Ari *et al.*, 2004; Represa & Ben-Ari, 2005). Je décrirai d'abord succinctement le rôle de ces activités synaptiques dans le développement du réseau neuronal puis je développerai plus largement le rôle de l'activité dans le développement avant la présence de synapses.

Chez le rat, pendant la première semaine postnatale, les neurones hippocampiques génèrent des bouffées d'activité connues sous le nom d "early network oscillation" (ENOs) ou de "Giant Depolarizing Potentials" (GDPs) (Ben-Ari *et al.*, 1989; Garaschuk *et al.*, 1998) (Figure 15). Les GDPs sont principalement des événements GABAergiques mais ont néanmoins une composante NMDA et, plus tardivement, AMPA. Ces activités disparaissent vers la 2^{ème} semaine postnatale lorsque le GABA devient inhibiteur. Il a donc été proposé que ces GDPs permettraient, en dépolarisant les neurones, d'activer les récepteurs au NMDA et donc, selon le modèle de Hebb, de renforcer les synapses correspondantes. Le potentiel de réversion des récepteurs du GABA étant plus négatif que celui des récepteurs NMDA, ceci limite l'activation des récepteurs NMDA par les GDPs. Ce mécanisme pourrait constituer un système de neuroprotection des neurones immatures contre une activité trop importante et ses effets excitotoxiques (Ben-Ari, 2001).

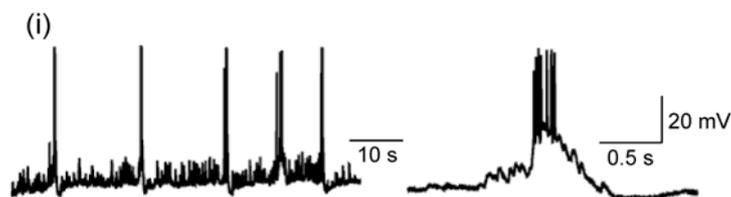


Figure 15 : Activité spontanée dans l'hippocampe.

Enregistrement d'une cellule pyramidale de CA3 au stade P6 démontrant la présence de bouffées d'activité, principalement GABAergiques, connues sous le nom de « Giant Depolarizing Potentials » (GDPs). D'après Ben-Ari, 2001.

Avant la formation des synapses, les récepteurs du GABA et du glutamate sont exprimés dans les neurones pyramidaux de CA1, néanmoins ces cellules sont synaptiquement silencieuses. Il a été montré, dans ce modèle, que ces neurones sont activés de façon non synaptique par le GABA et à moindre importance par le glutamate, générant ainsi des "Early Slow Current" (ESC). Des expériences effectuées sur les souris mutantes *Munc18-1*, chez lesquelles la libération vésiculaire est déletée, ainsi que l'utilisation de toxine botulique, qui bloque la libération vésiculaire, ont montré que ces neurotransmetteurs sont libérés de façon non vésiculaire, et indépendamment du calcium (Demarque *et al.*, 2002). Tout récemment, en utilisant un modèle de co-culture de tranche d'hippocampe, qui permet de suivre la migration des cellules, ce même groupe a pu démontrer que la libération de ces neurotransmetteurs contrôlait la migration neuronale (Manent *et al.*, 2005) : le GABA et le glutamate libérés dans le milieu extracellulaire provoquent une forte activité électrique chez les neurones en migration. L'inhibition spécifique des récepteurs de ces neuromédiateurs a pour conséquence de diminuer fortement la migration.

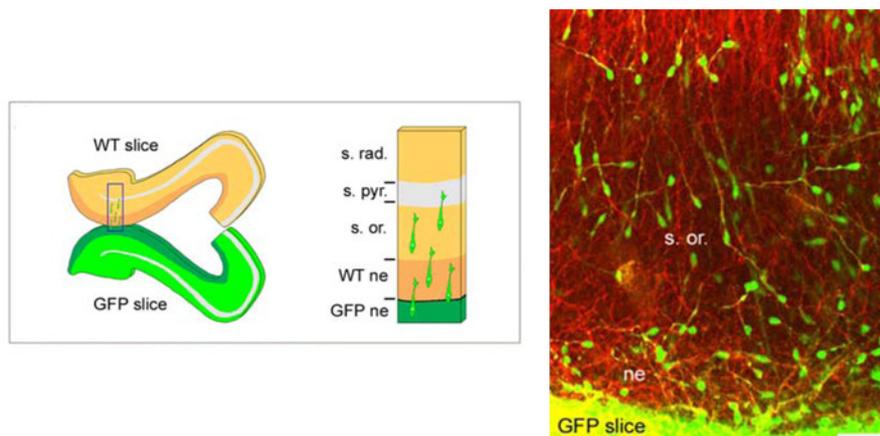


Figure 16 : Le système de co-culture.

Une tranche d'hippocampe d'un animal sauvage et une tranche d'hippocampe d'une souris GFP sont mises en culture face à face ce qui permet de suivre la migration des neuroblastes d'une tranche à l'autre. D'après Manent *et al.*, 2005.

III. Le cervelet

Le cervelet a été un des modèles précurseurs dans l'étude de la migration neuronale, et plus particulièrement dans la migration des cellules granulaires du cervelet qui a lieu après la naissance. Les cellules précurseurs sont localisées dans la couche granulaire externe (EGL). Dès que la mitose se termine, la cellule fille entame sa migration en traversant la couche moléculaire (ML), le long des fibres des cellules gliales de Bergmann qui sont l'équivalent des cellules gliales radiaires du néocortex. En arrivant dans la couche des cellules de Purkinje, les neurones granulaires perdent le contact avec les cellules de Bergmann et migrent alors "librement" en direction de la couche granulaire interne (IGL) (Figure 17).

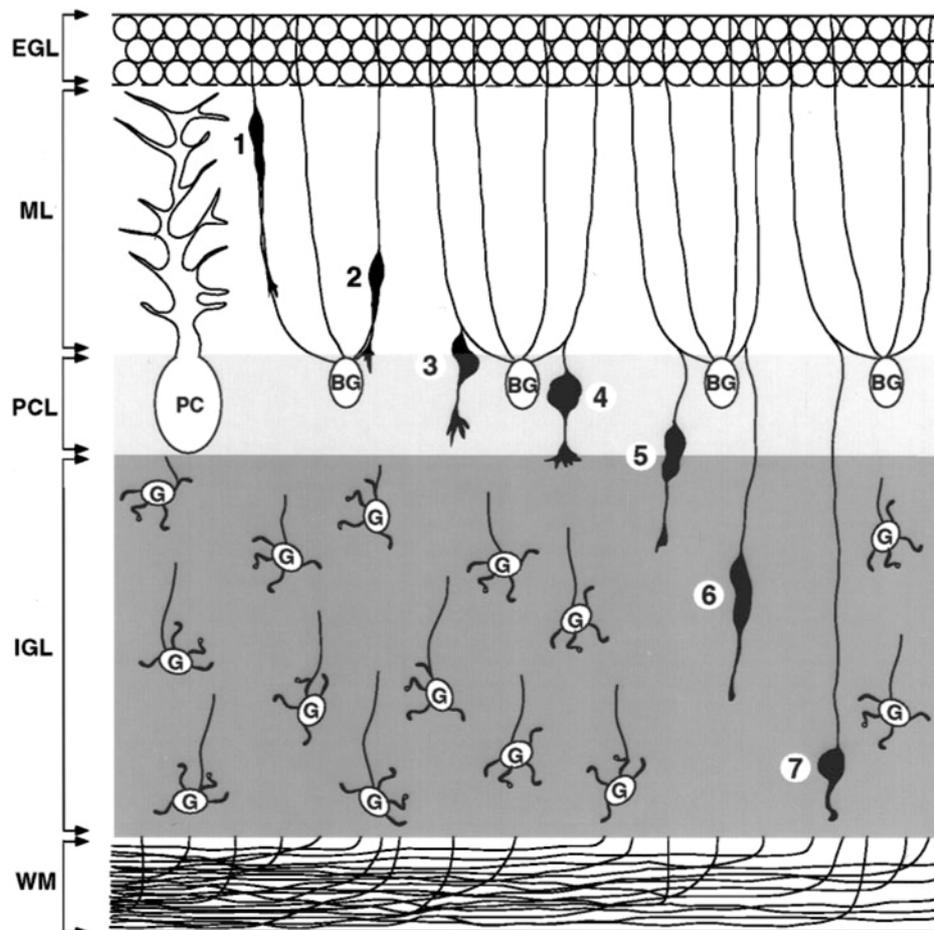


Figure 17 : Représentation schématique de la migration des cellules granulaires lors de leur migration dans le cortex cérébelleux en développement.

EGL, couche granulaire externe; ML, couche moléculaire; PCL, cellule de Purkinje layer; IGL, couche granulaire interne; WM, matière blanche; BG, cellule gliale de Bergmann; G, cellule granulaire post migratoire; PC, cellule de Purkinje. D'après Komuro & Rakic, 1998.

Ces cellules expriment des canaux calciques dépendants du voltage dès qu'elles sortent du cycle cellulaire. Ces canaux sont principalement impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, mais nous allons voir que chez l'embryon, ils ont une fonction tout à fait différente.

En utilisant des cultures d'explant de cervelet qui miment la migration des neurones granulaires le long des fibres des cellules gliales de Bergmann, l'équipe de Pasko Rakic a pu montrer le rôle de l'activité calcique dans la migration des neurones granulaires (Komuro & Rakic, 1992). Ces cellules en migration présentent des activités calciques spontanées d'une durée d'environ 1 minute à une fréquence d'approximativement 13 événements par heure. De manière synchrone, à chaque pic calcique correspond une augmentation de la vitesse de migration neuronale (Figure 18). De la même manière, lorsque la concentration de calcium revient à un niveau basal, la cellule ne bouge quasiment plus. L'inhibition de certains canaux calciques dépendants du voltage ou celle des récepteurs au NMDA, bloque les activités calciques spontanées, et diminue la vitesse de migration alors que l'induction d'activités calciques supplémentaires par l'application de KCl augmente la vitesse de migration (Komuro & Rakic, 1996). De même, l'activation des récepteurs au NMDA exprimés par ces cellules entraîne des activités calciques et des effets identiques sur la migration (Komuro & Rakic, 1993), ce qui signifie que canaux calciques dépendants du voltage et récepteurs au NMDA sont tous deux impliqués dans la migration des cellules granulaires du cervelet, via une augmentation de calcium.

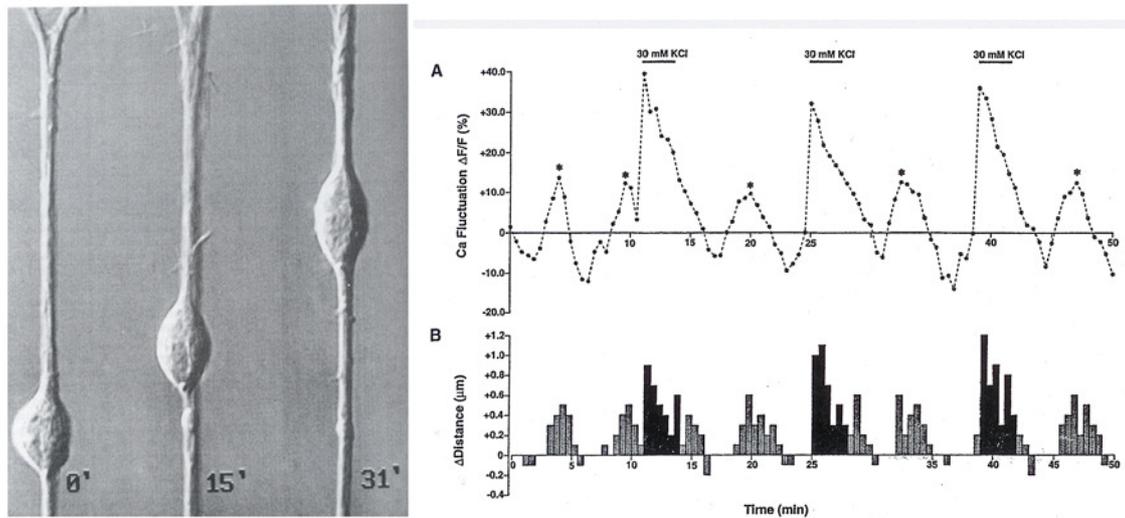


Figure 18 : La migration des neurones cérébelleux est dépendante des variations cytoplasmiques de calcium.

Les cellules en migration présentent des activités calciques synchrones avec les mouvements saltatoires des neurones. Lors de chaque pic calcique, la vitesse de migration augmente, alors que lorsque la concentration de calcium revient à un niveau basal, la cellule ne bouge quasiment plus. D'après Komuro & Rakic, 1996.

Les mécanismes par lesquels ces activités calciques régulent la migration neuronale ne sont pour l'instant pas encore très clairs. Des effets sur les éléments du cytosquelette ou sur la motilité cellulaire via les protéines d'adhésion sont les meilleurs candidats car ils permettraient d'expliquer une augmentation instantanée de la vitesse de migration. L'existence de tels mécanismes au niveau cortical n'a pas encore été démontrée mais semble pourtant probable.

IV. La moelle épinière

De nombreuses études sur la mécanistique et le rôle physiologique de l'activité électrique et calcique ont été effectuées sur des neurones de la moelle épinière embryonnaire de Xénope. Dans ce modèle, les cellules peuvent générer plusieurs types d'activités calciques spontanées (Gu & Spitzer, 1993; Gu & Spitzer, 1995) (Figure 19). Ces activités peuvent avoir la forme de pics calciques, qui sont sous-tendus par de larges potentiels d'action dépendants du calcium, avec une fréquence faible mais régulière (1 à 3/h). L'apparition de courants potassiques retardés et de courants sodiques va modifier la forme des potentiels d'action, ceux-ci devenant plus courts et présentant un aspect plus mature (indépendants du calcium). Dans les cellules dissociées, ces événements se produisent dans des cellules isolées (Henderson & Spitzer, 1986) alors qu'*in vivo*, elles impliquent des petits clusters de cellules. Même si la différenciation de ces neurones peut se produire de façon isolée, des profils d'activité synchrone vont émerger de ces cellules (Gu & Spitzer, 1997). Parallèlement à ces pics calciques, on observe dans ces cellules un autre type d'activité en forme de vagues calciques. Elles se produisent dans le soma et dans le cône de croissance des neurones (Gu & Spitzer, 1995). Les vagues durent plus longtemps que les pics (une trentaine de secondes contre une dizaine pour les pics) et se produisent plus fréquemment (8 à 10/h).

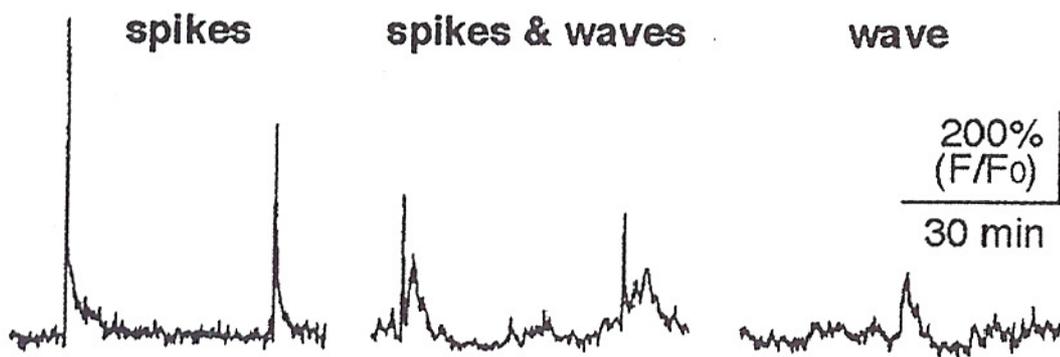


Figure 19 : Différents profils d'activité présents lors du développement des neurones de la moelle épinière du xénope.
D'après Spitzer & Gu, 1997.

Lorsque ces activités sont supprimées, l'apparition des marqueurs de la différenciation GABAergique que sont le GABA et le transcrit de la GAD est fortement diminué. De plus les cellules développent des dendrites anormalement longues (Holliday & Spitzer, 1990 ; Holliday *et al.*, 1991 ; Spitzer *et al.*, 1993 ; Watt *et al.*, 2000) (Figure 20). En reproduisant artificiellement ces activités, l'équipe de Nick Spitzer a montré que la fréquence des activités calciques était le paramètre clé responsable de l'effet développemental de ces activités, *i. e.* à partir de 3 événements par heure, la différenciation GABAergique est rétablie. Si la fréquence dans les dendrites dépasse 8 événements par heure, la longueur des dendrites est réduite (Gu & Spitzer, 1995). La fréquence et le type d'activité (pic vs vague) sont donc des paramètres capitaux, impliqués dans la transmission et le codage de l'information définissant le type de différenciation neuronale que doit subir la cellule.

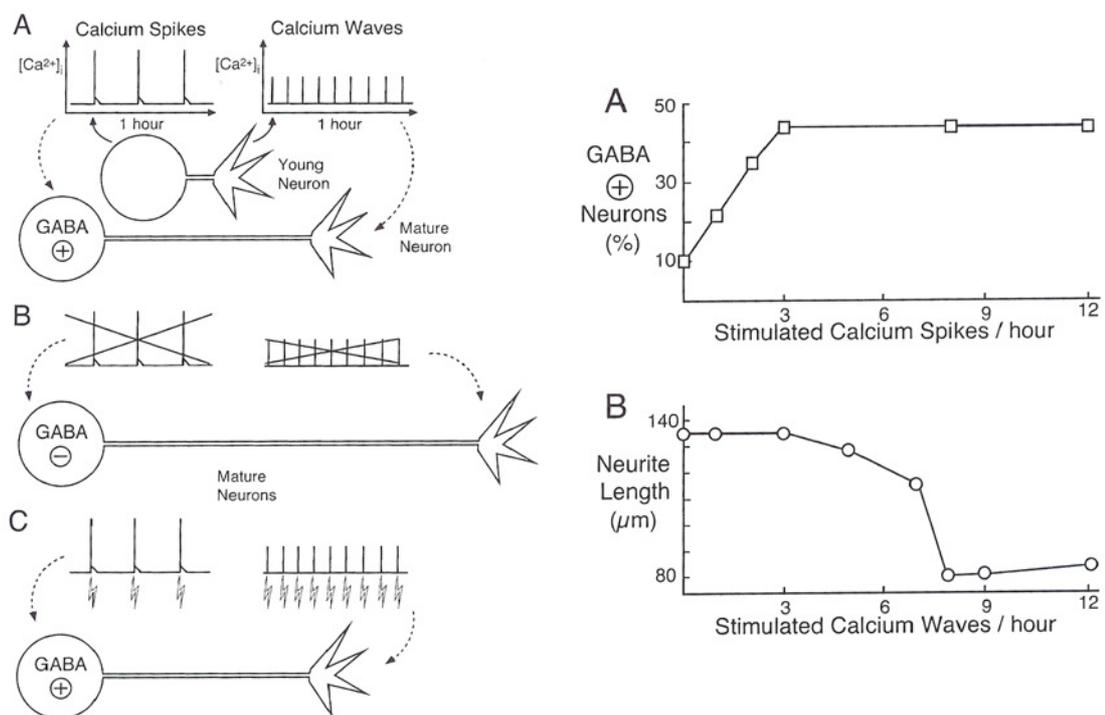


Figure 20 : La différenciation neuronale est contrôlée par les activités calciques spontanées.

Les pics calciques ont lieu plutôt dans le soma et sont responsables de la différenciation GABAergique à partir d'une fréquence de 3 pics/h. Les vagues calciques sont plutôt présentes dans les dendrites et si leur fréquence est supérieure à 8 vagues/h, alors la longueur de la dendrite augmente. D'après Spitzer *et al.*, 2000.

L'activité calcique spontanée régule donc le type de neurotransmetteur exprimé par les cellules. Dernièrement, l'équipe de Nick Spitzer a démontré que cette régulation est homéostatique, c'est-à-dire que si les cellules ont beaucoup d'activités, alors le nombre de cellules exprimant des neurotransmetteurs inhibiteurs sera augmentée sans que chaque cellule change son identité (expression d'autres marqueurs indépendants inchangée) (Borodinsky *et al.*, 2004). Le blocage de l'activité amène à un effet opposé, avec une augmentation du nombre de cellules exprimant des neurotransmetteurs excitateurs.

V. Le cortex cérébral

L'activité spontanée dans le cortex a beaucoup été étudiée, surtout pendant la première semaine postnatale. Je détaillerai très peu ces études puisque, dans le cadre de mes travaux, je ne me suis intéressé aux activités spontanées qu'avant la synaptogenèse et je me concentrerai donc sur ces stades précoces. Je ne citerai que les travaux de l'équipe de Rafaël Yuste qui a montré la présence d'activités spontanées autour de P0 dans la couche I du cortex, à la fois dans les cellules de Cajal-Retzius et les autres cellules de cette couche, chez la souris et chez le rat (Aguilo *et al.*, 1999 ; Schwartz *et al.*, 1998). Ces activités sont parfois synchrones mais impliquent peu de cellules simultanément. Le niveau d'activité étant faible spontanément, l'augmentation du K^+ dans le milieu extracellulaire (50 mM) permet de dépolariser les cellules et d'induire des activités. Ces auteurs ont ainsi démontré que la TTX ne bloque pas les activités mais, en revanche, bloque la corrélation de ces activités entre les neurones. Ces corrélations impliquent des mécanismes synaptiques, incluant des récepteurs du GABA, du glutamate et de l'acétylcholine. Quant au mécanisme sous-tendant ces activités, il semble mettre en jeu les canaux calciques dépendants du voltage, certainement relayés par un relâchement de calcium des stocks calciques intracellulaires (Aguilo *et al.*, 1999).

L'apparition des canaux ioniques à l'origine de ces activités a été étudiée dès E9 chez la souris, c'est-à-dire avant même que les cellules précurseurs ne commencent à se diviser pour donner des neurones. Ces expériences, menées sur des cellules fraîchement dissociées, ont permis d'observer la présence de courants potassiques sortants et dans certaines cellules, de courants sodiques entrants (Wiedehage *et al.*, 1992). L'équipe de W.J. Moody a montré qu'au stade E14 chez la souris toutes les cellules de la VZ possèdent des courants potassiques sortant retardés. Trente pour cents de ces cellules expriment en plus un courant sodique entrant. Ces auteurs ont noté également l'expression très faible de canaux calciques dépendants du voltage de faible amplitude dans quelques cellules de la VZ. Dans la CP, les neurones expriment également les 2 types de courant (K^+ et Na^+) mais les courants sodiques ont une amplitude 10 fois plus importante que ceux de la VZ (Bahrey & Moody, 2003; Picken Bahrey & Moody, 2003). Dès E14, ces cellules de la CP sont d'ailleurs capables, sous stimulation, de déclencher des potentiels d'action, même si elles n'expriment pas encore de courant calcique. Il faudra cependant attendre le stade P0 pour observer des potentiels d'action spontanés (Picken Bahrey & Moody, 2003).

Chez le rat, au stade E15, l'équipe d'Arnold Kriegstein a observé des activités calciques spontanées dans la VZ et dans la CP. Ils ont démontré que ces activités sont dépendantes d'une libération de calcium des stocks internes dans la VZ, alors que dans la CP, les activités sont dépendantes du calcium extracellulaire (Owens & Kriegstein, 1998). A ce même stade ils ont pu observer des activités calciques se propageant dans la VZ. Ces vagues se propagent au travers des cellules gliales radiaires et impliquent des connexines (donc des jonctions communicantes de type gap), les récepteurs P2Y₁ de l'ATP, et un relâchement de calcium des stocks intracellulaires dépendant de l'InsP₃ (Figure 21). Le blocage de ces activités diminue la prolifération des cellules gliales radiaires dans la VZ, démontrant ainsi le rôle capital de ces activités dans la neurogenèse (Weissman *et al.*, 2004).

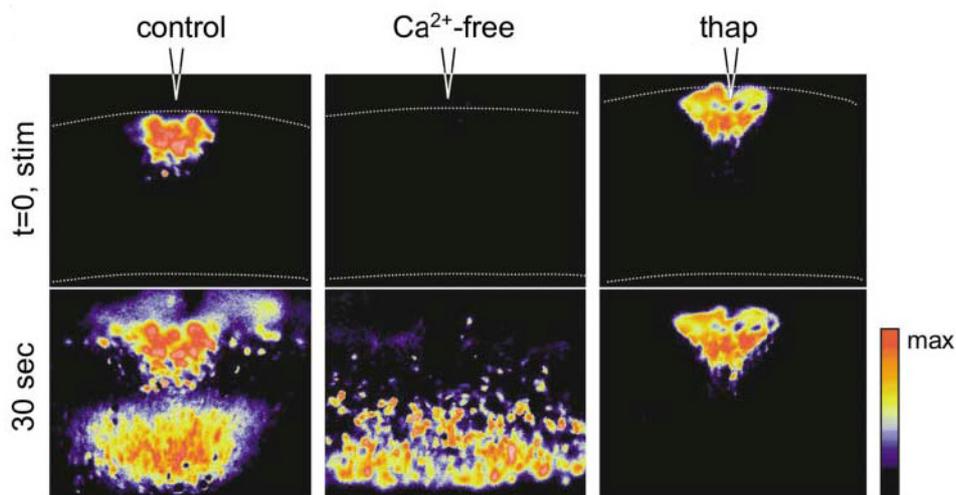


Figure 21 : Vagues calciques induites électriquement et se propageant dans la VZ.

Une stimulation électrique dans la CP (panneau de gauche) induit une augmentation de calcium dans la CP qui se propage dans la VZ. L'absence de calcium dans le milieu extracellulaire (panneau du milieu) bloque toute augmentation de calcium dans la CP mais ne bloque pas l'augmentation en VZ, alors que la déplétion des stocks calciques intracellulaires sous l'action de la thapsigargine ne bloque que l'augmentation de calcium dans la VZ. Ces deux expériences démontrent l'implication d'un relâchement de calcium des stocks intracellulaires dans la genèse des vagues calciques. D'après Weissman *et al.*, 2004.

Chez le rat au stade E16, il a été montré que le GABA et le glutamate pouvaient dépolariser les cellules progénitrices (LoTurco *et al.*, 1995). Dans la VZ, le glutamate agit par l'intermédiaire des récepteurs de l'AMPA et le GABA via les récepteurs GABA_A. Ces 2 neurotransmetteurs induisent une augmentation intracellulaire de calcium qui entraîne une inhibition de la prolifération. Cette étude a été historiquement une des premières démonstrations de l'implication des neurotransmetteurs dans la régulation de la neurogenèse. L'équipe de Pasko Rakic a montré par la suite que ces mêmes neurotransmetteurs avaient un effet opposé sur les précurseurs de la SVZ (Haydar *et al.*, 2000). Nous avons vu précédemment que la migration des neurones granulaires cérébelleux était dépendante de l'activité (Komuro & Rakic, 1998). De la même façon, l'équipe de Jeffery Barker a montré, que le GABA pouvait réguler la migration dans le néocortex, à partir de E15 (Behar *et al.*, 1996; Behar *et al.*, 2000; Behar *et al.*, 2001). Les effets du GABA sont néanmoins différents suivant la concentration utilisée : des concentrations de l'ordre du femtomolaire augmentent le chemotactisme des cellules de la VZ vers la CP, alors que des concentrations de l'ordre du micromolaire augmente la chemokinésie (mouvements aléatoires). Ces mouvements impliquent l'activation des récepteurs GABA_A, GABA_B, et GABA_C. Il a été démontré par la suite, toujours chez le rat, que le GABA, mais aussi la taurine, sont libérés par les neurones de la CP. Ces neuromédiateurs attirent les cellules en train de migrer, puis lors de leur arrivée dans la CP bloquent leur migration (Behar *et al.*, 2001).

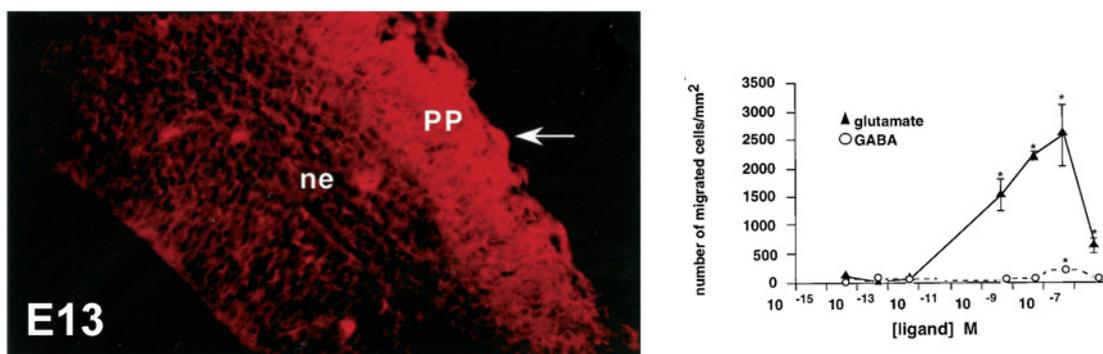


Figure 22 : Expression et rôle du glutamate au stade E13 chez la souris.

Le glutamate (en rouge sur la figure) est présent dans le néocortex chez la souris dès E13 et plus particulièrement dans la PP où il est capable d'induire un effet chemotactique sur les neurones en migration dans la VZ, alors que dans le même temps le GABA n'a pas d'effet (à noter que l'effet est inverse chez le rat). D'après Behar *et al.*, 1999.

La fonction principale des neurotransmetteurs chez l'adulte est d'assurer la communication de l'information entre les neurones, via la transmission synaptique. Cependant, bien avant l'existence de synapses, ces molécules sont présentes dans le cortex. Chez la souris l'expression précoce des neurotransmetteurs, a été détectée et quantifiée dès le stade E13 (Benitez-Diaz *et al.*, 2003) (Figure 23) : le glutamate, l'aspartate, le GABA, la glycine et la taurine sont tous présents en quantité suffisante pour activer leurs récepteurs respectifs. Assez paradoxalement, il semblerait que chez la souris, le GABA ait peu d'effet sur la migration mais que ce soit plutôt le glutamate qui joue ce rôle (Behar *et al.*, 1999) (Figure 22). Néanmoins, ces 2 neurotransmetteurs sont intimement liés. Il a en effet été montré chez la souris que les cellules en migration tangentielle expriment des récepteurs de l'AMPA perméable au calcium dès le stade E13 (Metin *et al.*, 2000). Au stade E15 chez le rat, l'activation de ces récepteurs AMPA peut entraîner une libération de GABA (Poluch & Konig, 2002).

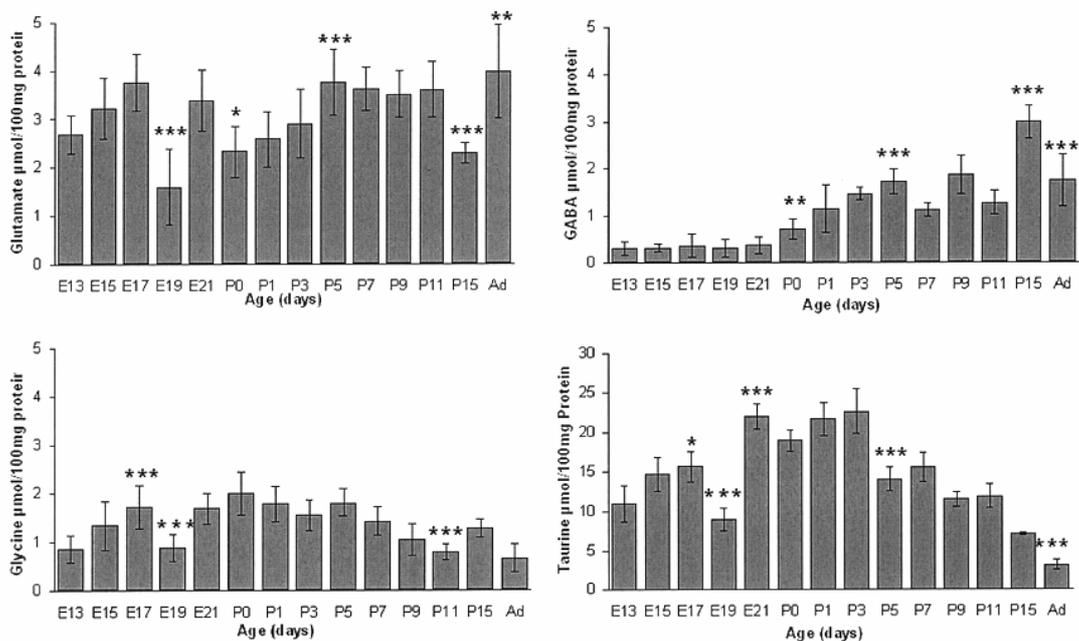


Figure 23: Variations des concentrations de neurotransmetteurs lors du développement du cortex cérébral chez la souris.

Mesure par HPLC dans des extraits de cortex pariétal à différents stades du développement. D'après Benitez-Diaz *et al.*, 2003.

La régulation de la concentration extracellulaire de ces neurotransmetteurs a été peu étudiée durant ces phases précoces. A des stades plus tardifs, le blocage des transporteurs du glutamate entraîne des oscillations calciques synchrones dans la population neuronale entière, démontrant le rôle actif de ces transporteurs (Demarque *et al.*, 2004).

Au travers de ces exemples, nous avons pu voir que l'activité est omniprésente et essentielle dans le développement du système nerveux central. Ses caractéristiques sont variées, tant d'un point de vue typologique que dans les mécanismes qui la génèrent. Il est maintenant clairement admis que l'activité spontanée est impliquée dans la prolifération des cellules précurseurs, la différenciation neuronale et la migration des neurones. Dans le néocortex, les neurotransmetteurs sont exprimés dès le stade E13 (Benitez-Diaz *et al.*, 2003). En revanche l'expression des canaux permettant la mise en place de ces activités, ainsi que le rôle qu'elles jouent dans la corticogenèse, à ce stade, restait encore un champ d'investigation vierge...

Problématique

L'activité électrique, est un acteur central dans le développement des vertébrés, notamment dans le néocortex. Une grande part de cette activité est contrôlée par les canaux ioniques dépendants du voltage. Comprendre l'intervention des canaux ioniques et de la signalisation calcique dans les phases précoces de la neurogenèse était l'objectif principal de mon projet.

Ce projet, initié dans le laboratoire Canaux Ioniques et Signalisation, portait initialement sur l'étude de la mise en place des canaux ioniques lors du développement précoce du néocortex de souris. Une collaboration avec le laboratoire de WJ. Moody à Seattle avait permis de mettre en évidence l'expression de canaux sodiques dépendants du voltage dans certaines cellules neuronales de la PP. J'ai participé à cette étude en développant une technique de RT-PCR sur cellule unique qui a permis de corrélérer un phénotype neuronal à l'expression de ces canaux sodiques dans les cellules de la préplaque. La présence de ces canaux dans certains neurones pionniers nous a ensuite amené à rechercher une éventuelle activité dans ces cellules.

L'observation d'une activité calcique spontanée dans les cellules proliférantes et neuronales du néocortex dès le stade E13, nous a conduit à rechercher d'une part les acteurs moléculaires de cette activité, et d'autre part, la contribution de cette activité au développement néocortical.

Dans ce contexte, 3 grandes questions se sont posées :

- quels sont les neurotransmetteurs et les canaux qui sont impliqués dans ces activités spontanées , en d'autres termes quel est la mécanistique de ces activités spontanées ?
- existe-t-il un lien entre l'expression des canaux sodiques et les activités calciques spontanées au stade E13 ?
- quel est le rôle physiologique de ces activités spontanées ?

La réponse à toutes ces questions conditionne notre compréhension du rôle joué par les activités calciques dans le développement du cortex embryonnaire normal. Des dysfonctionnements de ces activités à certaines périodes critiques du développement pourraient être considérées comme un facteur étiologique potentiel de certaines malformations corticales.

Résultats

Première partie : Expression précoce de canaux sodiques dans les cellules de Cajal-Retzius au stade de la préplaque

L'apparition de canaux ioniques membranaires spécifiques est une des premières preuves de la mise en place d'une activité électrique. L'équipe de Buse avait démontré au stade E9, sur des cellules neuro-épithéliales dissociées et remises en culture, une apparition précoce de canaux sodiques dépendants du voltage (Wiedehage *et al.*, 1992).

En collaboration avec le laboratoire de WJ. Moody (University of Washington, Seattle, USA), nous avons entrepris l'étude électrophysiologique sur tranche de cerveaux des différentes populations de cellules du néocortex de souris au stade de la préplaque (E12-E13). Nous avons pu démontrer, en utilisant la technique du patch-clamp en configuration cellule entière, que les cellules précurseurs, mais également les cellules neuronales, expriment toutes des courants potassiques sortant retardés. En revanche, seules 55% des cellules neuronales expriment un courant sodique entrant sensible à la TTX et, contrairement aux études sur cellules dissociées (Wiedehage *et al.*, 1992), aucune cellule précurseur de la VZ n'exprime un courant sodique. De manière très surprenante, nous n'avons enregistré aucun courant calcique dépendant du voltage à ce stade, ni dans les cellules précurseurs (alors que ce courant existe à E14 dans quelques cellules de la VZ ; Picken Bahrey & Moody, 2003), ni dans les cellules neuronales de la PP.

Afin de corrélérer ce phénotype électrophysiologique à un phénotype neuronal particulier, nous avons par la suite combiné ces expériences de patch-clamp à des marquages immuno-histo-fluorescents (par l'injection d'un marqueur fluorescent dans la cellule patchée). Nous avons ainsi observé, sur 16 cellules testées, que toutes celles qui expriment la calrétinine (un marqueur d'une population de cellules de Cajal-Retzius) (Del Rio *et al.*, 1995) expriment également des canaux sodiques. Mais ce courant sodique n'est pas exclusivement présent dans cette sous-population de cellules neuronales puisque d'autres cellules possèdent ce courant

sans exprimer la calrétinine. Cette technique d'immuno-histo-fluorescence couplée à la technique du patch-clamp est assez difficile à mettre en œuvre car la cellule patchée reste difficilement dans la tranche lors du retrait de la pipette de patch, ce qui explique le peu de cellules analysées.

Afin de corrélérer plus sûrement l'apparition de ces courants sodiques avec la population de cellules de Cajal-Retzius, mais également pour identifier les canaux sodiques exprimés lors de la différenciation précoce des cellules neuronales, nous avons utilisé la technique de la RT-PCR sur cellule unique, couplée au patch-clamp. Cette technique est très puissante puisqu'elle permet, après avoir déterminé les caractéristiques électrophysiologiques de la cellule, d'aspirer son cytoplasme (avec ou sans son noyau), puis par RT-PCR en multiplexe, de caractériser l'expression de plusieurs transcrits dans cette seule cellule. Nous avons ainsi recherché l'expression des transcrits pour les isoformes 1, 2 et 3 des canaux sodiques, la réeline, la calrétinine et enfin pour l'actine bêta comme contrôle positif. Nous avons pu observer que toutes les cellules de Cajal-Retzius (identifiées par l'expression de réeline) expriment le transcrit de l'isoforme 3 des canaux sodiques. Nous avons confirmé les résultats de l'équipe de Parnavelas (Lavdas *et al.*, 1999) en montrant que les cellules exprimant la réeline ne sont pas une population homogène puisque seulement 44% de celles-ci expriment également la calrétinine. Il existe enfin une autre population de cellules n'exprimant ni la réeline ni la calrétinine qui possèdent des transcrits des canaux sodiques.

Ces résultats (résumés dans la Figure 24) mettent en évidence l'acquisition de propriétés physiologiques neuronales très tôt au cours du développement par certaines cellules de la préplaque, incluant les cellules de Cajal-Retzius. La technique de RT-PCR nous a également permis de déterminer que les cellules du cortex n'exprimaient que l'isoforme $Na_v1.3$ des canaux sodiques, déjà connue pour son expression lors du développement (Beckh *et al.*, 1989). Cependant, malgré la mise en place de ce courant sodique, les cellules neuronales de la zone marginale ne seront capables d'engendrer des potentiels d'action qu'après la naissance (Schwartz *et al.*, 1998 ; Picken Bahrey & Moody, 2003). Ceci pose la question du rôle physiologique de ce courant sodique à ces stades précoces, surtout dans le contexte particulier des cellules de Cajal-Retzius et de leur implication dans la corticogénèse. Cette question est restée centrale dans l'élaboration de la suite de mon projet de thèse.

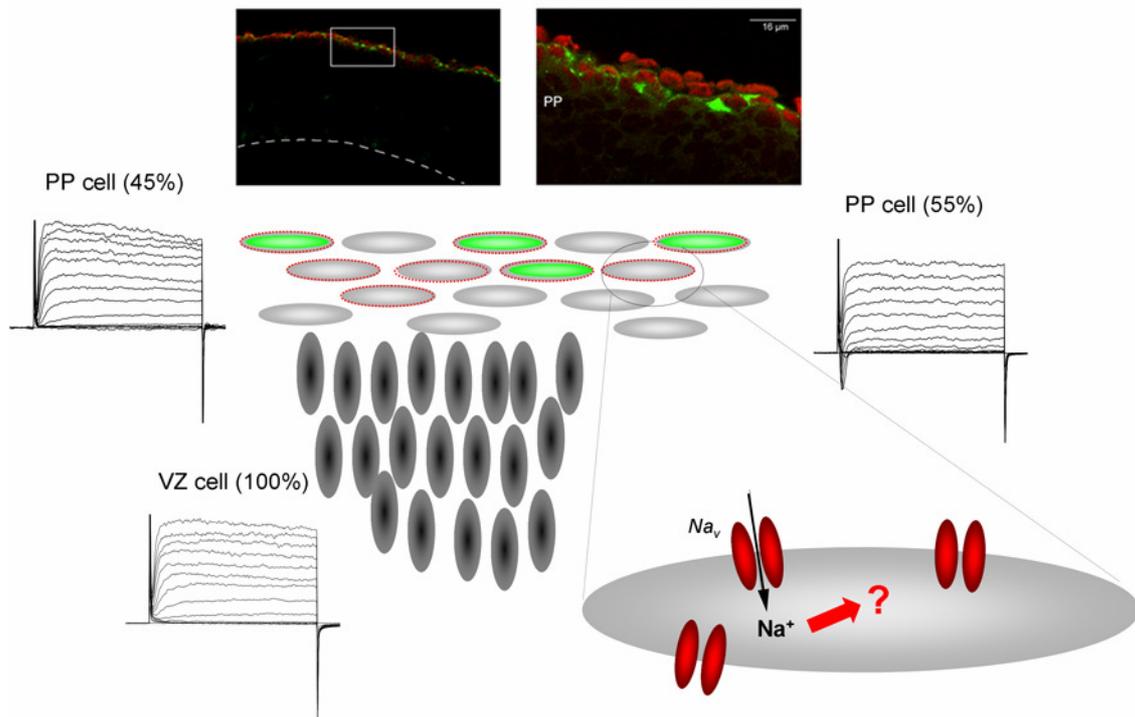


Figure 24 : Expression fonctionnelle de canaux sodiques dans la préplaque au stade E13. Des courants potassiques sortants sont présents dans toutes les cellules de la tranche. Dans 55% des neurones de la PP, un courant sodique apparaît en plus du courant potassique. Un immuno-marquage confirme que toutes les cellules de Cajal-Retzius (marquées par un anticorps contre la réeline, en vert) mais également une autre population neuronale "non Cajal-Retzius", expriment des canaux sodiques (en rouge).

Early Expression of Sodium Channel Transcripts and Sodium Current by Cajal-Retzius Cells in the Preplate of the Embryonic Mouse Neocortex

Mireille Albricieux,^{1,2} Jean-Claude Platel,² Alain Dupuis,² Michel Villaz,² and William J. Moody¹

¹Department of Biology, University of Washington, Seattle, Washington 98195, and ²Canaux Ioniques et Signalisation, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale E9931, Département Réponses et Dynamique Cellulaires, 38054 Grenoble, France

In mouse, the first neurons are generated at embryonic day (E) 12 and form the preplate (PP), which contains a mix of future marginal zone cells, including Cajal-Retzius cells, and subplate cells. To detect developmental changes in channel populations in these earliest-generated neurons of the cerebral cortex, we studied the electrophysiological properties of proliferative cells of the ventricular zone and postmitotic neurons of the PP at E12 and E13, using whole-cell patch-clamp recordings. We found an inward sodium current in 55% of PP cells. To determine whether sodium currents occur in a specific cell type, we stained recorded cells with an antibody for calretinin, a calcium-binding protein found specifically in Cajal-Retzius cells. All calretinin-positive cells had sodium currents, although so did some calretinin-negative cells. To correlate the Na current expression to Na channel gene expression with the Cajal-Retzius cell phenotype, we performed single-cell reverse transcription-PCR on patch-clamp recorded cells to detect expression of the Cajal-Retzius cell marker *reelin* and the Na channel isoforms SCN 1, 2, and 3. These results showed that virtually all Cajal-Retzius cells (97%), as judged by *reelin* expression, express the SCN transcript identified as the SCN3 isoform. Of these, 41% presented a functional Na current. There is, however, a substantial SCN-positive population in the PP (27% of SCN-positive cells) that does not express *reelin*. These results raise the possibility that populations of pioneer neurons of the PP, including Cajal-Retzius cells, gain neuronal physiological properties early in development via expression of the Na_v1.3 (SCN3) Na channel isoform.

Key words: Na current; Cajal-Retzius; *reelin*; preplate; single-cell RT-PCR; patch clamp

Introduction

Neurons in the cerebral cortex are generated in a proliferative region known as the ventricular zone (VZ), which lines the lateral ventricle of each telencephalic hemisphere (McConnell, 1995). Neurogenesis in the dorsomedial mouse neocortex occurs between embryonic days (E) 11 and E17, during which the cells undergo 11 cell divisions (Takahashi et al., 1995). A fraction of the progeny of each division exits the cell cycle and begins neuronal differentiation, migrating out of the VZ, across the intermediate zone, and into the cortical plate (CP) (Takahashi et al., 1996). In addition to this radial migration, there is also a tangential migration of cells arising in the ganglionic eminence to take up positions in the developing cerebral wall (De Carlos et al., 1996; Meyer et al., 1998). The first phase of neurogenesis occurs between E11 and E13 and gives rise to a group of neurons that form the preplate (PP) (Marin-Padilla, 1998), which is later split

into the marginal zone (MZ) and the subplate (SP) (Luskin and Shatz, 1985; Valverde et al., 1995). The PP neurons include Cajal-Retzius cells, other MZ cells, and SP neurons. These early-generated neurons perform an essential role in the development of the cerebral cortex (Chun and Shatz, 1989b; Frotscher et al., 2001). Cajal-Retzius cells regulate the phenotype of the radial glial cells (Soriano et al., 1997) and may direct neuronal migration (Frotscher, 1998; Marin-Padilla, 1998). SP cells play an essential role in the initial formation of efferent cortical connections that will pioneer later axonal pathways of CP neurons (Shatz and Luskin, 1986; Kim et al., 1991; McConnell et al., 1994). The majority of these early PP neurons disappear postnatally (Chun et al., 1987; Chun and Shatz, 1989a).

Few electrophysiological studies have been performed on Cajal-Retzius cells. Embryonically, these cells display a K current with an inactivating component (Mienville and Barker, 1997). Postnatally, they are capable of repetitive action potential activity, and this plus their low resting potential and NMDA receptor-mediated calcium influx and synaptic activity may contribute to their excitotoxic cell death after birth (Zhou and Hablitz, 1996; Mienville and Pesold, 1999; Radnikow et al., 2002).

In the present experiments, we sought to monitor the earliest phases of electrophysiological differentiation of the Cajal-Retzius cells. Because these neurons serve important functions at very early stages of cortical development, we reasoned that they might

Received Dec. 12, 2002; revised Dec. 4, 2003; accepted Dec. 8, 2003.

This work was supported by National Institutes of Health Grant NS38116, by a grant from the Région Rhône-Alpes, and by an Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale fellowship. We thank B. Lamboloz and B. Cauli for helpful advice on single-cell reverse transcription-PCR. We also thank F. Couraud, J. L. Eubanks, H. L. Picken-Bahrey, and Dr. D. A. Currie for stimulating scientific discussions.

Correspondence should be addressed to Dr. W. J. Moody, Department of Zoology, University of Washington, Box 351800, Seattle, WA 98195. E-mail: profbill@u.washington.edu.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3548-02.2004

Copyright © 2004 Society for Neuroscience 0270-6474/04/241719-07\$15.00/0

also show precocious physiological differentiation. We show that as E12 VZ cells become postmitotic and invade the PP, distinct patterns of functional Na⁺ channel expression emerge. By combining immunohistochemical staining and single-cell reverse transcription (RT)-PCR coupled with patch-clamp recordings, we showed that at the PP stage (E12–E13) virtually all Cajal-Retzius cells (97%; identified by expression of reelin) expressed Na channel transcripts of the SCN3 isoform and that almost half (41%) of these already displayed inward Na currents. An additional reelin-negative PP population also expressed Na channel transcripts and functional Na currents. These results indicate the very early physiological differentiation of at least two populations of PP neurons.

Materials and Methods

Tissue preparation. Timed-mated C57/Bl6 mice (B&K Universal, Kent, WA; or Iffa Credo, Lyon, France) were killed in a CO₂ chamber on gestational day E12 or E13. Pups were removed from the uterus, and the brains were dissected out in ice-cold artificial cerebral spinal fluid (ACSF), which contained (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃, 11 D-glucose, bubbled with 95% O₂/5% CO₂ to yield a pH of 7.4. Brains were embedded in 3% low temperature gelling agarose (Sigma, St. Louis, MO) at 30–32°C and placed on ice. After the agarose solidified, 200 μm thick coronal slices of the forebrain were cut in cold ACSF with a Vibratome 1000 (Technical Products International, St. Louis, MO) and allowed to recover in room temperature ACSF for 60–90 min.

Electrophysiological recordings. Recordings were performed in the dorsomedial and dorsolateral neocortex with the whole-cell or perforated patch configuration of the patch-clamp technique. Slices were placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95% O₂/5% CO₂) at room temperature (20–22°C). Visualization was performed with an Axioskop upright microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a Zeiss water immersion 63× objective and differential interference contrast optics. Cell type was determined by location in the slice, with zones (PP vs VZ) marked in slices from the same stage embryo stained with TuJ1 (Fig. 1A). Cells were targeted for recording within approximately the first three to four cell layers from the pia, a region that comprises most of the PP. This region contains mainly cells with bipolar morphology (Fig. 1A). Pipettes (12–14 MΩ) were pulled using a PP-83 puller (Narashige, Tokyo, Japan), coated with Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI), and filled with K or Cs gluconate internal solution, which contained (in mM): 100 KClu or CsGlu, 0.5 EGTA, 5 MgCl₂, 40 HEPES, 2 Na-ATP, and 0.3 Na-GTP, pH 7.25. Recordings were done using an Axopatch-1D amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) and P-Clamp software (Axon Instruments). Electrode capacitance was compensated after establishment of a tight seal. Series resistance compensation was not used given the low resistance of our electrodes and the relatively small currents involved. Leak subtraction was not used because mean current amplitudes are ~100–400 pA and mean input resistance is ~3800 MΩ. All potentials were corrected for a measured junction potential of 9 mV, pipette negative. Capacitance of the cells are evaluated from steps of current induced under triangle-wave voltage command, as described previously (Moody and Bosma, 1985). Statistical tests were performed using Student's *t* test if not otherwise noted, and all results are presented as mean ± SD.

Cell filling and immunostaining. In some experiments, patch pipettes were back-filled with 2% Texas Red Dextran 3000 MW, lysine fixable (Molecular Probes, Eugene, OR). During the recording, cell filling was observed using a Texas Red filter set (excitation, 560 nm; emission, 645 nm; Chroma Technology Inc., Brattleboro, VT). Then, the pipette was removed, and the slice was fixed for 1 hr in fresh 4% paraformaldehyde in PBS (in mM): 3.16 NaH₂PO₄, 6.84 Na₂HPO₄, and 0.15 NaCl, pH 7.2. Fixation and all subsequent steps were performed at room temperature and were light protected. After washing with TBS plus 0.2% Triton X-100 (in mM: 0.1 Tris base and 0.15 NaCl, pH 7.5), slices were blocked with 3% BSA (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), 3%

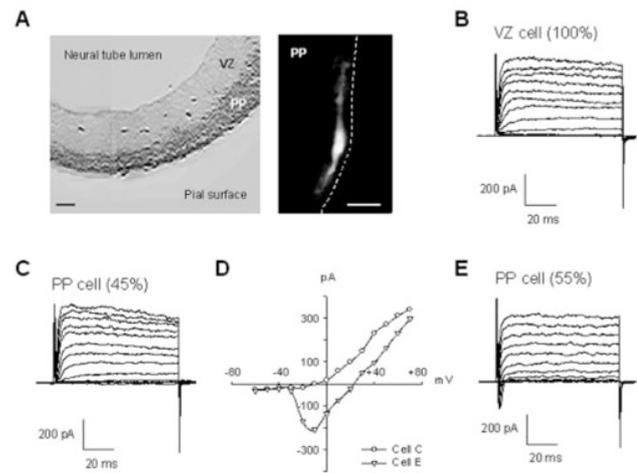


Figure 1. Appearance of a sodium current in addition to the potassium current as neurons invade the PP. *A*, Neocortical part of an embryonic coronal slice (dorsal part to the bottom) with the neuronal population, corresponding to the PP, stained with the neuronal-specific TuJ1 antibody (dark gray) and the unlabeled proliferative population corresponding to the VZ (light gray). Right, Texas Red dye fill of a typical PP cell. The dashed line indicates the position of the pia. Scale bars, 50 μm. *B*, Representative outward K currents in a VZ cell. In this and all records, depolarizing voltage stages, 80 msec in duration, were applied from a holding potential of –61 mV to voltages between –71 and +61 mV in 10 mV increments. *C*, Representative outward K currents obtained in 45% of PP cells. *D*, Current–voltage plots from traces recorded in the two PP cells showed in *C* (○) and *E* (△), measured 2.3 msec after onset of the depolarizing pulse. *E*, Representative outward K currents and inward Na currents obtained in 55% of PP cells.

NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories), and 0.2% Triton X-100 in TBS (dilution/blocking buffer) for 30 min. Slices were then incubated overnight with the neuron-specific anti-class III βtubulin antibody (TuJ1; dilution, 1:500 in dilution/blocking buffer; Babco, Richmond, CA) or the Cajal-Retzius cell-specific anti-calretinin antibody (Ca²⁺ bound and unbound conformation; dilution, 1:750 in dilution/blocking buffer; Chemicon, Temecula, CA). After washing in TBS plus 0.2% Triton X-100, slices were incubated for 2 hr with the appropriate FITC-conjugated secondary antibody [goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for TuJ1 immunostaining or goat anti-rabbit IgG (Chemicon) for anti-calretinin immunostaining] diluted (1:300) in dilution/blocking buffer. After washing in TBS plus 0.2% Triton X-100, slices were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). For nuclear staining, slices were incubated for 3 min in 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindone (DAPI) in TBS plus 0.2% Triton X-100 during one of the washes. Images were acquired with a DEI-750D digital camera (Optronics, Goleta, CA) coupled with an Axioskop microscope (Carl Zeiss), using an oil immersion 40× objective. Images were stored and analyzed using Adobe Photoshop 4.0.

Single-cell RT-PCR. Single-cell RT-PCR was performed mainly as described by (Lambolez et al., 1992). Before the experiments, 9.5 μl of a reverse transcriptase mix composed of 1× RT buffer, 0.5 mM of each dNTP, 5 μM random primers, 10 mM DTT, and 20 U of RNasin was distributed in 0.2 ml thin wall microtubes (Stratagene, La Jolla, CA) kept at 4°C. After whole-cell recording, most of each cell was aspirated into the patch pipette. The pipette was removed from the slice, and the tip of the pipette was broken in a prepared RT-PCR tube that was immediately frozen in dry ice. At least one control consisting of an unpatched filled pipette was made every seven patched cells. At the end of a patch-clamp experiment, all the frozen tubes were thawed. Superscript II (100 U) was added to the tubes, followed by an overlay of 20 μl of mineral oil. These tubes were then left overnight at 37°C (Lambolez et al., 1992).

The next day, 40 μl of a PCR mix was added through the oil of each reverse transcriptase tube to give the following final concentrations: 1× Titanium PCR buffer, 0.2 mM dNTPS, 25 nM of each primer (five pairs of primers), and 2.5 U/50 μl of Titanium polymerase (Clontech, Palo Alto, CA). A 1 min step at 95°C allowed the inactivation of reverse transcrip-

Table 1. Primer pairs designed for RT-PCR

Primers	Sequence (5' → 3')	Annealing temperature	RT-PCR product size
Actin F1	ATATCGCTGGCTGGTCGTC	55°C	753 bp
Actin R1	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGAT		
Calretinin F3	TTGGCGGAAGTATGACACAGAC	51°C	302 bp
Calretinin R3	CAATATAGCCGCTTCCATCCTT		
Reelin F2	ACTCTGGCAACCGTACAATAATG	55°C	343 bp
Reelin R2	GACCGGATCAGCAGAAGAACTA		
SCNFUA	TTCATCGGCGTCATCAT	51°C	565 bp
SCNRUA	ACATCATCAGAGCAAGAGC		
SCNFUB	GGAGACATCTCCAGAGAT	51°C	556 bp (SCN1/ SCN2) or 560 bp (SCN3)
SCNRUB	ATCATGACGTCAGACAGCTT		

SCNFUB, SCNRUB, SCNFUA, and SCNRUA are universal SCN primers designed in short regions of strict identity between cDNA MScn1a, MScn2a, and MScn3a. F, Forward equal direct sense primer; R, reverse.

tase, the denaturation of newly synthesized RNA/DNA duplex, and the “hotstart” activation of Titanium polymerase. The samples were then submitted to 30 cycles of amplifications (30 sec at 95°C, 30 sec at 56°C, 1 min at 68°C), followed by a single extension step of 5 min at 68°C (Robocycler 96; Stratagene). Aliquots (2 μl) of these first-step multiplex PCRs were then used as templates for a second run of PCRs. This second run was performed essentially as the first one with two differences: (1) one pair of primers (100 nM of each primer) was added per PCR, and (2) each PCR was run at the experimentally determined optimal annealing temperature of the primer pair used. After this second PCR, 10 μl of each sample was run on a 2% agarose gel. Gels were stained with SYBR Green I (Molecular Probes) for half an hour and scanned on Fluorimager SI (VistraFluorescence). The five couples of primers used in this study are presented in Table 1. They were designed with the software Primer Select (DNASTar) using cDNA sequence for mice reelin (GenBank accession number U24703), calretinin (GenBank accession number 6970318), and β-actin (GenBank accession number 6671508). In the case of the Na channel isoforms, the three SCN1, SCN2, and SCN3 α-subunit isoforms were chosen because they are known to be expressed in embryonic mouse cortex (Beckh et al., 1989). Only small parts of the corresponding SCN cDNA and genes could be found in GenBank. Therefore, the putative cDNAs were reconstructed using the homolog rat cDNAs as baits for a Basic Local Alignment Search Tool search of Mouse expressed sequence tag. Comparisons of the putative cDNAs of the SCN1, SCN2, and SCN3 isoforms allowed the characterization of short regions of strict identity that were used to design primers for the ubiquitous PCRs SCNUA and SCNUB. To prevent any artifactual amplification of genomic DNA, we ensured that each of the cDNA regions targeted by our PCRs contained at least one intron. Except for calretinin, the corresponding genes were not present in public access libraries, and the analysis of the intron–exon organization was done by Megablast searching the National Center for Biotechnology Information Mouse Trace Archive database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.fcgi>). In this way, we predicted five and three exons in the genomic sequences corresponding, respectively, to PCRs SCNUA and SCNUB. This prediction is in full agreement with the genomic organization of human genes SCN2A (GenBank accession numbers AF327225 to AF327229) and SCN3A (GenBank accession numbers AF330116 to AF330135). This was further confirmed by a control PCR on mouse genomic DNA: PCR SCNUA and the PCR for reelin did not yield a detectable product under our experimental conditions, whereas PCR SCNUB and PCRs for actine and calretinin gave products larger than the corresponding cDNAs. Comparisons of the putative cDNA of the SCN1, SCN2, and SCN3 isoforms allowed the characterization of short regions of strict identity that were used to design primers for the ubiquitous PCRs SCNUA and SCNUB. The regions encompassing PCRs SCNUA and SCNUB were checked for each isoform by direct RT-PCR and sequencing from adult or embryonic RNA. Restriction digest of PCR SCNUA by an enzyme such as *Bsp143-I* (Fermentas, an isoschizomer of *Sau3A*) gives clearly distinct patterns that allow the relative quantification of the expression of the three SCN isoforms. This method worked well when starting from tissue total RNA, but PCR

SCNUA proved poorly sensitive in single-cell experiments. Thus, for single-cell experiments, the relative expression of the three isoforms was analyzed by the direct sequencing of the PCR–SCNUB products.

Results

E12–E13 VZ cells have only a delayed outward potassium current

Mouse VZ cells are not extensively electrically coupled as they are in the rat (Picken-Bahrey and Moody, 2003a). The mean input resistance reported here ($R_{in} = 3800 \pm 1028 \text{ M}\Omega$) is close to a single uncoupled cell value estimated by Lo Turco and Kriegstein (1991) by extrapolation of their plot of dye-coupled cluster size versus R_{in} to a cluster size of 1 (2600 MΩ), and our measured cell capacitance (C_m) of $5.4 \pm 1.5 \text{ pF}$ is consistent with a single-cell electrical compartment with a diameter of 13 μ. This relative lack of electrical coupling allowed us to voltage clamp VZ cells without recourse to uncoupling methods (Mienville et al., 1994) and greatly improved the accuracy of our current measurements (Picken-Bahrey and Moody, 2003a,b). In our experiments, there were no significant differences between E12 and E13 VZ cells, so they have been analyzed together.

At E12–E13, all VZ cells ($n = 30$) had a delayed outward potassium current, activated by depolarization (Fig. 1B). This current was totally inhibited by replacing K with Cs in the pipette solution (data not shown; $n = 10$). The mean I_K amplitude was $317 \pm 135 \text{ pA}$ at +61 mV ($62.6 \pm 32.5 \text{ pA/pF}$), a value the same as found in E14 VZ cells (Picken-Bahrey and Moody, 2003a). The current first activated at $-12.7 \pm 9 \text{ mV}$. No inward currents and no hyperpolarization-activated currents were seen in any VZ cell.

An inward sodium current appears as postmitotic neurons invade the PP

We studied 255 cells from the E12–E13 PP (Fig. 1C–E). There was no significant difference in the input resistance between E12–E13 VZ and PP ($3800 \pm 1028 \text{ M}\Omega$ in VZ vs $5228 \pm 412 \text{ M}\Omega$ in PP; $p = 0.2$) or in the cell capacitance ($5.4 \pm 1.5 \text{ pF}$ in VZ vs $6.2 \pm 2.4 \text{ pF}$ in PP; $p = 0.12$). The K current density, however, was significantly smaller in the PP cells ($45.3 \pm 30.6 \text{ pA/pF}$ in PP vs $62.6 \pm 32.5 \text{ pA/pF}$ in VZ; $p = 0.008$).

More than half of the PP cells (55%; 141 of 255) expressed an inward Na current in addition to the potassium current (Fig. 1D,E). This Na current is expressed at a mean density of $27.6 \pm 22.7 \text{ pA/pF}$ (amplitude measured at the current peak) and is completely blocked by 10 nM TTX (data not shown). The proportion of PP cells expressing Na⁺ currents was the same at E12 and E13 [54% at E12 ($n = 98$) vs 56% at E13 ($n = 157$)].

There are two cell populations in the PP, as determined by the ion channel populations

The PP cells that express functional Na currents seem to represent a distinct subpopulation. Figure 2A shows the distribution of Na current densities in our sample of PP cells. A second-order regression fit to Na currents greater than zero predicts (with a 99% confidence limit) that between 15 and 21 cells of this population should have no detectable Na current, whereas in our sample 115 such cells were found. This indicates that ~85% of the cells without Na current belong to a separate population from those with detectable Na current. We observed no correlation between cell morphology from dye-fill experiments and the presence or absence of Na current.

Discriminating the two populations reveals other significant differences between PP cells that do or do not express Na currents (Fig. 2C). Cell capacitance is significantly higher in the Na plus K

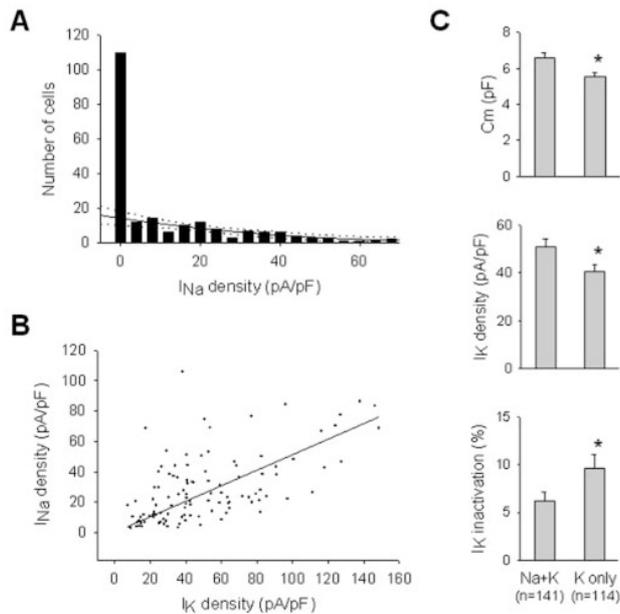


Figure 2. Two different cell populations in the PP defined by their ion channel properties. *A*, Frequency histogram of Na current densities (pA/pF) in PP cells ($n = 255$), divided in 18 bins, with the second-order regression curve fitting to the cells expressing a non-zero Na current (black solid line) and its 99% confidence intervals (dotted lines). This relationship predicts only $\sim 15\%$ of the zero-Na current cells actually detected, indicating that most zero-Na current cells belong to a distinct population. Fitting a single Gaussian distribution to the non-zero Na current values predicts even fewer zero-Na current cells, and thus a greater percentage of zero-Na current cells, that belong to a separate population. *B*, Positive correlation between Na current density and K current density among PP cells ($r = 0.631$). A first-order regression fit is shown. *C*, Cell capacitance (C_m ; top), K current density (middle), and K current inactivation (bottom) are significantly different between PP cells with and without detectable Na currents. Data are presented as mean \pm SEM; asterisks denote a significant difference ($p < 0.05$).

population [6.6 ± 2.7 pF in the Na plus K ($n = 141$) vs 5.6 ± 1.7 pF in the K only ($n = 114$); $p = 0.003$], as is the K current density (55.2 ± 54.3 pA/pF in the Na plus K vs 40.7 ± 24.6 pA/pF in the K only; $p = 0.03$). The K current inactivation is statistically significantly smaller in the Na plus K population (5.9% in the Na plus K vs 11.1% in the K only, measured at 80 msec; $p = 0.004$). Moreover, there is a positive correlation between the Na current density and the K current density (Fig. 2*B*), suggesting that these two currents are under coordinated developmental control in these cells. The fact that cell capacitance is higher in the Na plus K population may be correlated to the process development of some PP cells.

To ensure that the presence of the K current was not affecting our measurement of the Na current, we inhibited I_K by replacing intracellular K with Cs ($n = 63$) and found the same proportion of Na plus K and K only cells (49% of I_{Na} in Cs vs 55% in K; $p = 0.48$; two-tailed Fisher's exact test). This indicates that the presence of delayed K currents does not interfere with our ability to detect Na currents. [The Na current amplitude and density were actually somewhat smaller with Cs in the pipette (18.4 ± 16.1 pA/pF in Cs vs 27.6 ± 22.6 pA/pF in K; $p = 0.02$). We have made a similar observation for Na^+ currents in the E14 VZ (Picken-Bahrey and Moody, 2003a). This could be attributable to an effect of the Cs on the Na channel itself or on the surface charges of the cell membrane that can affect the Na channel conductance via both gating and permeation mechanisms (Ohmori and Yoshii, 1977).]

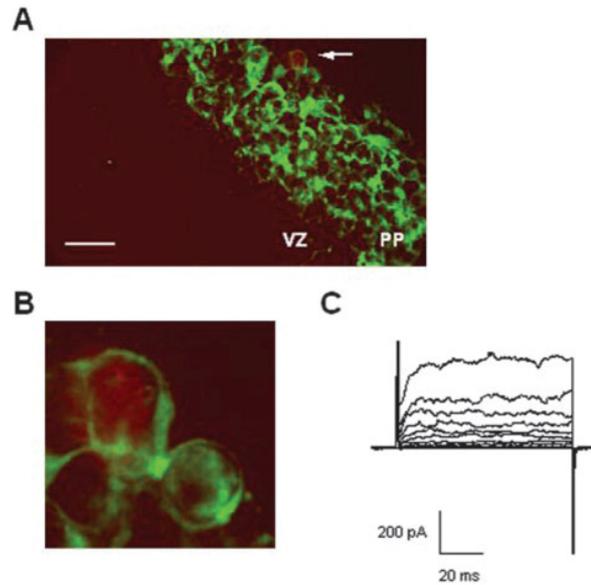


Figure 3. The two PP cell populations are neuronal cells. *A*, Merged images showing a representative TuJ1 staining (green cells) of an E13 slice and the recorded cell filled with Texas Red Dextran 3000 MW (red cell close to the arrow) applied through the patch pipette ($n = 10$). Scale bar, 25 μ m. *B*, A higher magnification shows that the recorded cell is surrounded by TuJ1 staining. *C*, Corresponding potassium outward current recorded under depolarization of the red stained cell shown in *A* and *B*.

Correlation between the sodium current appearance and cellular phenotypes in the PP zone

To see whether Na current expression marks an identifiable neuronal population in the PP, we marked a series of recorded cells by filling them with Texas Red Dextran 3000 MW and then counterstaining with antibodies directed against either neural-specific tubulin (TuJ1) or calretinin. The monoclonal antibody TuJ1 specifically recognizes neuron-specific class III β tubulin and has been used to identify differentiating and postmitotic neurons during neurogenesis (Menezes and Luskin, 1994). Calretinin is a neuron-specific calcium-binding protein found in at least one subpopulation of Cajal-Retzius cells during mouse neurogenesis (Soriano et al., 1994; Del Rio et al., 1995; Fonseca et al., 1995). Recent reports indicate that calretinin may also be found in other pioneer neuron populations in the embryonic rat cortex (Meyer et al., 1998). The antibody anti-calretinin used here reacts with both calcium-bound and unbound conformations of calretinin.

We first confirmed that all PP cells are TuJ1 positive by double-staining a series of slices with DAPI and TuJ1 (data not shown). We next showed for a sample of 10 recorded and filled cells that TuJ1 immunoreactivity was present whether or not the cells expressed a detectable Na current (an example showing a TuJ1-positive cell with no Na current is presented Fig. 3).

We next tested whether the Cajal-Retzius cells, the first neurons to enter the PP (Frotscher, 1998; Marin-Padilla, 1998), were the population that expressed Na currents. Double labeling showed that $\sim 12\%$ of the TuJ1-positive cells are calretinin positive in the E12 or E13 PP ($n = 450$ cells from 16 slices; data not shown). We were able to recover 16 cells after patch clamping and dye filling and successfully stain them for calretinin immunoreactivity (two examples are shown in Fig. 4). (It proved difficult to remove the whole-cell pipette after recording without also removing the recorded cell from the slice.) All five cells that were calretinin positive also expressed detectable I_{Na} . All six cells that

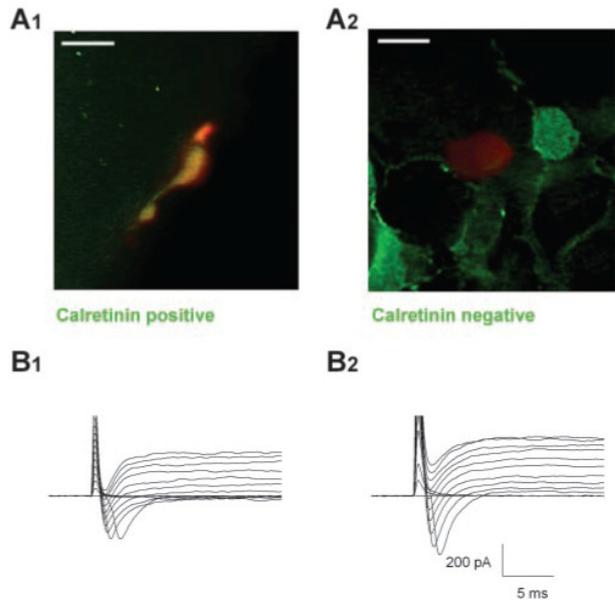


Figure 4. Calretinin-positive cells always express a Na current. *A1, A2*, Merged images showing representative calretinin staining (green cells) of E12 and E13 slices and the recorded cells filled with Texas Red Dextran 3000 MW (red cells) ($n = 16$). Scale bars, $10 \mu\text{m}$. *B1, B2*, Corresponding currents recorded under depolarization of the red stained cells shown in the top panels. Only the first 30 msec of the recording are shown.

had no detectable I_{Na} were calretinin negative. However, five additional cells were calretinin negative and did express I_{Na} . Thus, the Cajal-Retzius phenotype, as judged by calretinin expression, is specifically associated with I_{Na} expression, but the calretinin-negative phenotype is variable with regard to I_{Na} expression.

None of the cells we tested that expressed I_{Na} was capable of generating overshooting action potentials in response to depolarizing stimuli under current clamp nor did any fire repetitively. The amplitude of I_{Na} at this early stage is probably too small, or its time course too fast in relation to the long membrane time constant, to support full action potentials.

Correlation between the sodium channel appearance and molecular phenotypes in the PP zone

To better correlate the appearance of the Na current to the Cajal-Retzius cell population and to ask whether early in their differentiation some Cajal-Retzius cells might be expressing Na channel transcripts but not yet have functional channel proteins, we performed single-cell RT-PCR experiments coupled with patch-clamp experiments. We were able to record from 56 cells and apply RT-PCR, of which 49 (87%) were successful as judged by amplification of our control marker, β -actin. The present multiplex RT-PCR procedure allows the simultaneous characterization of the expression of several markers on a single cell. We chose reelin and calretinin as specific cellular markers for Cajal-Retzius cells. Because RT-PCR allows detection of channel expression at a transcriptional level, to correlate with functional channel protein expression measured by patch-clamp recordings, we also amplified transcripts of brain Na channel α -subunit isoforms.

Four α -subunits are known to be associated with TTX-sensitive Na currents in the brain: $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, and $\text{Na}_v1.6$ (expressed by genes *SCN1*, *SCN2*, *SCN3*, and *SCN8*, respectively). Among these, $\text{Na}_v1.6$ (*SCN8*) is known to be expressed as a truncated form, incompatible with a Na current,

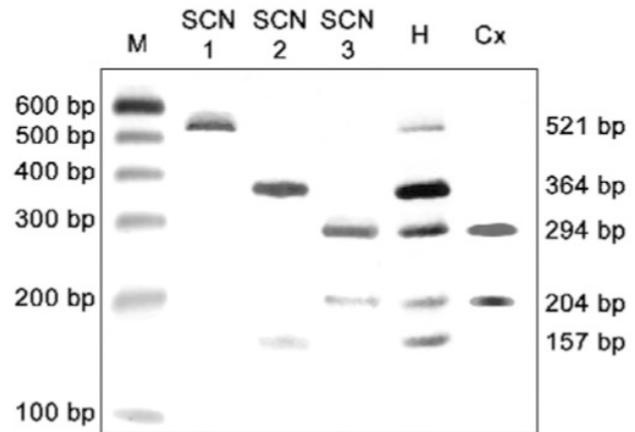


Figure 5. Relative quantification of SCN isoforms by competitive RT-PCR. RT-PCR SCNUA (see Table 1 for primers) allows the competitive coamplification of cDNA fragments from SCN1, SCN2, and SCN3 mRNAs. The corresponding PCR products are 556 bp long for SCN1 and SCN2 and 560 bp long for SCN3. Restriction digestion of the pure SCN1 isoform PCR product by *Bsp143-I* results in two fragments of 521 and 35 bp (lane SCN1), whereas the same digestion results in three fragments for pure SCN2 (364, 157, and 35 bp) and four fragments for pure SCN3 isoform (294, 204, 35, and 27 bp) (lanes SCN2 and SCN3, respectively). The presence and relative intensity of these different fragments can, thus, give an estimation of the relative contribution of the three different isoforms in total RNA from E13 brain hemispheres (H) or from microdissected E13 neocortex (Cx). M, 100 bp molecular weight markers.

from E12.5 to E14.5 in embryonic mouse (Plummer et al., 1997) (confirmed in our hands). We, therefore, focused our study on the expression of SCN isoforms 1, 2, and 3. We designed two different RT-PCRs, PCR-SCNUA and PCR-SCNUB, with primers localized in sequences regions fully conserved between the three SCN isoforms. The PCR-SCNUA target sequence is located in the 5' part of the coding sequence of SCNs, whereas PCR-SCNUB mapped is in the 3' part of the coding sequence of these RNAs (locations deduced from the comparison with rat SCN isoforms).

To determine which Na channel isoform was likely to dominate expression in the PP, we isolated total RNA from microdissected neocortices of E13 mice. RT-PCR SCNUA conducted on this material demonstrated the exclusive expression of isoform SCN3 (Fig. 5). This observation was independently confirmed by single-cell RT-PCR using the second PCR, SCNUB. The sequence electrophoretograms of six SCNUB products originating from six independent cells presented a clear and unique sequence corresponding to isoform SCN3 ($n = 6$ of 6; data not shown). To control for adequate detection of SCN1 and 2 isoforms, we repeated this analysis using whole cerebral hemispheres rather than microdissected neocortices. In whole hemispheres, PCR SCNUA showed expression of all three isoforms, with SCN1 being at the lowest level (Fig. 5).

Coanalysis at the transcripts level of calretinin and reelin expression in PP cells showed that calretinin-positive cells were always reelin positive but that only 44% of reelin-positive cells were also calretinin positive. This indicates that reelin is a more accurate marker for Cajal-Retzius cells and that, in agreement with the results of Meyer et al. (1998) and Lavdas et al. (1999), calretinin expression identifies only a subset of these cells.

We further analyzed the correlation between reelin expression, SCN transcript expression, and the presence of functional Na and K currents (Fig. 6). Virtually all Cajal-Retzius cells, judged by reelin expression, expressed Na channel transcript (97%; 31 of 32 cells) (Fig. 6*A, B*). There remained, however, a significant

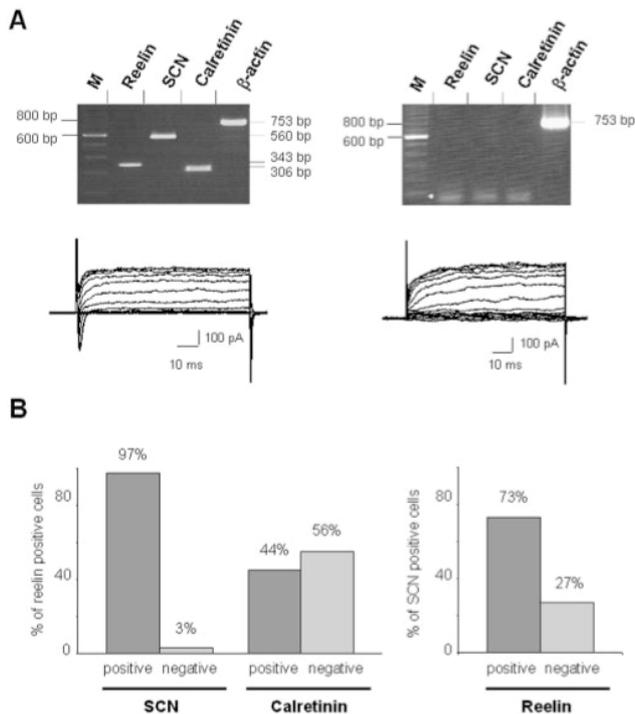


Figure 6. Single-cell RT-PCR evidence for a differential expression of reelin, calretinin, and Na channel α -subunit (SCN1a, 2a, and 3a) in the PP cells. *A*, Agarose gel analysis of two representative cells. The left panel corresponds to a typical Cajal-Retzius cell that proves positive to reelin, SCN, and calretinin and possessed also a Na current. On the contrary, the right panel corresponds to a typical non-Cajal-Retzius cell that was negative for the Na current. In this last case, the β -actin-positive control is essential to ascertain that this observation does not stem from a false negative RT-PCR (M, molecular weight marker). *B*, Histograms summarizing single-cell RT-PCR experiments ($n = 49$) and comparing SCN versus reelin expression (left), calretinin versus reelin expression (middle), and reelin versus SCN expression (right).

number of cells that expressed Na channel transcripts that were reelin negative (27% of all SCN-positive cells) (Fig. 6*B*). Although virtually all reelin-positive (Cajal-Retzius) cells expressed SCN transcripts, only 41% expressed detectable Na currents. This implies that reelin and Na channel transcription are early and correlated events in the differentiation of Cajal-Retzius cells and that the appearance of functional Na channel proteins in the membrane occurs somewhat later. (This percentage is unlikely to be an artifact of PCR amplification or patch-clamp recording, because we were able to confirm that 100% of PP cells that expressed detectable Na currents were positive for SCN transcripts.)

Overall, the results of our single-cell RT-PCR experiments confirm the results of our immunostaining experiments: all Cajal-Retzius cells express Na channel genes of the SCN3 isoform, and even as early as E12–E13, a large fraction of these have functional Na channel proteins in the plasma membrane. Na channel expression is not, however, exclusively a property of Cajal-Retzius cells at this stage. There is another, as yet unidentified, population of PP cells that also expressed Na channel transcripts and Na currents.

Discussion

In the experiments reported here, we have combined patch-clamp recording, immunocytochemistry, and single-cell RT-PCR methods to study the early differentiation of PP cells in the embryonic mouse neocortex. In the proliferative VZ from which the

PP cells arise, cells express only delayed outward K currents. This has been shown for VZ cells at E9 (M. Albrieux and W. J. Moody, unpublished observations) and here for E12–E13. The first stage at which we detect Na currents in neocortical VZ cells is E14 (Picken-Bahrey and Moody, 2003a).

As the earliest neurons of the cortex enter the PP, some begin to express inward Na currents in addition to the outward K currents. To investigate which subpopulations of PP cells expressed Na currents at these early stages, and how that functional expression of Na channel proteins was related to transcription of specific Na channel genes, we performed RT-PCR to detect specific cell type markers and Na channel transcripts on PP cells that had been subjected to whole-cell patch-clamp recording. The results showed that of the Cajal-Retzius cell population, identified by amplification of transcripts for the secreted protein reelin, 97% also expressed Na channel transcripts. RT-PCR on microdissected neocortices at this stage and direct sequencing of single-cell PCR products indicated that these transcripts were of the SCN3 Na channel subtype, in keeping with the results obtained in E12 rat brain using Northern blot (Beckh et al., 1989). Among these Cajal-Retzius cells expressing Na channel transcripts, only about half (41%) showed detectable Na currents in whole-cell recordings. This indicates, as expected, a time lag between Na channel transcription and the insertion of functional Na channels into the plasma membrane. Thus, Na channel expression and the appearance of inward Na currents are very early events in the differentiation of Cajal-Retzius cells.

The early expression of the SCN3 Na channel subtypes in PP cells is correlated temporally with the appearance of the ryanodine receptor form of intracellular Ca release channel. At E13, VZ cells express only the InsP_3 type of Ca release channel. At the same stage in the PP, 60% of the cells also express the RyR release channel (Faure et al., 2001). The simultaneous appearance of these two important channels at this stage suggests that their combined action, possibly in activity-dependent triggering of intracellular Ca release, may play an important developmental role in these pioneer neuron populations of the PP.

In embryonic rat cortex, Mienville and Barker (1997) and Mienville and Pesold (1999) reported that Cajal-Retzius cells lacked a functional Na current at E18, although one is present in this population a few days later, at early postnatal stages (Zhou and Hablitz, 1996). In all these studies, Cajal-Retzius cells were identified by morphological criteria only, which our results indicate do not correspond to identification based on specific molecular markers. In contrast, because marked differences have been described in other physiological properties of cells of embryonic rat and mouse cortex (Picken-Bahrey and Moody, 2003a), it is possible that the properties of the Cajal-Retzius cells differ in rat and mouse.

The use of calretinin and reelin as markers for embryonic Cajal-Retzius cells requires some comment. Recent experiments in embryonic rat cortex have shown that as early as E11.5 there is a population of calretinin-positive pioneer neurons in layer I that are reelin negative (by antibody staining) and do not appear by morphological criteria to be Cajal-Retzius cells (Meyer et al., 1998). These authors argue further that, at these early stages, reelin-positive neurons are not true Cajal-Retzius cells but rather a precursor population (termed subpial granule neurons) that is the precursor to postnatal Cajal-Retzius cells and one other cell type (subpial pyriform cells). We have defined the Cajal-Retzius cell population in our experiments as reelin-positive cells. The fact that this population may be a precursor to Cajal-Retzius cells does not materially change our conclusions, namely that expres-

sion of the *SCN3* sodium channel gene and the functional current are very early events in the differentiation of Cajal-Retzius neurons, but events that are not exclusive to that population. Other criteria for identifying Cajal-Retzius neurons postnatally cannot easily be applied in our experiments are early embryonic stages. For example, the electrophysiological characteristics of postnatal Cajal-Retzius neurons, the presence of I_{FH} , for example (Kilb and Luhmann, 2000), have not yet developed at E12–E13 (M. Albrieux and W. J. Moody, unpublished observations). Similarly, the bipolar morphology and characteristic subplate distance of postnatal Cajal-Retzius neurons are not specifically indicative at early stages (Albrieux and Moody, unpublished observations from biocytin fills) (Meyer et al., 1998).

In our experiments, all calretinin-positive cells were also reelin positive, indicating either that our recordings never targeted the early pioneer neurons reported by these authors (which are calretinin positive but reelin negative), or that the combination of calretinin and reelin immunoreactivity does not identify these cell types in mouse as it does in rat, or that these cells are expressing reelin RNA (detected in our PCR protocol) but not reelin protein [as would be detected by the antibody protocol of Meyer et al. (1998)]. So, it remains unclear whether we can attribute part of our population of reelin-negative neurons that have functional sodium currents to these pioneer cells. An intriguing possibility is that this second population represents future SP cells. In either case, early Na current expression would be a characteristic of pioneer neurons generally rather than just Cajal-Retzius cells, suggesting that Na currents might play an early role either in the pioneer function of these cells or in their later death.

References

- Beckh S, Noda M, Lubbert H, Numa S (1989) Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J* 8:3611–3616.
- Chun JJ, Shatz CJ (1989a) The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. *J Neurosci* 9:1648–1667.
- Chun JJ, Shatz CJ (1989b) Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J Comp Neurol* 282:555–569.
- Chun JJ, Nakamura MJ, Shatz CJ (1987) Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. *Nature* 325:617–620.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146–6156.
- Del Rio JA, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* 5:13–21.
- Faure AV, Grunwald D, Moutin MJ, Hilly M, Mauger JP, Marty I, De Waard M, Villaz M, Albrieux M (2001) Developmental expression of the calcium release channels during early neurogenesis of the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 14:1613–1622.
- Fonseca M, Del Rio JA, Martínez A, Gomez S, Soriano E (1995) Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 361:177–192.
- Frotscher M (1998) Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8:570–575.
- Frotscher M, Seress L, Abraham H, Heimrich B (2001) Early generated Cajal-Retzius cells have different functions in cortical development. *Symp Soc Exp Biol* 53:43–49.
- Kim GJ, Shatz CJ, McConnell SK (1991) Morphology of pioneer and follower growth cones in the developing cerebral cortex. *J Neurobiol* 22:629–642.
- Kilb W, Luhmann HJ (2000) Characterization of a hyperpolarization-activated inward current in Cajal-Retzius cells in rat neonatal cortex. *J Neurophysiol* 84:1681–1691.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247–258.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881–7888.
- Lo Turco JJ, Kriegstein AR (1991) Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science* 252:563–566.
- Luskin MB, Shatz CJ (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* 5:1062–1075.
- Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64–71.
- McConnell SK (1995) Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15:761–768.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1994) Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex. *J Neurosci* 14:1892–1907.
- Menezes JR, Luskin MB (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci* 14:5399–5416.
- Meyer G, Soria JM, Martínez-Galan JR, Martín-Clemente B, Fairen A (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat. *J Comp Neurol* 397:493–518.
- Mienville JM, Barker JL (1997) Potassium current expression during prenatal corticogenesis in the rat. *Neuroscience* 81:163–172.
- Mienville JM, Pesold C (1999) Low resting potential and postnatal upregulation of NMDA receptors may cause Cajal-Retzius cell death. *J Neurosci* 19:1636–1646.
- Mienville JM, Lange GD, Barker JL (1994) Reciprocal expression of cell–cell coupling and voltage-dependent Na current during embryogenesis of rat telencephalon. *Brain Res* 77:89–95.
- Moody WJ, Bosma MM (1985) Hormone-induced loss of surface membrane during maturation of starfish oocytes: differential effects on potassium and calcium channels. *Dev Biol* 112:396–404.
- Ohmori H, Yoshii M (1977) Surface potential reflected in both gating and permeation mechanisms of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J Physiol (Lond)* 267:429–463.
- Picken-Bahrey HL, Moody WJ (2003a) Voltage-gated currents, dye and electrical coupling in the embryonic mouse neocortex. *Cereb Cortex* 13:239–251.
- Picken-Bahrey HL, Moody WJ (2003b) Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurophysiol* 89:1761–1773.
- Plummer NW, McBurney MW, Meisler MH (1997) Alternative splicing of the sodium channel *SCN8A* predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *J Biol Chem* 272:24008–24015.
- Radnikow G, Feldmeyer D, Lubke J (2002) Axonal projections, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-Retzius cells in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 22:6908–6819.
- Shatz CJ, Luskin MB (1986) The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat's primary visual cortex. *J Neurosci* 6:3655–3668.
- Soriano E, Del Rio JA, Martínez A, Super H (1994) Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J Comp Neurol* 342:571–595.
- Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA, Sotelo C (1997) Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18:563–577.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness Jr VS (1995) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15:6046–6057.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness Jr VS (1996) The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 16:6183–6196.
- Valverde F, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L (1995) Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cereb Cortex* 5:483–493.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996) Postnatal development of membrane properties of layer I neurons in rat neocortex. *J Neurosci* 16:1131–1139.

Deuxième partie : Etude de l'activité calcique spontanée et de sa synchronie dans le néocortex embryonnaire de souris

La technique du patch-clamp, dont la force est de pouvoir enregistrer une cellule unique, ne permet a contrario l'étude d'un grand nombre de cellules que dans des enregistrements successifs. La conception de sondes fluorescentes sensibles au calcium, par Tsien au début des années 1980, a permis de suivre simultanément la dynamique de ce second messager non métabolisable et non dégradable dans pratiquement toutes les cellules d'un champ d'observation (Tsien, 1980). Dans les neurones, la plupart des activités électriques - tant au niveau synaptique qu'au niveau des corps cellulaires - sont accompagnées de variations des concentrations de calcium intracellulaire. Dans les années 1990, la mise au point de techniques de « charge en masse » de tranches de cerveau a permis de suivre la dynamique des mouvements de calcium sur des populations entières de cellules (Yuste & Katz, 1991).

I. Mise au point d'un logiciel d'analyse

Nous avons utilisé l'imagerie calcique sur tranche afin de mettre en évidence une activité calcique précoce dans le cerveau en développement. Bien que très peu décrites, des activités calciques spontanées dans le néocortex avaient déjà été observées au stade E15 chez le rat (stade correspondant à l'apparition de la plaque corticale chez le rat) (Owens & Kriegstein, 1998) et E16 chez la souris (Corlew *et al.*, 2004). Nous avons cependant été confronté à un problème partagé par une très grande majorité d'expérimentateurs : l'analyse statistique des données d'imagerie calcique. En effet, il n'existe à ce jour aucune solution logicielle intégrée permettant d'analyser statistiquement et impartialement ces expériences. L'utilisateur est confronté à de nombreuses difficultés telles que la reconnaissance des cellules, tâche très longue à effectuer manuellement lorsqu'il s'agit de placer plusieurs centaines de ROIs (Regions Of Interest) et totalement partielle puisque les choix seront différents selon les utilisateurs. Ce biais de l'expérimentateur est retrouvé lors de la détection de pics de fluorescence. Enfin, lors des expériences sur tranche, il est assez fréquent d'avoir de légers mouvements du tissu, mais également des déplacements des cellules au sein du cortex, mouvements qui éliminent la possibilité d'analyser les images de façon statique. Face

à ces différents problèmes, nous avons entrepris la conception d'un logiciel réalisant l'identification automatique des cellules, leur suivi dynamique, et la détection des activités calciques afin de mettre en évidence les caractéristiques de cette activité de façon claire et rigoureuse.

Nous avons choisi le stade E14 car nous avons une base de comparaison dans la littérature avec les travaux de l'équipe d'Arnold Kriegstein (Owens & Kriegstein, 1998) qui pouvaient nous servir de référence d'autant qu'ils avaient été analysés manuellement.

Dans ces tranches de néocortex au stade E14, plus de 20% des cellules détectées présentent des activités calciques (moyenne 3,15 pic calcique / ROI / heure). Ces pics calciques présentent une faible amplitude (augmentation de 30 % de la fluorescence de base en moyenne) et durent environ 1 minute. De plus, ils présentent des caractéristiques différentes en fonction de la zone dans laquelle ils sont observés : les activités dans la CP sont plutôt des pics calciques, alors que dans la VZ elles présentent une morphologie en forme de vagues calciques.

Nous avons, dans un deuxième temps, cherché les mécanismes contrôlant ces activités. Des travaux précédents effectués dans le laboratoire avaient montré que les stocks calciques intracellulaires étaient fonctionnels dès E12 (Faure *et al.*, 2001). Nous avons montré néanmoins, qu'ils ne sont pas impliqués dans l'initiation de ces activités mais plutôt dans leur amplification, certainement par un processus de « calcium induced calcium release » (CICR). En revanche, l'absence du calcium du milieu extracellulaire bloque plus de 80 % des activités calciques spontanées, tant dans la CP que dans la VZ. Ce résultat implique donc que l'origine des activités observées est constituée majoritairement d'un influx calcique en provenance du milieu extracellulaire. Or, une dépolarisation des tranches par 50 mM de KCl entraîne une importante augmentation de calcium dans 74 % des cellules de la CP et dans 46 % des cellules de la VZ. Classiquement cet effet implique les canaux calciques dépendants du voltage. Cependant, ces canaux sont exprimés uniquement dans la VZ à E14 et à un niveau faible (Picken Bahrey & Moody, 2003 ; Albriex *et al.*, 2004). De plus, ces activités calciques spontanées ne sont pas inhibées en présence de 200 μM de Ni^{2+} , inhibiteur classique des canaux calciques à haut-seuil et bas-seuil d'activation à cette concentration (Aguilo *et al.*, 1999). Ceci démontre que les canaux calciques ne sont pas impliqués dans cette activité calcique spontanée.

L'équipe de Rafaël Yuste a démontré l'existence de réseaux au sein de la couche I à P0 (Schwartz *et al.*, 1998). Nous avons voulu savoir si ces communications pouvaient exister plus précocement. Nous avons donc recherché l'existence de réseaux de cellules actives de façon synchrone. Comme il n'est pas possible d'effectuer ce type de recherche manuellement, nous avons programmé des simulations - dites de Monte Carlo - de ces activités afin d'en déterminer le degré d'organisation. Nous avons pour cela comparé les activités calciques de ces cellules à des séquences simulées, basées sur le même nombre de cellules et le même niveau d'activité par cellule que ce que nous observions dans nos enregistrements. Cette étude a permis de démontrer la présence d'activités significativement synchrones dans 6 tranches sur 10. Ces synchronies révèlent l'existence de réseaux de co-activations au sein de la CP, au sein de la VZ, mais aussi entre ces deux zones dans 40 % des cas. Nous avons par la suite recherché si certaines cellules du néocortex contrôlaient l'activité des autres cellules en jouant un rôle de "pacemaker". Dans 3 expériences sur 17 nous avons pu identifier de telles cellules, localisées le plus souvent dans la VZ et qui présentent des co-activations significatives avec plus de 15 cellules différentes durant un enregistrement de 10 minutes.

L'utilisation de notre logiciel nous a donc permis d'analyser statistiquement, de manière non biaisée, des activités calciques spontanées au stade E14 (résultats résumés Figure 25). Ces activités ont des profils différents entre la VZ et la CP. Elles dépendent majoritairement d'un influx de calcium extracellulaire dans la cellule. Cette entrée ne passe pas par les canaux calciques dépendants du voltage. A ce stade, les synapses ne sont pas encore formées. Nous avons néanmoins pu observer l'établissement d'activités synchrones au sein de ce néocortex, ce qui nous permet d'émettre les premières hypothèses concernant l'existence de communications paracrines entre les cellules. Nous avons également mis en évidence à ces stades précoces, la présence de cellules organisatrices capables d'activer un grand nombre d'autres cellules.

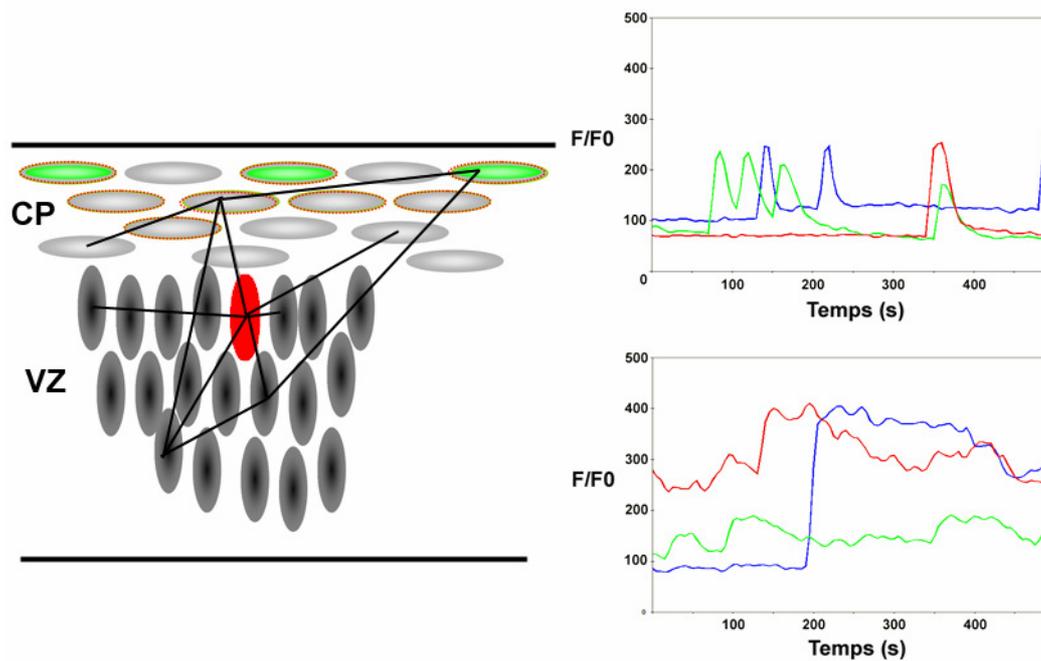


Figure 25: Les activités calciques spontanées au stade E14.

Les activités calciques spontanées au stade E14 ont des profils différents entre les cellules de la CP (de type pic calcique) et celle de la VZ (de type vague calcique). Ces activités calciques spontanées dépendent majoritairement du calcium extracellulaire et peuvent être synchrones sous la direction de cellules organisatrices (représentée en rouge).

Synchronous calcium activity measured in embryonic mouse cortical slices with CalSignal, a new software for automatic detection and quantification of fluorescence signals

Jean-Claude Platel, Alain Dupuis, Sylvie Boisseau, Michel Villaz, Mireille Albrieux and Jacques Brocard*

Laboratoire CIS, INSERM EMI-9931, CEA Grenoble, Université Joseph Fourier, France

ABSTRACT

In the presence of a fluorescent calcium indicator, spontaneous calcium activity can be reported in E14 cortical slices, as intensity fluorescence variations. Current methods to detect and quantify these variations depend heavily on the experimenter whose judgement may interfere with measurement. In the present work, we set conditions and developed a new software, called *CalSignal*, for automatic detection of cells, movement wedging and quantification of spontaneous activity on time-series of confocal fluorescence images. First, regions of interest (ROIs) were automatically drawn over intense objects larger than a set area. Secondly, local environment deformations were calculated and accounted for in ROI displacement to follow object movements. Finally, fluorescence variations analysis was performed within each ROI as peak counting and measurement of peak parameters (frequency, amplitude, duration). Using the procedure as described, we first confirmed heterogeneity within E14 cortical slices regarding voltage-gated ion channels activity. Moreover, we demonstrated that spontaneous calcium activity relied mainly on external calcium - and to a less extent on calcium stores - but was not changed in the presence of voltage-gated calcium channels inhibitors. Finally, *CalSignal* was used to demonstrate that spontaneous calcium activity is organized in synchronous networks at E14. Interestingly, we identified highly synchronized nodal cells located in the proliferative area that could orchestrate this activity.

Key words: fluorescent probe; KCl-induced depolarization; calcium channels inhibitors; thapsigargin; network connectivity; spontaneous activity

INTRODUCTION

Neurons in the cerebral cortex are generated in a proliferative region known as ventricular zone (VZ), which lines the lateral ventricle of each telencephalic hemisphere (McConnell, 1995). Neurogenesis in the dorsomedial mouse neocortex occurs between embryonic days (E) 11 and E17 (Takahashi *et al.*, 1995). Calcium is a ubiquitous second messenger that has been implicated in the regulation of a variety of events in developing neurons, including differentiation (for review see Spitzer *et al.*, 2000), migration (Komuro & Rakic, 1992; Komuro & Rakic, 1996) and circuit formation (Mao *et al.*, 2001).

Since the first observations of spontaneous calcium activity in immature postmigratory neurons (Yuste *et al.*, 1992; Owens & Kriegstein, 1998; Owens *et al.*, 2000), much studies have been aimed at understanding its role in neocortex development (Haydar *et al.*, 2000; Weissman *et al.*, 2004). However, most of them were based on manual analysis with qualitative but no quantitative results, thereby reducing their concluding impact. Froemke *et al.* have developed a software in order to analyze cell synchrony but cell detection was performed manually, thereby introducing an important bias in cellular activity (Froemke *et al.*, 2002). Moreover, manual detection is not appropriate when cortical slices move in the observation field, e. g. slow drifting due to continuous perfusion.

Automatic quantification of fluorescence activity must be based on set criteria in order to consistently detect peaks in previously identified regions of interest (ROIs). In the present work, we developed a software, called *CalSignal*, capable of automatically 1. performing object detection, 2. wedging object movements, 3. detecting fluorescence intensity peaks 4. calculating average peak parameters such as frequency, amplitude and duration and 5. presenting all the results in a unique convenient multi-sheet table. We were particularly careful about limiting the user's input in choosing the ROIs and the biological events, i. e. the remarkable characteristics of a given signal that are to be quantified. After proper calibration, we illustrated the relevance of this software by studying the role of various channels in spontaneous calcium activity. Interestingly, we showed that external calcium, but not calcium stores, is essential for spontaneous activity in E14 mouse cortical slices. Moreover, we report that spontaneous calcium activity is organized in synchronous networks containing highly connected nodal cells at stage E14, i. e. before synaptogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Tissue preparation

Timed-mated C57/Bl6 mice (Iffa Credo, Lyon, France) were euthanized in a CO₂ chamber on gestational day E14. Pups were removed from the uterus and the brains dissected out in ice-cold artificial cerebral spinal fluid (ACSF) which contained (in mM) : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃, 11 D-Glucose, continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂ to yield a pH of 7.4. ACSF + KCl solution contained 40 instead of 2.5 mM KCl and 81.5 instead of 119 mM NaCl and was typically perfused for 5 minutes. Brains were embedded in 4% low temperature gelling agarose (Sigma) at 28 °C and placed on ice. After the agarose solidified, 300 µm thick coronal slices of the forebrain were cut in cold ACSF with a Vibratome VT1000S (Leica).

Calcium imaging

Slices were loaded with the calcium indicator dye Fluo-4 by bath application for 60 – 90 minutes at room temperature in ACSF containing 5 µM Fluo-4 AM (Molecular Probes), 0.005% Pluronic acid F-127 (Molecular Probes) and 0.1% DMSO (Sigma). The loading chamber was continuously oxygenated with 95%O₂/5%CO₂. Slices were then placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95%O₂/5%CO₂) at room temperature on the stage of an upright compound microscope (Eclipse 600 FN, Nikon) equipped with a water immersion 40x objective (numerical aperture 0.8) and a confocal head (PCM 2000, Nikon). Drugs were perfused in the bath by a multi-valve process (VC-6M, Harvard Apparatus, Holliston, MA). The neocortex part of the slices was stimulated with a 488 nm wavelength light from an argon laser and emission was filtered using a 515 ± 15 nm filter. Image acquisition was performed with the EZ 2000 software (Nikon) in 12-bit encoded format (fluorescence intensity set between 0 and 4095). Using the described device, the delay between two typical stacks of three 15 µm-spaced z plans of images smaller than 512 x 512 pixels was 3 to 4 seconds.

CalSignal software parameters

The *CalSignal* software code can be obtained upon request at jcplatel@free.fr ; in brief, it performs as described in the *Results* section of this article when using the following parameters :

Automatic object detection

Automatic object detection uses a decreasing detection threshold based on the highest fluorescence intensity value (I_{\max}). It varies between 95% I_{\max} (3890) and 15% I_{\max} (614) by steps of 0,2% I_{\max} (8). The saturation threshold corresponds to 95% I_{\max} (3890) as well.

Local environment

In our experiments, with magnification as described, square ROIs of 7 x 7 pixels fitted most cellular bodies. Local environments are squares of 47 x 47 pixels centered on each ROI that cover an area 45 times larger than that of the ROI itself. In most cases, local movement vectors were searched over 1 pixel deep. In experiments where large movements of the slice were detected – more than 100 pixels from start to end - the search extended over up to 15 pixels deep. This was easily achieved by changing the corresponding parameter in the user-friendly graphical interface we designed.

Activity analysis

The threshold used to detect activity on plotted F / F_0 curves was chosen during a calibration step as 0,37 % I_{\max} (15) which is the smallest signal variation consistently detected by eye.

After peak detection, the main parameters were calculated and summarized in Microsoft Excel sheets from which global analysis was performed (data compiling, statistical tests, etc).

Statistics and Monte Carlo simulations

Parametric and non-parametric t -tests were performed using a trial version of *GraphPad Prism 4* from GraphPad Software (USA).

Based on raster plots of fluorescence peaks, χ^2 contingency tables were used by *CalSignal* to calculate concomitant activations of cells within cortical slices; only highly significant coactivations ($p < 0.001$) were kept for further analysis. A tolerance parameter t was later introduced : fluorescence peaks separated by t images were also counted as concomitant, with t varying from 1 to 5.

Monte Carlo simulations were used to show that spontaneous activity were significantly more synchronous than expected by chance : 1000 simulations of each cortical slice, using the same number of active ROIs, number of fluorescence peaks and time were performed and the number of simulations displaying more coactivations than the real data constituted the statistical test p_{MC} . Significant network synchrony was established when p_{MC} was inferior to 5 %.

Similar Monte Carlo simulations were used to show that active ROIs in cortical slices were fewer than expected by chance : 1000 simulations of each cortical slice, using the same number of ROIs, number of fluorescence peaks and time were performed and the number of simulations displaying less active ROIs than the real data constituted the statistical test p . Significant cellular heterogeneity was established when p was inferior to 5 %.

Finally, nodal cells connected with more cells than expected by chance were identified using Monte Carlo simulations of significantly synchronous networks : 1000 simulations of each synchronous network using the same number of active ROIs, number of significant coactivations and time were performed and the number of simulations displaying cells more connected than the real data constituted the statistical test p . Significant nodal cells were established when p was inferior to 5 %.

RESULTS

Embryonic mouse cortical slices loaded with a fluorescent calcium indicator - such as Fluo-4 - are known to display spontaneous intracellular calcium activity from E14 and later (Owens & Kriegstein, 1998). This calcium activity may be measured by manually drawing regions of interest (ROIs) over active cells and counting peaks of fluorescence within. It may also be compared to activity recorded in the presence of calcium route agonists/antagonists in order to identify the main mechanism responsible for the observed spontaneous calcium variations. However, it is known that such manual counting is biased towards ROIs displaying intense activity. Moreover, artefactual movements of the slices in the recording chamber preclude analysis. Finally, results of human analysis may depend on the observer and his/her mindset as well (MacLeod & Byrne, 1996). To further prove such an influence on observations of fluorescence variations, all the authors (JCP, AD, SB, MV, MA, JB) performed the task described above on 3 series of time-lapse images (see *Experimental Procedures* and below) corresponding to 5 to 12 minutes of recorded spontaneous calcium activity displaying no artefactual movements (Fig. 1 and Supplemental data 1). Depending on the authors, the number of ROIs drawn was highly variable (from 117 to 223 in the example above), and the number of detected peaks even more (between 19 and 193, Fig. 1). Moreover, the percentages of active ROIs was often high (> 20 %) as well as the number of fluorescence peaks per ROI (Fig. 1). This test confirmed that human analysis introduced a bias in the detection of fluorescence variations and should be used cautiously when comparing results from different experiments and/or laboratories. Moreover, it prompted us to design *CalSignal*,

a new software for automatic detection and quantification of fluorescence signals. It was used to consistently analyze the fluorescence signal from series of time-lapse images corresponding to serial z views of acute cortex slices obtained from an upright confocal microscope (see *Experimental Procedures*). Images were in a 12-bit encoded raw *.tif* format, meaning that the fluorescence intensities were set between 0 and 4095 (I_{\max}). Because there was a 15- μm spacing between the z views of the same slice, there was no overlap of the signal and *CalSignal* compiled them into a new image file where the intensity of each pixel equaled the maximum intensity of the corresponding pixel throughout the z axis (Fig. 2A).

Automatic object detection

The software first performed automatic object detection on an average of the first ten images of the series to account for spontaneous fluorescence variations. The same was done throughout the series to make sure no active cell was left behind. During successive rounds, the contiguous pixels brighter than a detection threshold were detected and potentially part of an object. Considering the magnification and the properties of the tissue used in this study, a region of interest of fixed size was drawn over objects likely to be cellular bodies, i. e. whose continuous area exceeded 50 pixels (see *Experimental Procedures*). The center of the ROIs corresponded to the composed center of the detected objects (Fig. 2B). During subsequent rounds, the detection threshold was lowered to detect less bright objects. During the course of detection, new ROIs potentially overlapping previously drawn ones were automatically deleted in order to avoid the presence of more than one ROI over the same cell. When the detection threshold reached an arbitrary bottom level, the process stopped and tens of ROIs had been drawn (Fig. 2C). On the previously described test files, *CalSignal* detected 81 ROIs, far below what the authors had manually measured (Fig. 1). Visual inspection of automatically drawn ROIs on the test series described above led to the detection of only a small percentage (between 0 and 6 %) of misplaced ROIs, usually due to the presence of intensely fluorescent processes or many brightly labeled cells in close neighborhood. Further, adjusting the detection bottom value to each file's background did not change the results obtained on the test series (data not show). As a result, the software used a set value based on mean background levels for further analysis. Note that because of low starting fluorescence intensities, it happened once that the number of detected objects was very low (namely < 20 ROIs); the corresponding file was discarded before further analysis.

On a larger panel of experiments, 143.1 ± 14.9 ROIs (average \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices) were drawn as described using *CalSignal*. Because we were interested in

cells showing calcium dynamics, we added a feature to *CalSignal* to automatically discard cells whose fluorescence signal was obviously saturated i.e. ROIs in which more than half of the pixel intensity values were over 95% I_{\max} (Fig. 2D, yellow arrow heads). Following this procedure, a small number of ROIs per slice was discarded before further analysis i.e. 3.2 ± 0.9 (average \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices).

Local movement tracking

Acute cortex slices were living tissue and thereby often displayed spontaneous local deformations; moreover, they occasionally moved in the observed field since they were submitted to continuous perfusion while they did not adhere to the bottom of the chamber. Hence, it was not possible to record cell fluorescence with fixed ROIs throughout whole experiments. We had to design a way, either to recalculate each image so that their global movement was nil, or to track all the cells and make the corresponding ROIs move along. However, neither technique was applicable: on the one hand, slices displayed local deformations that would not be taken into account when repositioning whole images based on global movement vectors, on the other hand slices displayed hundreds of very close cells with variable fluorescence intensities that made it very difficult to find general criteria to follow specific objects throughout series of images. Actually, trials using either of these approaches, although partially successful, proved inefficient for rapid displacements upon visual inspection of the resulting correction (data not shown). Hence, we decided to combine both approaches to measure a local movement vector between each couple of images and use it further to displace each ROI (Fig. 3).

Local movement vectors were calculated for local environments centered on each ROI and ~ 45 times larger (Fig. 3A, white frame). Movement detection was achieved via calculating the best fit of intensity differences between reference (Fig. 3B, image 1) and moving images (Fig. 3B, image 3). The principle of the calculation is described with reduced matrices (Fig. 3B, matrix 1 and matrix 3) in Fig. 3C. Pixel intensities were first normalized by the mean fluorescence intensity of the corresponding local environment before being subtracted because of potentially interfering global intensity changes. The direction of the movement vectors (Fig. 3C, down and left) was indicated by the position of the smallest sum of normalized intensity differences (absolute values, Σ_{abs}). Local movement vectors were then used to displace the ROIs accordingly, so that each of them followed exactly the movement of each object [e. g. the ROI on image 1 (red) has been moved 1 pixel down and left on image 3 (green); Fig. 3D]. Defining the local environment was a critical step of this process: when it

was too large, local movement vectors could not pick up local deformations and ROIs were rather static; when it was too small, local movement vectors were never null and made the ROI 'shiver' around the object because of stochastic variations in pixel intensities. For the same reason, ROIs drawn around less bright objects or corresponding to objects that dimmed during the experiment, moved randomly since the intensity differences were no longer significant. For obvious reasons, we needed to discard such ROIs to avoid measuring artifact fluorescence variations. The total distance covered by all the ROIs over a whole experiment was averaged and the 1% ROIs displaying a movement over the mean + 2.6 standard deviations were removed (Fig. 3E, pink arrow heads). After movement tracking, a small number of ROIs per slice – often corresponding to ROIs misplaced during automatic object detection - was discarded before further analysis i.e. 2.0 ± 0.5 (average \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices). Finally, visual comparison of moved ROIs to the final images of the test series described above led to the detection of only a small percentage (between 0 and 2 %) of misplaced moved ROIs, usually due to the dimming of the cellular body initially detected (data not shown). Eventually, the final number of ROIs kept for further analysis was 137.8 ± 14.5 ROIs (average \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices)

Fluorescence variations analysis

Once the ROIs were adjusted to track previously detected objects, the fluorescence signal within each ROI was analyzed (fig. 4). First, the mean intensity of all the ROIs was plotted over time and the parameters of a corresponding linear regression curve were used to calculate F_0 at each time point (Fig. 4A). This dynamic value was further used to normalize the detected signal averaged over two images, thereby leading to profiles that were not dramatically different from the crude data (Fig. 4, compare panels B and C). Note that F_0 was extrapolated from previously calculated regression curve parameters after a KCl-mediated depolarization was induced in the slice (Fig. 4A, > 300 sec). Indeed, dramatic fluorescence increase induced by depolarization in most cells prevented the calculation of a reliable dynamic F_0 in these circumstances.

Fed with the calculated F/F_0 ratios, *CalSignal* could detect peaks as a significant and continuous signal increase larger than a fixed threshold followed by a significant and continuous signal decrease larger than the same threshold. This arbitrary threshold was chosen during a calibration step as the smallest signal variation consistently detected by eye (see *Experimental Procedures*). Hence, it was always possible to double-check the results obtained with the automatic procedure (see horizontal bars on Fig. 4C). On the test series

described above, the number of detected peaks per ROIs was smaller than that detected by eye ; consistently, the percentage of active ROIs was smaller as well (Fig. 1 and data not shown). The whole procedure lasted less than a minute and could be repeated at will while the authors needed between 10 and 15 minutes per file and showed signs of tiredness after analyzing time-series of images for more than an hour.

On a larger panel of experiments, an average 43.8 ± 7.2 peaks were detected per experiment, corresponding to 21.0 ± 2.2 % active ROIs with a mean 1.54 ± 0.07 peak / active ROI (averages \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices). However, these values varied with the duration of the experiments; we therefore calculated an index of spontaneous activity independent of time as the overall number of peaks divided by the total number of ROIs, per hour (Fig. 4E), with a mean value of 3.15 ± 0.36 per slice (average \pm S.E.M., $n = 28$ independent slices).

We also programed *CalSignal* to compile the main characteristics of the peaks such as (i) their amplitude - difference between the highest and the lowest ratio of the peak – (ii) their duration - time between the lowest point of the fluorescence increase starting the peak and the lowest point of the fluorescence decrease ending it - and (iii) their area under the curve - sum of ratio differences between each point of the peak and its lowest point, expressed as arbitrary units (see Fig. 4D). Because there was more variability in the peak characteristics between cells than within (data not shown), they were averaged for each ROI and data from 773 ROIs were compiled throughout the 28 independent slices. Thanks to this feature, it became obvious that the majority of the peaks was of modest increase and extended over more than 1 minute, with large areas under the curve (Table I). These characteristics precluded the detection of most of the signals by eye and reinforced the usefulness of automatic peak counting.

Detection of different calcium signals in cortical plate/marginal zone and ventricular/intermediary zone cells upon KCl-mediated depolarization

In order to calibrate our software with a biologically meaningful stimulation, we first quantified Fluo-4 fluorescence intensity changes induced by a KCl-mediated depolarization in E14 embryonic slices. At this stage, a number of cortical plate/marginal zone (CP/MZ) cells already express voltage-gated ion channels whereas ventricular/intermediary zone (VZ/IZ) cells are only a few (Bahrey & Moody, 2003). Since membrane depolarization induced the non-selective opening of voltage-gated ion channels, KCl-treated CP/MZ cells displayed large calcium variations while VZ/IZ cells did not (Fig. 4F, compare left and right panels).

According to Tuj1 immunostainings (Faure *et al.*, 2001 and data not shown), a line drawn between the upper third and the bottom two thirds of the slice approximately separates the two types of cells. When such a border was manually drawn and automatic object detection performed in the two territories, twice as much ROIs were detected in the bottom two thirds as compared to the upper third of the slices, as expected (data not shown). Interestingly, *CalSignal* also revealed that significantly more CP/MZ cells responded with a fluorescence intensity peak than VZ/IZ cells upon KCl-treatment ($74.5 \pm 10.1\%$ vs $35.8 \pm 9.9\%$, averages \pm S.E.M., $n = 4$, $p < 0.05$, Fig. 4G) and with a higher magnitude ($100.8 \pm 6.8\%$ vs $46.6 \pm 3.0\%$ fluorescence increases, averages \pm S.E.M., $n = 135$ and 187 ROIs respectively, $p < 0.001$, data not shown). Comparing spontaneous activity peak parameters between CP/MZ and VZ/IZ cells also revealed significant differences in amplitude and duration – and consequently in area under curve – demonstrating that the shape of calcium activity in the CP/MZ was slightly sharper than that observed in the VZ/IZ (Table I). Interestingly, no other significant differences were reported between the two territories when comparing percentages of active ROIs, number of fluorescence peaks per active ROI or spontaneous activity indexes (data not shown). Taken together, these results indicated that our software was properly calibrated and could be used to automatically measure and quantify calcium activity in embryonic cortical slices. Moreover, the measurements performed were so accurate as to detect slight differences in peak parameters, even when gross spontaneous activity characteristics were not changed.

Spontaneous calcium activity is inhibited in the absence of external calcium but not in the presence of calcium channels or calcium stores inhibitors

Based on the spontaneous activity index calculated for each series of images, it was possible to measure the effect of an antagonist on spontaneous activity between a control period 1 and a treated period 2 over the same cortical slice (Fig. 5A). Sham-treated slices were further taken as the control : they displayed a slight activity decrease versus control ($76.0\% \pm 10.8\%$, average \pm S.E.M., $n = 7$ independent slices), probably due to photobleaching of the fluorescent dye (Tsien, 1988). In the same conditions, $200\ \mu\text{M}$ Ni^{2+} (a broad-range potent voltage-gated calcium channels inhibitor at the above concentration) induced no further decrease, as expected since calcium channels are not yet expressed in mouse neocortex at E14 (Bahrey & Moody, 2003). Thapsigargin (a Ca^{2+} -ATPase blocker known to deplete endoplasmic reticulum calcium stores) $1\ \mu\text{M}$ did not significantly alter spontaneous activity either (Fig. 5B) although functional calcium stores have been described

at this stage (Faure et al., 2001). In contrast, removing external calcium (Fig. 5B, $0Ca^{2+}$) dramatically reduced spontaneous activity compared to sham-treated slices ($16.6\% \pm 4.9\%$, average \pm S.E.M., $n = 5$, $p < 0.01$) indicating that, at E14, spontaneous calcium activity mainly depended on calcium influx. Finally, there was no significant difference in the results presented above when analysis was performed separately with CP/MZ cells or VZ/IZ cells.

Although spontaneous activity indexes were similar in cells treated with various antagonists, peak characteristics could be affected. They were automatically evaluated in the presence of Ni^{2+} or thapsigargin but not in the absence of external Ca^{2+} since the remaining activity was weak and probably not significant (table II). In the presence of thapsigargin, the duration of the fluorescence increases was significantly shorter than that of spontaneous activity measured in sham conditions (Table II). In contrast, calcium peaks extended over greater periods of time in the presence of Ni^{2+} as compared to sham-treated slices. These data were confirmed when measuring the areas under curve in the presence of thapsigargin, but not in the presence of Ni^{2+} (Table II). Moreover, measurements made separately on VZ/IZ cells confirmed that they displayed shorter calcium peaks and smaller areas under curve in the presence of thapsigargin but no significant change was observed in the presence of Ni^{2+} (data not shown). Thus, automatically measured peak parameters using *CalSignal* revealed subtle changes in the presence of thapsigargin that were not detected when measuring global characteristics of spontaneous calcium activity.

Network synchrony of spontaneous calcium activity

During postnatal mouse neurogenesis, networks of synchronous spontaneous calcium activity have been described and interpreted as a critical parameter for brain patterning (Yuste et al., 1992 Schwartz et al., 1998). However, no data on synchrony was available before this stage although spontaneous activity was observed, mainly because it was mostly considered autonomous (Mao et al., 2001). We therefore implemented an additional feature in *CalSignal* to measure the degree of synchrony between active cells in E14 whole slice preparations (Fig. 6). First, it was obvious on a raster plot of fluorescence intensity peaks that pairs of cells underwent concomitant activation (Fig. 6B, e. g. ROIs #23 and #24). Because it was not clear that such coactivations occurred randomly or in an organized manner, we established the network of significant synchronous coactivations using χ^2 contingency tables ($p < 0.001$, see Experimental Procedures; fig. 6C). In 24 out of 28 slices, between 1 and 186 significant coactivations were detected (data not shown); however, since a small percentage of coactivations may have occurred by chance over the large number of interactions tested, it

seemed necessary to test the network synchrony as a whole. *CalSignal* was programmed to perform random simulations of the network based on the observed percentages of active ROIs and number of peaks per active ROI (1000 Monte Carlo simulations, see *Experimental Procedures*). For each experiment, a p value (p_{MC}) was calculated from the number of random simulations displaying more network synchrony than the observed set of data (Fig. 6C and D).

Following this procedure, 9 slices out of 28 exhibited significant network synchrony ($p_{MC} < 0.05$; data not shown). Further, we reflected that our definition of concomitant activation may be ambiguous since (i) taking a new image every 3 to 4 seconds did not allow the accurate location of the beginning of fluorescence peaks and (ii) propagation of calcium activity between two cells could need more than 3 to 4 seconds. Thus, we introduced a tolerance parameter t to recalculate significant coactivations in our slices : cells whose fluorescence peaks beginning were t images apart were now considered synchronous (Fig. 6E). In accordance, the number of significant coactivations per active ROI increased with the tolerance, but the number of significantly synchronous networks did not. In contrast, it increased between 0 and 1 image of tolerance and stayed stable when the t was further increased (Fig. 6E). This observation demonstrated that spontaneous calcium activity observed in E14 mouse cortical slices needed more than 4 seconds and probably less than 12 to spread over the entire networks of related cells. Hence, the results obtained with a 1-image tolerance seemed the more reliable and studies were pursued using this set of data : 17 slices out of 28 displayed significant network synchrony, with 1.52 ± 0.27 significant coactivations per active ROI and 15.7 ± 3.7 % isolated cells i. e. cells whose activity was not synchronous with any other active cell (averages \pm S.E.M., $n = 17$ independent slices, data not shown). Mean distances between active ROIs or all pairs of ROIs were measured and showed that active cells were within significantly closer vicinity than the rest of the cells (111.7 ± 5.2 μm vs 127.8 ± 3.1 μm ; averages \pm S.E.M., $n = 17$ independent slices, $p < 0.01$). In contrast, the distribution of active ROIs involved in significant coactivations - between CP/MZ and VZ/IZ - was not different from random (Fig. 6F).

Nodal cells within heterogenous synchronous networks

From our preliminary experiments using *CalSignal*, we were surprised to find that only 1 out of 5 ROIs were active, often more than once, while 4 out of 5 were not active during the time course of the recording. When simulating the distribution of fluorescence peaks within ROIs, we determine that 1 out of 2 cortical slices exhibited a significantly smaller number of active ROIs than expected if distribution was random ($p < 0.05$, $n = 28$

independent slices; 1000 Monte Carlo simulations, see *Experimental Procedures*). This result indicated that spontaneous calcium activity seemed concentrated in a small number of cells. We therefore hypothesized the existence of such ‘nodal’ cells within synchronous networks as well, that would exhibit significant coactivations with more ‘partner’ cells than random. We used CalSignal to perform 1000 Monte Carlo simulations of each of the 17 synchronous networks described above and identified 3 slices containing a total 6 nodal cells corresponding to the above definition (Fig. 7). Interestingly, these cells seemed preferentially located in the VZ/IZ (Fig. 7A and B). To confirm this observation, we increased the tolerance parameter t – thereby increasing the number of significant coactivations as described above – and detected more nodal cells within synchronous networks (Fig. 7C). This result was particularly interesting since increasing the tolerance from 1 to 5 did not change the number of cortical slices displaying significantly synchronous network (Fig. 6E) but revealed that spontaneous calcium activity in 11 out of 18 was potentially organized around nodal cells (Fig. 7C). Finally, the location of nodal cells within subterritories of cortical slices was collected and confirmed that they were preferentially located in the VZ/IZ as compared to the CP/MZ, although not significantly (Fig. 7D).

DISCUSSION

In the present work, we developed a software, capable of automatically performing object detection, wedging object movements, detecting fluorescence intensity peaks, calculating average peak parameters and presenting all the results in a unique convenient multi-sheet table. We then studied the role of various channels in spontaneous calcium activity. We showed that external calcium, but not calcium stores, is essential for spontaneous activity in E14 mouse cortical slices. Moreover, we reported that spontaneous calcium activity is organized in synchronous networks containing highly connected nodal cells at stage E14, i. e. before synaptogenesis.

Actually, a common feature of human detection throughout the examples was a strong tendency to draw ROIs over active cells. The use of our software may be closer to reality since there is not bias towards active cells using this automatic procedure. Nevertheless, this indicates that there is a limited population of spontaneously active cells within neocortex slices, with a time constant of activation much shorter than 5 minutes (see below). These results are consistent with those obtained by Kriegstein who selected the ROIs manually at the same stage in the rat (Owens & Kriegstein, 1998).

Statistical analysis of peak characteristic showed us significant differences between CP/MZ and VZ/IZ areas under the curve. This can be explained by the neuronal differentiation and the expression of many neurotransmitter receptors in the neuronal cells. Interestingly, thapsigargin slightly shortened the duration of the peaks, indicating that intracellular calcium stores could be involved in shaping the spontaneous calcium influx, as observed in other systems (for review see Parekh, 2003 and references therein).

Yuste reported the presence of synchronous activity in postnatal layer I (Schwartz *et al.*, 1998). On stage E14 –i.e. before synaptogenesis- we discovered the existence of such synchronicity. We also demonstrated the presence of nodal cells that can control this activity. The identity of those cells is still unknown. Nevertheless, it was reported that radial glia can participate in calcium signaling (Weissman *et al.*, 2004), and their process cross the entire neocortical wall. Therefore, we have to confirm that this cell can be the nodal cell and that they can control activity of neocortical cells.

In this paper, we described a new software called *CalSignal* that achieved to perform unbiased automatic detection of cells, ROI drawing, removal of saturated and dim cells, object movement wedging, spontaneous activity detection and measurement of peak parameters. The first results obtained with *CalSignal*, confirmed that in E14 mouse cortical slices, cells from the cortical plate or from the ventricular/intermediary zone had different properties regarding ion fluxes. Further, we showed that spontaneous calcium activity depended on calcium influx from outside the cell whereas no known calcium channels – neither voltage-gated calcium channels, nor endoplasmic reticulum calcium channels – seemed to be involved. Actually, we have other data indicating that sodium influx - detected at earlier stages in neuronal cells (Albrieux *et al.*, 2004) - could be responsible for spontaneous calcium activity (unpublished observations). In any case, we believe the type of method we developed will participate in increasing the significance and reliability of the results reported and the robustness of the corresponding conclusions.

References

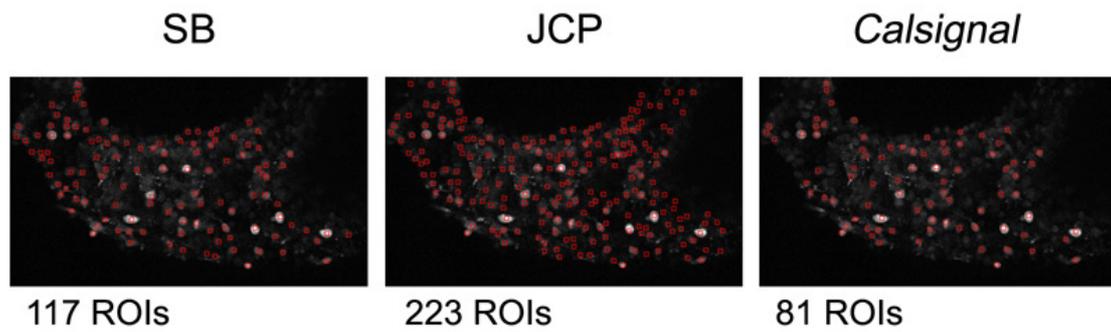
- Albrieux, M., J. C. Platel, A. Dupuis, M. Villaz et W. J. Moody (2004). "Early expression of sodium channel transcripts and sodium current by cajal-retzius cells in the preplate of the embryonic mouse neocortex." *J Neurosci* **24**(7): 1719-25.
- Bahrey, H. L. et W. J. Moody (2003). "Voltage-gated Currents, Dye and Electrical Coupling in the Embryonic Mouse Neocortex." *Cereb Cortex* **13**(3): 239-51.
- Faure, A. V., D. Grunwald, M. J. Moutin, M. Hilly, J. P. Mauger, I. Marty, M. De Waard, M. Villaz et M. Albrieux (2001). "Developmental expression of the calcium release channels during early neurogenesis of the mouse cerebral cortex." *Eur J Neurosci* **14**(10): 1613-22.
- Froemke, R. C., V. S. Kumar, P. Czkwianianc et R. Yuste (2002). "Analysis of multineuronal activation patterns from calcium-imaging experiments in brain slices." *Trends Cardiovasc Med* **12**(6): 247-52.
- Haydar, T. F., F. Wang, M. L. Schwartz et P. Rakic (2000). "Differential Modulation of Proliferation in the Neocortical Ventricular and Subventricular Zones." *J Neurosci* **20**(15): 5764-5774.
- Komuro, H. et P. Rakic (1992). "Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration." *Science* **257**(5071): 806-9.
- Komuro, H. et P. Rakic (1996). "Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration." *Neuron* **17**(2): 275-85.
- MacLeod, A. K. et A. Byrne (1996). "Anxiety, depression, and the anticipation of future positive and negative experiences." *J Abnorm Psychol* **105**(2): 286-9.
- Mao, B. Q., F. Hamzei-Sichani, D. Aronov, R. C. Froemke et R. Yuste (2001). "Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices." *Neuron* **32**(5): 883-98.
- McConnell, S. K. (1995). "Plasticity and commitment in the developing cerebral cortex." *Progress in Brain Research* **105**: 129-43.
- Owens, D. F., A. C. Flint, R. S. Dammerman et A. R. Kriegstein (2000). "Calcium dynamics of neocortical ventricular zone cells." *Dev Neurosci* **22**(1-2): 25-33.
- Owens, D. F. et A. R. Kriegstein (1998). "Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone." *Journal of Neuroscience* **18**(14): 5374-88.
- Schwartz, T. H., D. Rabinowitz, V. Unni, V. S. Kumar, D. K. Smetters, A. Tsiola et R. Yuste (1998). "Networks of coactive neurons in developing layer 1." *Neuron* **20**(3): 541-52.
- Spitzer, N. C., N. J. Lautermilch, R. D. Smith et T. M. Gomez (2000). "Coding of neuronal differentiation by calcium transients." *Bioessays* **22**(9): 811-7.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski et V. S. Caviness, Jr. (1995). "The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall." *Journal of Neuroscience* **15**(9): 6046-57.
- Weissman, T. A., P. A. Riquelme, L. Ivic, A. C. Flint et A. R. Kriegstein (2004). "Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex." *Neuron* **43**(5): 647-61.
- Yuste, R., A. Peinado et L. C. Katz (1992). "Neuronal domains in developing neocortex." *Science* **257**(5070): 665-9.

Spontaneous activity	Whole slices, $n = 773$	CP/MZ, $n = 257$	VZ/IZ, $n = 516$
Amplitude (% F/F0 increase)	32.3 ± 0.6	30.0 ± 0.9	$33.5 \pm 0.8^{**}$
Duration (sec)	74.0 ± 1.9	70.3 ± 3.5	$75.8 \pm 2.2^{***}$
Area Under Curve	1644 ± 68	1501 ± 136	$1728 \pm 76^{***}$

Table I : Main parameters of automatically detected peaks of spontaneous activity in whole cortical slices or separately in the CP/MZ or VZ/IZ cells. **, *** significantly different from CP/MZ in a non-parametric Mann-Whitney's t-test, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Spontaneous activity	Sham, $n = 119$	Thapsigargin, $n = 113$	Nickel, $n = 215$
Amplitude (% F/F0 increase)	28.8 ± 1.3	28.6 ± 1.4	29.1 ± 0.9
Duration (sec)	92.8 ± 8.8	$63.9 \pm 4.1^*$	$103.7 \pm 5.1^{**}$
Area Under Curve	1850 ± 182	$1303 \pm 161^*$	2072 ± 136

Table II : Main parameters of automatically detected peaks of spontaneous activity in cortical slices, in the presence of antagonists. *, ** significantly different from Sham in a non-parametric Mann-Whitney's t-test, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively



	JCP	AD	SB	MV	MA	JB	<i>CalSignal</i>
# of ROIs	223	132	117	132	184	151	81
# peaks	19	53	26	42	193	52	16
% active ROIs	6.3	21.2	12.0	26.5	50.5	19.9	14.8
# peaks / ROI	0.09	0.40	0.22	0.32	1.05	0.34	0.20

Figure 1 : Manual object detection and analysis of fluorescence variations.

All of the authors manually identified potential regions of interest (ROIs) on cortical slices loaded with Fluo-4. Fluorescence peaks were also detected manually and descriptive statistics were calculated and compared with that obtained with CalSignal.

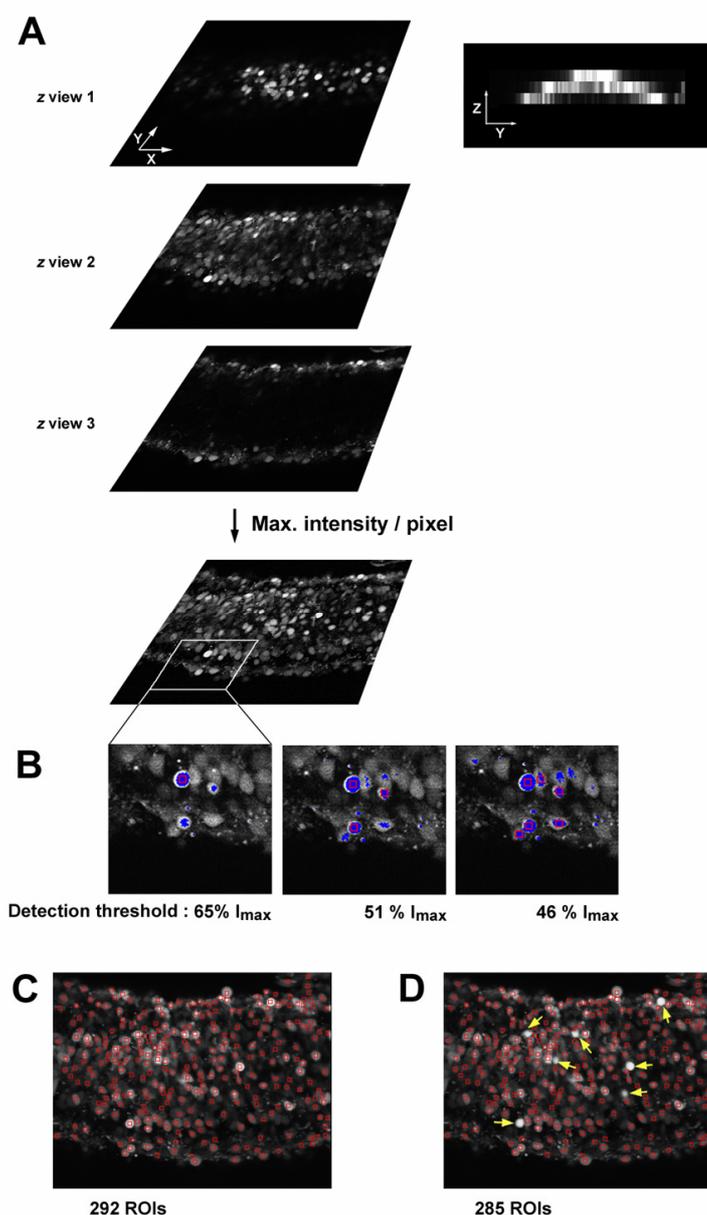


Figure 2 : Automatic object detection

A. Series of time-lapse images corresponding to serial z views of acute cortical slices loaded with Fluo4-AM – e. g. 3 z views with a 15- μm spacing - were piled up to obtain a new image file where the intensity of each pixel equaled the maximum intensity of the corresponding pixel throughout the z axis. **B.** The blue areas corresponded to pixels whose fluorescence intensity was above the detection threshold. When an area of contiguous pixels was larger than 50 pixels, it was considered as an object and a square ROI of fixed size (7 x 7 pixels) was drawn over it. As the detection threshold decreased, more objects were detected. **C.** The whole automatic detection procedure enabled the drawing of hundreds of ROIs, each corresponding to a fluorescent cellular body. **D.** Obviously saturated cells were automatically detected and their corresponding ROIs were discarded (yellow arrow heads).

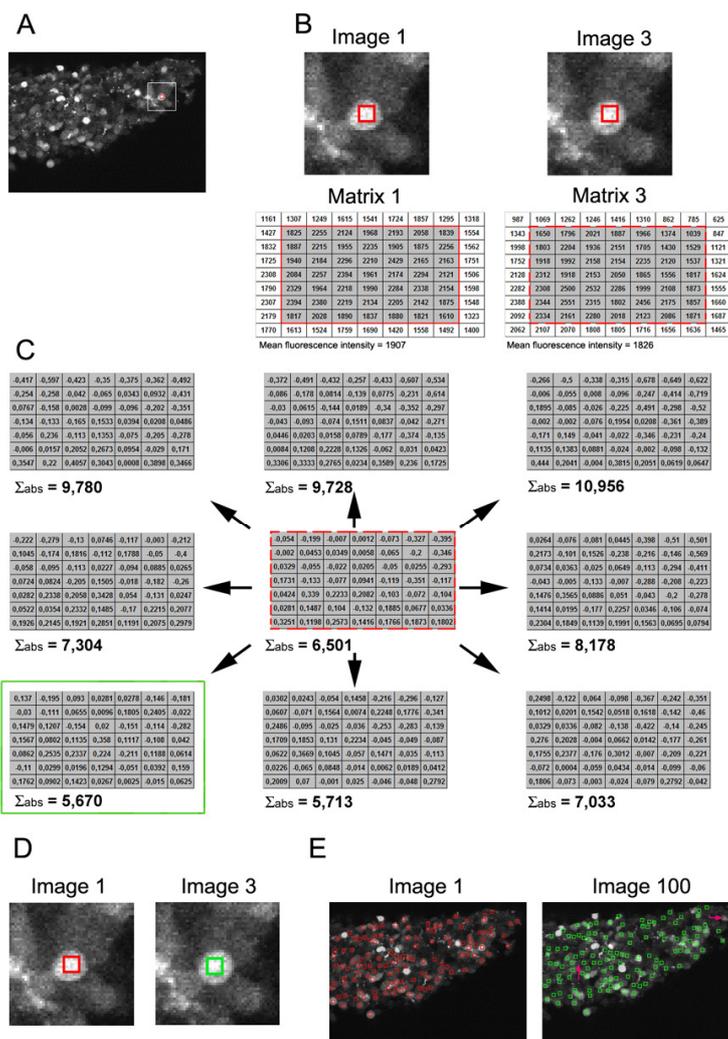


Figure 3 : Local movement tracking

A. An example of fluorescence intensity image of a Fluo-4-loaded cortical slice is shown and the local environment (white frame) is displayed around a chosen ROI (red frame). **B.** A magnified vision of the local environment described in (A) from images 1 and 3 (separated by 11 seconds) and the corresponding matrices of fluorescence intensities, reduced to 1 pixel around the ROI. **C.** Matrix 1 (solid red frame) was subtracted from matrix 3 (dotted red frame) as described in (B) and to all the matrices obtained by a 1-pixel translation of matrix 3. The smallest sum of absolute intensity differences (solid green frame) determines the direction of the calculated local movement vector. **D.** The ROI as described in (B) was shifted in image 3 (green frame) as compared to image 1 (red frame), based on the previously calculated local movement vector, in order to follow the image drifting. **E.** Total number of ROIs obtained from the example described in (A) at the beginning of a series (image 1, red frames) and at the end, once the artifactually-moving ROIs (pink arrow heads) have been removed (image 100, green frames).

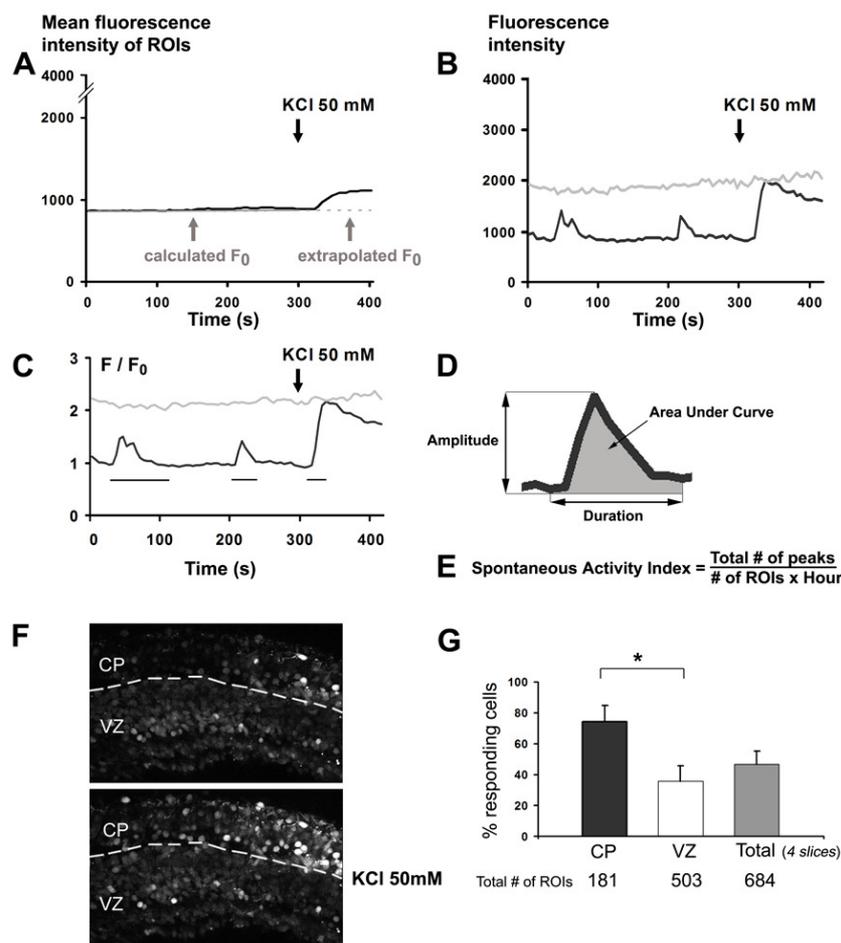


Figure 4 : Calcium activity detection and analysis

A. A regression curve was obtained from mean fluorescence intensities of all the ROIs over time, until KCl application. At each time point, a dynamic F_0 was calculated from the parameters describing the regression curve. It was extrapolated from the same parameters after KCl application. **B.** Example of crude fluorescence variations observed in two ROIs of the series used for the previous calculation of F_0 . Note that depolarization led to a dramatic increase of fluorescence intensity in the responding cells (dark line). **C.** Fluorescence ratios obtained from crude variations divided by F_0 and averaged over two consecutive images for the ROIs described in (B). Horizontal bars below the curves correspond to automatically detected peaks of calcium activity : spontaneous (thin bars) and KCl-induced (thick bar). **D.** Main characteristics calculated by *CalSignal* for each automatically detected fluorescence peak. **E.** Calculated index of spontaneous activity from the total number of peaks detected on whole series of images. **F.** Example of KCl-induced calcium activity in whole cortical slice loaded with Fluo-4. **G.** Percentage of KCl application-responding cells automatically detected by *CalSignal* in CP/MZ and VZ/IZ over 4 cortical slices treated as described in (F). *, significantly different using a Student's *t*-test, $p < 0.05$.

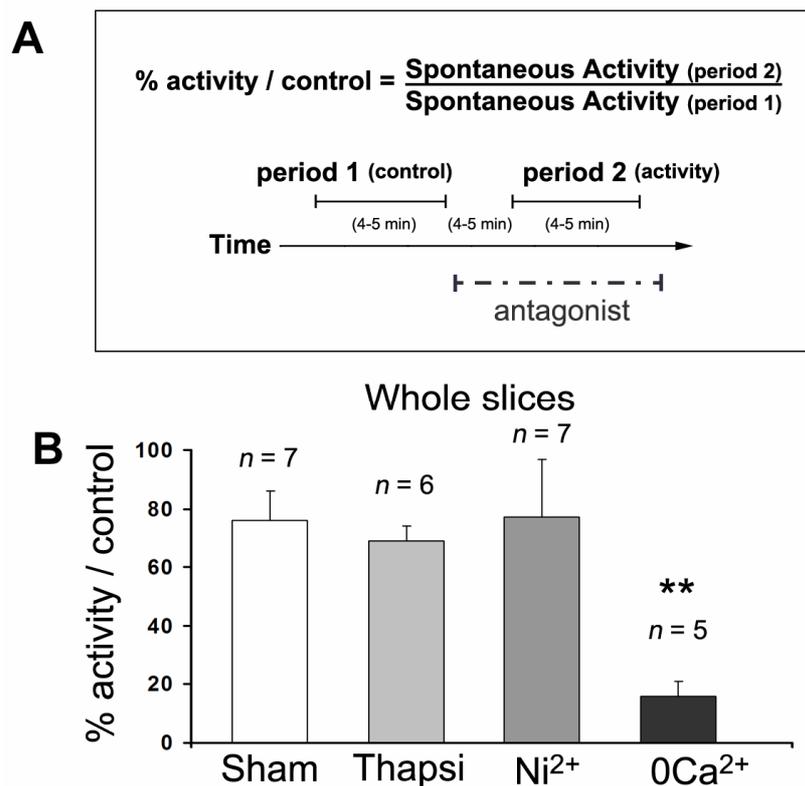


Figure 5 : Spontaneous calcium activity observed in the presence of antagonists

A. Calculation of % activity / control from spontaneous activity recorded during period 1 (control), followed by incubation with the appropriate antagonist and recording during period 2. Note that 0Ca²⁺ recordings (period 2) were performed after incubating the cortical slices in the absence of external Ca²⁺ for twice the time indicated. **B.** Comparison of % activity / control obtained as described in (A), in the presence of various antagonists: sham, no antagonist; Ni²⁺, 200 μM NiCl₂; Thapsi : 1 μM thapsigargin; 0 Ca²⁺ : ACSF – 0 Ca²⁺ - 1 mM EGTA. **, significantly different from Sham using a non-parametric Mann-Whitney's *t*-test, *p* < 0.01.

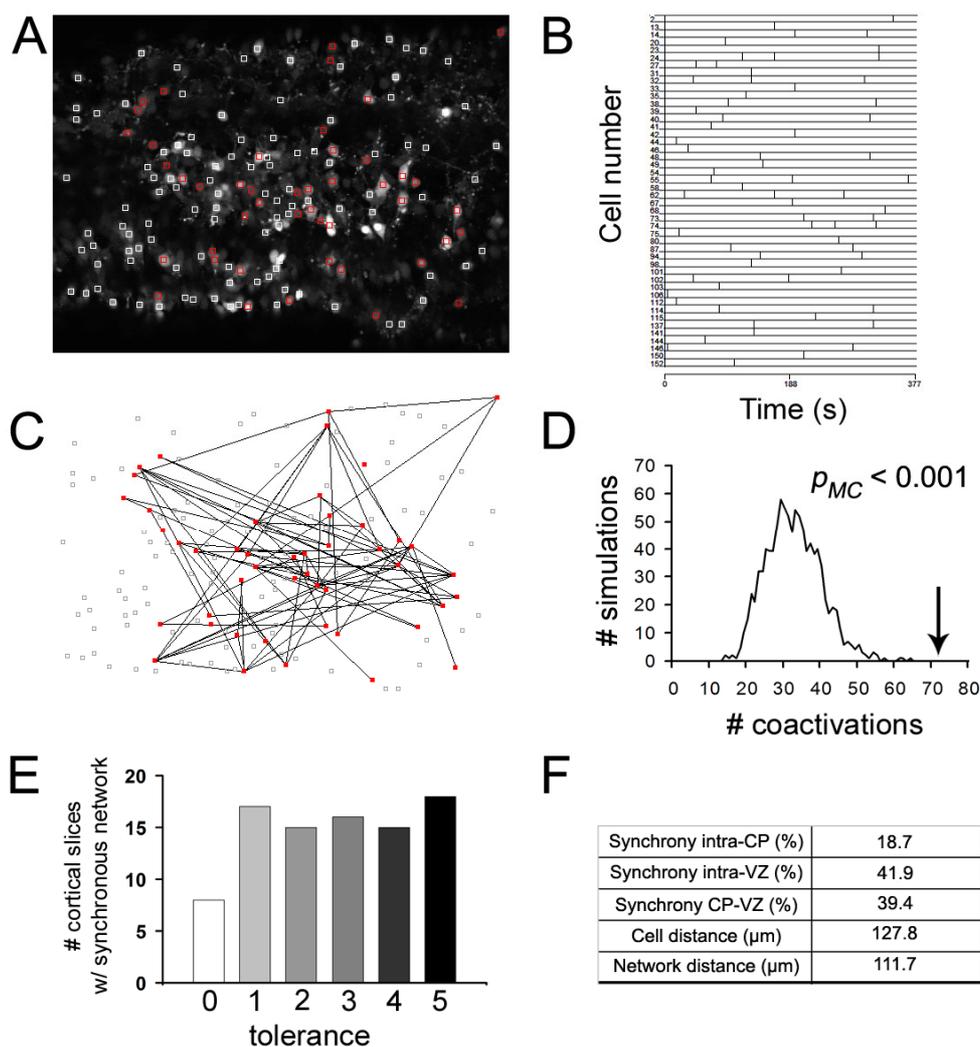


Figure 6 : Spontaneous calcium activity organized in a synchronous network.

A. Distribution of active (red frames) and non active (white frames) ROIs within a cortical slice loaded with Fluo-4. **B.** Raster plot of fluorescence peaks detected by *CalSignal* for all active ROIs as described in (A). **C.** Distribution of significant coactivations ($p < 0.001$, see Experimental Procedures) represented by thin lines among active ROIs as described in (A). **D.** Distribution of the number of coactivations in the 1000 Monte Carlo simulations of the raster plot described in (B) and comparison with the number of coactivations observed in real data (black arrow). In this example, no simulation displayed a greater number of coactivations than real data so that $p_{MC} < 0.001$. **E.** Number of cortical slices exhibiting a significantly synchronous network of spontaneously active cells as described in (A-D) when tolerance was increased to detect concomitant activation. **F.** Distribution of significant coactivations between intra-CP/MZ, intra-VZ/IZ and between the two territories in the cortical slice displayed in (A). Mean distance separating all the ROIs or the only active ROIs of the cortical slice displayed in (A).

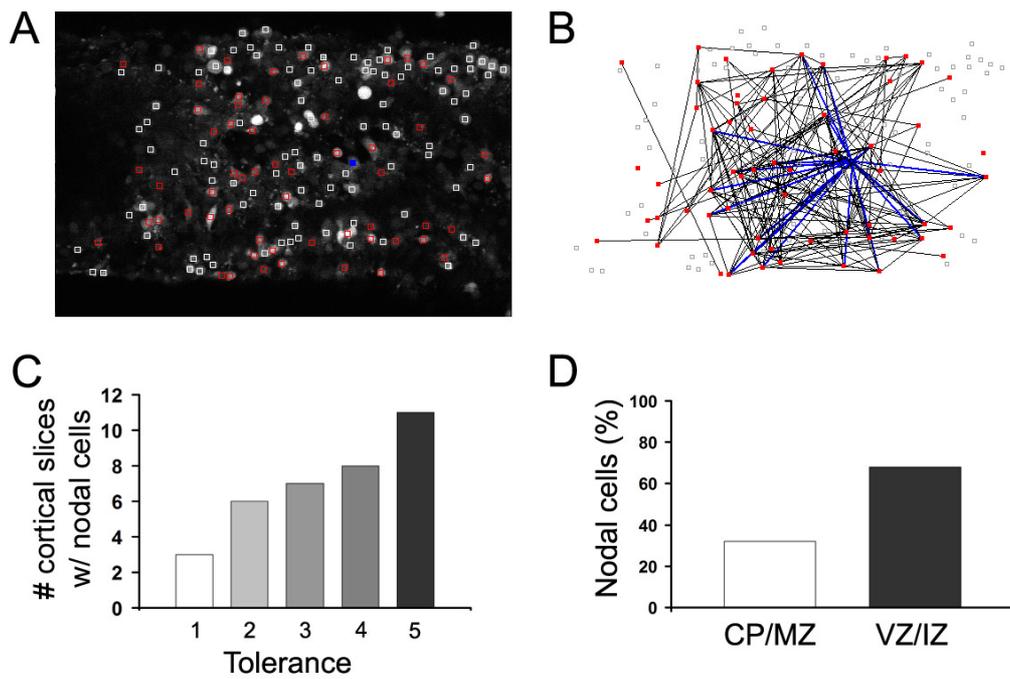


Figure 7 : Spontaneous calcium activity organized in a synchronous network.

A. Distribution of active (red frames) and non active (white frames) ROIs within a cortical slice loaded with Fluo-4 and localization of a calculated nodal cell (green frame). **B.** Distribution of significant coactivations among active ROIs (thin black lines) or involving the nodal cell (thin green lines), as described in (A). **C.** Number of cortical slices containing nodal cells when tolerance was increased to detect concomitant activation, as in Fig. 6. **D.** Distribution of nodal cells detected in cortical slices displaying synchronous activity, with a tolerance $t = 5$.

II. Etude des activités calciques spontanées au stade E13

Après avoir mis au point notre logiciel d'analyse sur des tranches au stade E14, nous avons pu analyser les expériences menées au stade E13. Le pourcentage de cellules actives n'est pas significativement différent du stade E14 (Tableau 1). En revanche, alors qu'à E14 les activités étaient significativement différentes entre les cellules de la VZ et de la CP, les activités calciques des cellules de la PP et de la VZ ont des profils semblables à E13 (Tableau 1), excepté une amplitude plus importante dans la PP ($p = 0,02$). Une autre caractéristique conservée entre ces deux stades est l'observation de synchronies entre les cellules dans 7 tranches sur 11.

		Amplitude	Durée	Intégrale	% ROI actives
PP	moyenne	45,37	54,88	1679	27,31
	sem	2,62	3,42	220	5,36
VZ	moyenne	39,1228234	61,47	1600	25,65
	sem	1,3679886	4,24	184	4,75
TOT	moyenne	41,71	58,73	1633	25,90
	sem	1,35	2,864	141	4,52

Tableau 1 : Principales caractéristiques des activités calciques spontanées au stade E13.
n = 11 tranches.

Afin de pouvoir disséquer la mécanistique de ces activités, nous avons recherché quels étaient les récepteurs exprimés fonctionnellement à E13. Des récepteurs glutamatergiques, GABA_A et glycinergiques sont présents et fonctionnels dans environ 50% des cellules neuronales (Figure 26). Dans la VZ, les agonistes spécifiques des récepteurs glutamatergiques et GABA_A (réciproquement glutamate 100 μ M et muscimol 50 μ M) entraînent des augmentations de calcium dans quelques cellules (5 à 20%; Figure 30). Il semble cependant que les récepteurs glycinergiques soient les plus actifs dans les cellules précurseurs (35% de cellules activées par la taurine 5 mM), ce qui est cohérent avec la détection prépondérante de neurotransmetteurs de type glycinergiques à ce stade précoce (Benitez-Diaz). Des expériences similaires réalisées avec des agonistes des canaux calciques intracellulaires avaient montré

que le RyR était fonctionnel uniquement dans les cellules neuronales de la PP alors que le InsP₃R était fonctionnel dans toutes les cellules du néocortex (Faure *et al.*, 2001). Ces résultats tendent donc à faire émerger une cartographie spatiale et temporelle des canaux et récepteurs impliqués dans la signalisation, calcique, avec l'apparition de récepteurs de type "neuronaux" alors que d'autres semblent être plus ubiquitaires. Cette cartographie fonctionnelle a certainement un lien avec la typologie des activités spontanées enregistrées et laisse présager d'un rôle physiologique précis pour chacun d'eux.

Dans le même sens, les canaux sodiques préalablement enregistrés dans les cellules neuronales de la PP semblent être directement reliés à une signalisation calcique à ce stade précoce (application de vératridine, agoniste spécifique des canaux sodiques dépendants du voltage, Figure 26). Nous allons revenir plus précisément sur ce lien avec l'activité calcique et détailler la cascade de signalisation induite par leur stimulation à ce stade de la préplaque.

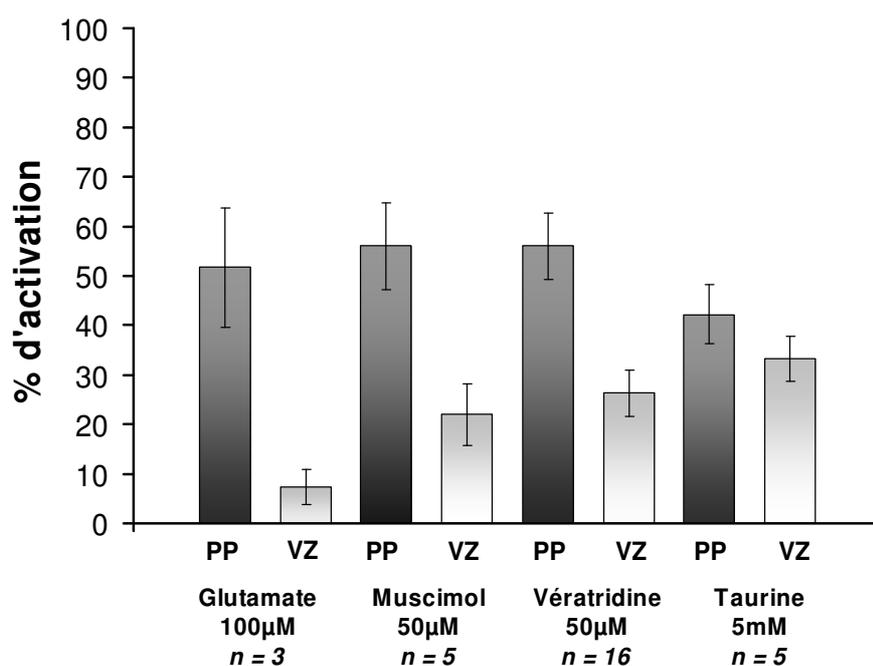


Figure 26 : Mise en évidence de l'expression fonctionnelle des récepteurs glutamatergiques, GABA_A, glycinergiques et des canaux sodiques dans le néocortex au stade E13.

Des récepteurs glutamatergiques, GABA_A (activés par le muscimol), glycinergiques (activés par la taurine) et des canaux sodiques (activés par la vératridine) sont présents et fonctionnels dans les cellules neuronales de la PP et plus faiblement dans la VZ.

Troisième partie : Rôle des canaux sodiques dans la sécrétion de glutamate au stade de la préplaque

Dans ce travail, nous avons étudié plus précisément le rôle des canaux sodiques exprimés précocement par les cellules de la préplaque, dans la signalisation calcique développementale.

La stimulation des canaux sodiques, par l'application de vératridine, entraîne une augmentation de calcium de forte amplitude dans la tranche au stade E13. La première question que nous nous sommes posée a été celle du mécanisme à l'origine de cette augmentation de calcium dans les cellules possédant des canaux sodiques. Nous avons alors pu démontrer que l'augmentation de calcium, induite par la vératridine, provient d'une entrée de calcium externe via un échangeur membranaire $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Nous avons vérifié par des marquages immuno-histo-chimiques que les 3 isoformes de l'échangeur sont exprimées au stade E13 dans la bordure externe de la préplaque, dans les cellules exprimant également des canaux sodiques. Le sodium qui entre par les canaux sodiques est de cette façon échangé contre du calcium extracellulaire, induisant une augmentation de calcium dans ces cellules.

Les canaux sodiques sont exprimés uniquement dans la moitié externe de la préplaque, cependant, les augmentations de calcium se produisent dans toute la PP (56% de cellules activées) et même dans 20% des cellules de la VZ. Nous nous sommes alors demandé quelle pouvait être l'origine de la propagation de cette augmentation de calcium. Nous avons émis l'hypothèse qu'un messenger pouvait être libéré et venir activer les cellules ne possédant pas de canaux sodiques. Les neurotransmetteurs sont classiquement contenus dans des vésicules et libérés par exocytose en utilisant le système des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Le FM1-43, un marqueur fluorescent d'exocytose, nous a permis d'observer que l'activation des canaux sodiques entraîne une exocytose localisée dans la préplaque. La toxine tétanique en dégradant la synaptobrevine, une des protéines du complexe SNARE, bloque la machinerie d'exocytose (Schiavo *et al.*, 1992). L'application de cette toxine, n'a eu aucun effet sur l'exocytose induite par la vératridine à E13. Des libérations de neurotransmetteur indépendantes de la voie des SNARE ont été décrites dans l'hippocampe en postnatal (Demarque *et al.*, 2002). Ce

mécanisme semble similaire à celui que nous observons. Néanmoins, dans nos expériences, l'exocytose semble dépendante de la présence de calcium extracellulaire, puisqu'une déplétion de calcium externe bloque le processus d'exocytose induit par la vératridine.

Afin d'identifier le neurotransmetteur libéré, nous avons, d'une part, appliqué différents bloqueurs spécifiques avant d'activer les canaux sodiques et, d'autre part, recherché par HPLC dans le milieu extracellulaire la présence de neurotransmetteurs secrétés. Ces 2 types d'expérience ont conduit de manière convergente à la conclusion que du glutamate est libéré consécutivement à l'activation des canaux sodiques. Le taux de GABA, quant à lui, n'est pas du tout affecté par l'activation de ces canaux. L'activation des canaux sodiques par la vératridine restant un phénomène artificiel, nous avons alors cherché à montrer que ces canaux sodiques pouvaient être activés physiologiquement dans le néocortex.

Nous avons montré que les récepteurs de la glycine peuvent activer les canaux sodiques et toute la cascade de signalisation consécutive, contrairement aux récepteurs du GABA_A. L'activation tonique des récepteurs de la glycine avait été démontrée dans le néocortex de souris (Flint *et al.*, 1998). De plus, l'agoniste physiologique de ces récepteurs, la taurine, est présent dans le néocortex à E13 (Benitez-Diaz *et al.*, 2003). Ceci permet de replacer dans un cadre physiologique la cascade de signalisation originale que nous avons mise en évidence : selon le modèle que nous proposons, le récepteur de la glycine dépolarise la membrane, induisant une entrée de sodium par les canaux sodiques. Dans ces cellules, le sodium est échangé contre du calcium qui va pouvoir induire une exocytose de glutamate dans le milieu extracellulaire. Ce glutamate va à son tour activer d'autres cellules de la PP et de la VZ au travers d'une communication paracrine (Figure 27). Cette libération de neurotransmetteurs pourrait réguler des événements morphogénétiques comme la prolifération, la migration et la différenciation neuronale (Nguyen *et al.*, 2001).

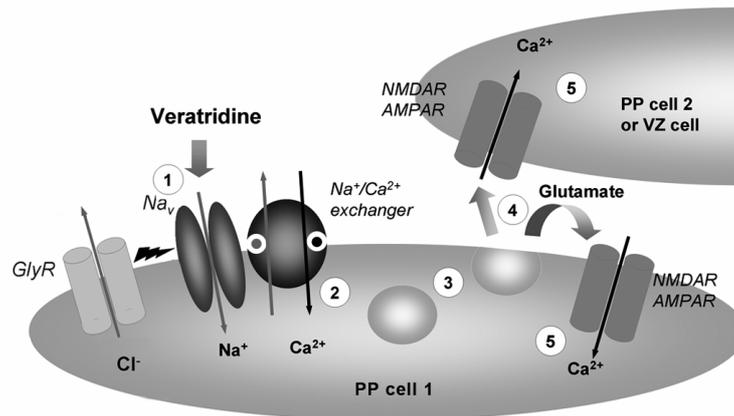


Figure 27: Représentation schématique de la cascade de signalisation survenant suite à l'activation des récepteurs glycinergiques dans les neurones néocorticaux au stade E13 chez la souris.

Na⁺ channel-mediated Ca²⁺ entry leads to glutamate secretion in mouse neocortical preplate

Platel J.C.^{1,2}, Boisseau S.¹, Dupuis A.¹, Brocard J.¹, Poupard A.², Savasta M.², Villaz M.¹ and Albrieux, M.^{1,2}

¹Laboratoire Canaux Ioniques et Signalisation, INSERM E9931, DRDC-CEA, Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

²Laboratoire Dynamique des Réseaux Neuronaux, INSERM U704, Université Joseph Fourier, 2280 rue de la Piscine, 38041 Grenoble, France

Corresponding author:

Dr. M. Albrieux: Laboratoire Dynamique des Réseaux Neuronaux, INSERM U704, Université Joseph Fourier, 2280 rue de la Piscine, 38041 Grenoble, France

Phone : 33 4 76 63 54 03 - Fax : 33 4 76 63 54 15 - Email : mireille.albrieux@ujf-grenoble.fr

Manuscript information : 5 figures, 0 table, 25 text pages

Abstract number of words : 195 ; Total number of characters : 39144 (excluding figures) and 46646 (including figures).

ABSTRACT

Before synaptogenesis, early excitability implicating voltage-dependent and transmitter-activated channels is known to be crucial for neuronal development. We previously showed that preplate neurons of the mouse néocortex express functional Na^+ channels as early as E12. In this study, we investigated the role of these Na^+ channels in signaling during early development. In E13 mouse néocortex, activation of Na^+ channels with veratridine induced a large Ca^{2+} response throughout the néocortex, even in cell populations lacking the Na^+ channel. This Na^+ -dependent Ca^{2+} activity requires external Ca^{2+} and is completely blocked by inhibitors of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. Moreover, veratridine-induced Ca^{2+} increase coincides with a burst of exocytosis in the preplate. In parallel, we show that Na^+ channel stimulation enhances glutamate secretion in the neocortical wall. Released glutamate triggers further Ca^{2+} response in PP and VZ as indicated by the decreased response to veratridine in the presence of AMPAR and NMDAR inhibitors. Therefore, the combined activation of the Na^+ channel and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger triggers Ca^{2+} signaling in the preplate pioneer neurons, leading to glutamate secretion, which amplifies the signal and serves as an autocrine / paracrine transmitter before functional synapses are formed in the néocortex. Membrane depolarization induced by glycine receptors (GlyRs) activation could be one physiological activator of this Na^+ channel-dependant pathway.

INTRODUCTION

Neurons in the cerebral cortex are generated in a proliferative region known as the ventricular zone (VZ) (1). The first phase of neurogenesis occurs between E11 and E13 in mouse, and gives rise to a group of neurons that form the preplate (PP) above the VZ (2).

During development, ligand and voltage-gated ionic currents appear in a complex and progressive pattern, generating cell excitability. This early excitability plays a widespread and important role in transmission of information and development of the nervous system. Combinations of ion channels usually generate Ca^{2+} influx which influences differentiation and regulates channel expression (for review see ref. 3). Neurotransmitters are reported to be present very early during neurogenesis (4). GABA and glutamate are both present in the neocortical wall and can regulate neuronal progenitor proliferation (4, 5) and neuronal migration (6). Taurine and glycine are also present and have been reported to be the most abundant neurotransmitters at E13 in mouse néocortex (43). Little is known about channels and pathways involved in this early activity and especially how these neurotransmitters are secreted before the appearance of voltage-dependent Ca^{2+} channels (7, 8).

While cells are devoid of synaptic connection, spontaneous Ca^{2+} activity is already present at E13 (Platel J. C. and Albrieux M., unpublished observations). Electrical and Ca^{2+} spontaneous activities are known to be interconnected and work together in developmental signaling (3, 9). At E13, while all neurons and proliferative cells express a delayed outward K^+ current, only a subpopulation of PP neurons also express an inward Na^+ current (10). Moreover, no voltage-dependent Ca^{2+} current can be recorded at this stage, in either the VZ, or the PP cells (7, 8). Therefore, the only depolarizing voltage-dependent inward current expressed at this stage is found in a subset of neuronal PP cells. This led us to study the role of the PP Na^+ currents in this Ca^{2+} signaling in early neurogenesis.

Using veratridine, a specific voltage-dependent Na^+ channel agonist (11), we show that the Na^+ channel activation of PP neurons triggers Ca^{2+} signaling via a plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. This Ca^{2+} rise extends to most of PP cells as well as some cells in the VZ, suggesting the secretion of a diffusible messenger. The veratridine induced- Ca^{2+} rise triggers an exocytosis in PP cells, as measured with the fluorescent dye FM 1-43. We further show that this exocytosis coincides with glutamate secretion in the néocortex. Hence, glutamate may be responsible for activation of a population of cells devoid of Na^+ channels, via paracrine communication. Our results demonstrate that new, immature Na^+ and Ca^{2+}

excitabilities are established in the first generated neurons and trigger neurotransmitter secretion, involved in paracrine communication between neocortical cells.

MATERIALS AND METHODS

Calcium imaging

Neocortical brain slices are prepared from E13 embryos of C57/Bl6 mice (Iffa Credo, Lyon, France) as described previously (10). Slices are loaded with the Ca^{2+} indicator dye Fluo-4 by bath application for 60 to 90 minutes at room temperature in artificial cerebral spinal fluid (ACSF, in mM: 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl_2 , 2.5 CaCl_2 , 1 NaH_2PO_4 , 26.2 NaHCO_3 , 11 D-glucose) containing 5 μM Fluo-4 AM (Molecular Probes), 0.005 % Pluronic F-127 (Molecular Probes) and 0.1 % DMSO (Sigma). Slices are then placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95 % O_2 / 5 % CO_2) at room temperature on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600FN, Nikon) equipped with a 40x water immersion objective (numerical aperture 0.8) and a confocal head (PCM 2000, Nikon). Drugs are perfused in the bath via a multi-valve system (VC-6M, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Relative changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are assessed in the dorsomedial néocortex part. The fluorescent dye is excited with light at 488 nm from an argon laser. Emitted light is filtered with a 515 ± 15 nm filter. Stacks of 15 μm -spaced images are acquired every 4 seconds, in a time-lapse sequence, with EZ 2000 software (Nikon).

Quantification and analysis

We developed a new computer program, named CalSignal, for automatic detection of cells and measurement of their intracellular Ca^{2+} activity (Platel J.C., Albrieux M. and Brocard J., manuscript in preparation). This software makes it possible to automatically detect and track hundreds of cells per slice and to carry out statistical analysis for numerous parameters. For each series of images, F_0 refers to the mean fluorescence intensity measured throughout all the regions of interest. Relative changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ over time are expressed as F/F_0 . The percentage of activated cells is calculated as the number of cells displaying a significant agonist-induced (e.g. veratridine) fluorescence intensity increase (>20 % F/F_0 increase upon application) divided by the total number of cells detected. The amplitude is determined as the difference between the peak maximum and initial peak intensities in the recorded cell. This program is freely accessible on request. Data are exported to SigmaStat software (Systat) for statistical analysis.

All results are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses are carried out with non-parametric Wilcoxon (Fig. 1, paired data) or Mann-Whitney (unpaired data) tests. Significant

differences compared to control are represented as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

FM1-43 optical measurements

We measure exocytosis with the fluorescent membrane probe FM1-43 (Molecular Probes) added to the ASCF perfusion medium, at a concentration of 2 μM , 1 minute before the recording. The membrane trafficking cycle is monitored by the two approaches described in (12): 1] without washing FM1-43: exocytotic stimulation should trigger an increase in fluorescence; 2] after a 5 min wash of external FM1-43: stimulation should trigger a decrease of the remaining (internal) fluorescence.

Measurements are made with the Ca^{2+} imaging setup, with stimulation at 488 nm and emission filtered with a 595 ± 35 nm filter. The signal is sampled every 4 seconds. We then quantify the fluorescence in both PP and VZ, using regions of interest corresponding to these two areas. Results are expressed as fluorescence ratios (%), comparing fluorescence intensity levels before (stabilized basal level) and 2 minutes after FM1-43 addition in the absence of added drugs or 1 minute after the addition of veratridine (applied 1 minute after FM1-43). Likewise, for destaining experiments, fluorescence intensity levels are compared before and 1 minute after veratridine addition.

Immunostaining

E13 brains are fixed in cold 4 % paraformaldehyde in ACSF for 1 hour, then washed with phosphate-buffered saline (PBS, in mM: 3.16 NaH_2PO_4 , 6.84 Na_2HPO_4 , 0.15 NaCl , pH 7.2) and cryoprotected by incubation in 15 % sucrose in PBS for 1 hour. Brains are then frozen in Tissue-Tek embedding medium and 20 μm sections are cut with a cryostat. Sections are blocked with 1 % polyvinyl-pyrrolidone (PVP 40, Sigma), 0.2 % Triton X100 in PBS (PBSTP) for 30 min. Sections are then incubated overnight with primary antibody diluted in PBSTP : anti-neuronal class III β -tubulin antibody (TuJ1; BabCO; 1/500), anti-Pan sodium channel antibody (S8809, SIGMA; 1/200), anti-NCXs antibodies (R3F1 and W1C3 gifts from Prof. H. Porzig, Switzerland, diluted at 1/100 and 1/25 respectively; anti-NCX3, gift from Prof. K. Philipson, USA, 1/100) or anti-glutamate antibody (mAB 2D7, Swant, 1/500). Sections are washed in PBS + 0.2% Triton X-100, then incubated for 2 hours with the appropriate secondary antibody: Alexa 488- or Alexa 546-conjugated (Molecular Probes) diluted in PBSTP (1/1000). Sections are washed in PBS + 0.2 % Triton X-100, and mounted

in Vectashield (Vector Laboratories). Images are acquired with a TCS-SP2 Leica Confocal setup and then merged in Adobe Photoshop 7.0.

Glutamate, Aspartate and GABA assays

The 300 μm slices are microdissected to retain only the neocortical part. Batches of five such néocortex sections are placed in 1,5ml tubes. All incubations are performed at room temperature. At $t = 0$, 100 μl ACSF with or without 50 μM veratridine are added to each tube, with gentle shaking. 10 μl of homogenate are collected every minute for 5 minutes and immediately frozen (-80°C). The concentrations of aspartate, glutamate and gamma amino butyric acid (GABA) in the collected volumes are determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with laser-induced fluorescence detection, as previously described (13). With this procedure, a 4 μl sample allows the simultaneous measurement of the concentrations of aspartate, glutamate and GABA with detection limits of 46 pM, 42 pM and 60 pM, respectively (signal/noise = 3).

RESULTS

Na⁺ channels and calcium signaling

A subpopulation of the mouse neuronal cells appearing in the néocortex at E11-E13 and forming the PP zone, express TTX-sensitive Na⁺ channel (10). At E13, expression of this Na⁺ channel is restricted to the upper part of the PP zone (red staining in Fig. 1A). Double staining with TuJ1 antibody directed against neuronal β -tubulin confirms that only some of the neuronal cells (green staining in Fig. 1A) possess this Na⁺ channel.

Our preliminary observations indicated the presence of Ca²⁺ activity in mouse néocortex as early as E13. Given the essential role played by the pioneer PP neurons in corticogenesis, we investigated the role of the Na⁺ channel in calcium signaling at this stage. Ca²⁺ imaging combined with automated individual cell analysis (see Materials and Methods) allow the simultaneous monitoring of hundreds of cells (237 ± 15 cells per slice, $n = 16$ slices). Application of 50 μ M veratridine (a specific agonist of voltage-dependent Na⁺ channels) on E13 coronal slices during 60 seconds, triggers a large Ca²⁺ increase in the PP that extends to some VZ cells (Fig. 1B and 1C). As Na⁺ channel is restricted to the upper part of the PP (Fig. 1A), these data strongly suggest that there is also a Ca²⁺ rise in cells lacking the Na⁺ channel. Hence, veratridine may induce a direct effect on the Na⁺ channel-expressing cells, probably relayed by an indirect effect which takes place in both PP and VZ.

Quantification and statistical analysis of responding cells show that there are significantly more PP cells responding to veratridine (58.0 ± 6.8 %) than VZ cells (26.3 ± 4.7 %; $n = 16$; $p < 0.001$; see Fig. 1D). Moreover, amplitude of Ca²⁺ rises (expressed as F/F₀ ratios) in PP cells is significantly higher than in VZ cells (109.4 ± 7.6 vs 53.4 ± 3.4 ; $n = 16$; $p < 0.001$).

Pre-incubation of slices in ACSF-0 Na⁺ NMDG (N-methyl-D-glucamine; data not shown) or in 1 μ M tetrodotoxin (TTX; Fig. 2A, 2.7 ± 0.3 % responding cells vs 58.0 ± 6.8 % in ACSF, $n = 6$, $p < 0.001$) prevents the Ca²⁺ rise induced by veratridine. This demonstrates that veratridine triggers a Na⁺ influx, via a voltage-dependent Na⁺ channel, responsible for the subsequent Ca²⁺ rise.

A Na⁺/Ca²⁺ exchange is responsible for the veratridine-induced Ca²⁺ rise

We first aimed at identifying the mechanism between Na⁺ channel activation and Ca²⁺ response. We previously showed that ryanodine receptor (RyR) and inositol trisphosphate

receptor (InsP₃R) are specifically present and functional in PP cells at E13 (14). Incubation of slices with 2 μ M thapsigargin (a Ca²⁺ store-depleting agent) significantly decreases the number of PP cells activated by veratridine (30.3 ± 5.7 % vs 58.0 ± 6.8 % in ACSF; $n = 15$; $p < 0.05$; Fig. 2A) with no change in signal amplitude (99.9 ± 10.7 vs 109.4 ± 7.6 in ACSF; $n = 15$). This suggests that Ca²⁺ stores may be partially involved in the Na⁺-induced Ca²⁺ rise but do not constitute the main route for veratridine-induced Ca²⁺ influx. On the other hand, removal of external Ca²⁺ from the bath (ACSF - 0 Ca²⁺ - 1 mM EGTA), strongly prevents the veratridine-induced Ca²⁺ increase (7.3 ± 2.4 % responding cells, $n = 4$, Fig. 2A), suggesting that external Ca²⁺ is the main and primary source of Na⁺-induced Ca²⁺ rise.

Although voltage-dependent Ca²⁺ channels cannot be recorded electrophysiologically in the néocortex at E13 (7, 10), they may be present at low density or only in thin cellular processes where they could go undetected. In the presence of 200 μ M Ni²⁺ + 200 μ M Cd²⁺, broad range potent inhibitors of voltage-dependent Ca²⁺ channels, veratridine elicits a response in 40.0 ± 14.8 % of PP cells ($n = 3$), which is not significantly different from control (Fig. 2A). Hence, the Ca²⁺ rise associated with Na⁺ channel opening is not mediated by voltage-dependent Ca²⁺ channels.

Alternatively, Ca²⁺ may enter the cell via a Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Such exchangers are involved in the regulation of Ca²⁺ homeostasis by exchanging three Na⁺ ions for one Ca²⁺ ion and may operate in either direction (15). They are known to be present in differentiating neurons in rat embryonic néocortex, where they contribute to the maintenance of basal [Ca²⁺]_i levels (16, 17). We investigated whether a Na⁺/Ca²⁺ exchanger could be involved in the veratridine-induced Ca²⁺ rise, by incubating slices with a reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger antagonist, KB-R7943, at a concentration of 1 μ M (18). In these conditions, veratridine failed to induce Ca²⁺ increase in PP cells (2 ± 1 % responding cells vs 58.0 ± 6.8 %; $n = 6$; $p < 0.001$, Fig. 2A, KB-R). This complete inhibition suggests that the observed Ca²⁺ influx is mediated primarily by Na⁺/Ca²⁺ exchangers. These observations were confirmed using benzamil, another potent inhibitor of the reverse mode of the brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger, binding to the exclusive Na⁺ transport site (19). Benzamil (100 μ M) also prevents veratridine-induced Ca²⁺ response (3.0 ± 0.8 % responding cells vs 58.0 ± 6.8 %; $n = 4$; $p < 0.001$; data not shown). Upon veratridine stimulation, Na⁺ accumulates in the cytosolic compartment and exchanges for external Ca²⁺, leading to Ca²⁺ increase in cells expressing voltage-gated Na⁺ channels.

Double-staining experiments with anti-Na⁺ channel antibodies together with anti-NCXs antibodies (20) directed against the three identified subtypes of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3) in cortical slices show that Na⁺ channels, NCX1 and NCX2 are expressed in the same subpial area of the PP zone (Fig. 2B) and that most of the cells co-express the Na⁺ channel and the exchangers. The NCX3 exchanger is even more confined to the very upper PP cell layer. Thus, these observations are in favor of a functional partnership between Na⁺ channels and Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the corresponding neurons of the PP zone.

Na⁺ channel activation leads to exocytosis in PP cells

Expression of Na⁺/Ca²⁺ exchangers and Na⁺ channels is restricted to the external part of the PP (Fig. 2B). Therefore, they cannot be directly involved in the Ca²⁺ rise occurring in cells of the inner PP and VZ. We therefore hypothesized that veratridine-triggered Ca²⁺ influx in Na⁺ channel-expressing PP cells may induce the release of a diffusible messenger responsible for the Ca²⁺ rise observed in VZ and more internal PP cells. We used the fluorescent dye FM1-43 to investigate a possible role of veratridine in exocytosis (for review, see ref. 12). Addition of 2 μM FM1-43 in the perfusion medium of slices results in faint staining of the whole slice (Fig. 3A, left panel and 3B, ACSF). To quantify the fluorescence increase, we calculated the fluorescence signal ratio two minutes after addition of FM1-43 versus the initial fluorescence level (t = 0). In control condition, the level of FM1-43 staining shows a 62.7 ± 3.1 % increase in the PP (Fig. 3B, n = 4). This basal staining depends on external Ca²⁺, because it is totally abolished with prior incubation in ACSF- 0 Ca²⁺ 1 mM EGTA (data not shown). Hence, spontaneous FM1-43 fluorescence increase is probably due to spontaneous basal exocytosis. Application of 50 μM veratridine 1 minute after FM1-43 perfusion, increases the intensity of FM1-43 staining in the whole PP zone (Fig. 3A right panel and 3B; 242.8 ± 58.1 %; n = 8), indicating the occurrence of a significantly larger exocytosis than in ACSF conditions (p < 0.01; Fig. 3B). This massive exocytosis is completely inhibited by addition of 1 μM KB-R7943 in the bathing medium (14.0 ± 7.1 %; p < 0.001; n = 3; Fig. 3B), indicating that Ca²⁺ influx following Na⁺ channel activation is crucial to exocytosis in PP cells. We also noticed that the spontaneous fluorescence increase is smaller in the presence of KB-R7943 than in ACSF (p = 0.057), suggesting that the Na⁺/Ca²⁺ exchanger may also be involved in spontaneous exocytosis in E13 neocortical slices.

To confirm that the FM1-43 fluorescence increase described above is really due to exocytosis, we removed FM1-43 from the external medium after 5 minutes of incubation. The

application of 50 μM veratridine then significantly decreases fluorescence, demonstrating the washing off of internalized FM1-43 [20.7 ± 4.6 % decrease 1 minute after veratridine application ($n = 5$) compared to 0 % decrease ($n = 5$) in ACSF; $p < 0.05$; Fig. 3C]. Thus, these data demonstrate that stimulation of the Na^+ channel with 50 μM veratridine triggers exocytosis in PP cells. This phenomenon is dependent on external Ca^{2+} and requires the involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange.

Na^+ channel stimulation in PP cells triggers glutamate secretion

At E13, synapses have not been formed yet (21) and gap-junctions are not present in differentiated neuronal cells (22, 7), suggesting that Ca^{2+} increases in cells devoid of Na^+ channels probably involve extracellular signaling. GABA and glutamate are good candidates since (i) they are present in the mouse néocortex as soon as E10 (4), (ii) they both lead to a Ca^{2+} increase (5) and (iii) they are known to be involved in early corticogenesis (23).

We thus quantified glutamate and GABA levels by HPLC measurements in the bathing medium of slices exposed to veratridine. Microdissected neocortices are used in these experiments and external medium samples are collected every minute. Glutamate secretion into the medium considerably increases after incubation with 50 μM veratridine, up to 3 minutes after application (1198 ± 533 % versus 119 ± 29 % in ACSF; $p < 0.01$; $n = 4$ and 11 respectively). In the same samples, there is no significant difference in GABA levels (nor in aspartate levels, data not shown) between ACSF and veratridine treatments (Fig. 4A).

The presence of glutamate at this stage of development is confirmed by immunohistochemical data : (i) high levels of glutamate are detected in the PP of E13 slices (Fig. 4B; see also ref. 6); (ii) glutamate staining in the PP coincides with staining of Na^+ channel (Fig. 4B) and (iii) confocal analysis at higher magnification reveals that glutamate labeling is punctate within PP cells (data not shown), suggesting the presence of glutamate in vesicles.

NMDAR and AMPAR relay the veratridine-induced Ca^{2+} rise

AMPA/kainate and NMDA receptors are expressed in mouse néocortex (5, 6). To check whether released glutamate could propagate the veratridine-induced Ca^{2+} rise, we applied veratridine in the presence of glutamate receptors antagonists. Addition of 10 μM CNQX (to block AMPA receptors) depresses the veratridine-induced Ca^{2+} response (Fig. 4C; 28.8 ± 7.9 % responding cells vs 58.0 ± 6.8 % in ACSF, $n = 6$) although the decrease does not

reach statistical significance ($p = 0.051$). Blocking NMDAR with $100 \mu\text{M}$ MK801 significantly inhibits the veratridine-induced Ca^{2+} increase in PP cells ($23.0 \pm 11.2 \%$ vs $58.0 \pm 6.8 \%$ in ACSF, $n = 5$; $p < 0.05$). These results suggest that both NMDAR and AMPAR are involved in the Ca^{2+} response. Concomitant application of CNQX and MK801 does not trigger an additional effect on the percentage of residual active PP cells. Both inhibitors also affect the signal amplitude of the remaining PP responding cells (47.2 ± 10.8 in CNQX+MK801 vs 109.4 ± 7.6 in ACSF; $p < 0.01$), suggesting an autocrine effect on the initially activated cells, which possess 1] Na^+ channels, 2] $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers and 3] NMDAR and/or AMPAR. Finally, the tested inhibitors also significantly reduce the number of active VZ cells ($11.5 \pm 2.4 \%$ vs $26.3 \pm 4.7 \%$ in ACSF; $p < 0.05$) and the signal amplitude in the remaining (34.5 ± 6.1 vs 53.4 ± 3.4 in ACSF; $p < 0.05$), suggesting the involvement of NMDAR and AMPAR in the veratridine-induced Ca^{2+} signal recorded in the VZ. Metabotropic glutamate receptors seem to be poorly involved at this stage since L-AP3 ($50 \mu\text{M}$) had no inhibitory effect on the veratridine-induced Ca^{2+} signal (data not shown).

GABA_ARs are also expressed in mouse neocortical cells and their activation can lead to a Ca^{2+} increase (5), which can be blocked by bicuculline (BMI). In agreement with the absence of GABA release induced by veratridine, BMI ($20 \mu\text{M}$) does not inhibit the veratridine-induced Ca^{2+} rise (Fig. 4C), as assessed by the absence of significant effect on the number of active PP cells ($44.3 \pm 8.8 \%$ in BMI vs $58.0 \pm 6.8 \%$ in ACSF; $n = 3$) and on the signal amplitude (92.6 ± 7.1 in BMI vs 109.4 ± 7.6 in ACSF; $n = 3$; data not shown).

Taurine and glycine acting on GlyRs : physiological activators of Na^+ channels?

In order to assess the physiological relevance of this pathway, we wonder about possible physiological activators of the Na^+ channel in PP cells. Glycine and/or taurine appear as potential candidates since they are abundantly present in embryonic néocortex (40, 43) together with their target receptor, the glycine receptor (GlyR) (40). Activation of GlyRs during embryonic stages is excitatory, leading to membrane depolarization (40), which can in turn activate Na^+ channels.

Application of 1 mM glycine (or 1 mM taurine) induces a Ca^{2+} increase in PP cells ($42.2 \pm 8.8 \%$ responding cells; $n = 5$; Fig. 4D). This effect is totally blocked by $20 \mu\text{M}$ strychnine but not by $20 \mu\text{M}$ bicuculline indicating the specific activation of GlyRs ($n = 3$; data not shown). This Ca^{2+} rise implies activation of the Na^+ channels, because it is totally blocked by the concomitant application of $1 \mu\text{M}$ TTX ($5.4 \pm 1.8 \%$ vs $42.2 \pm 8.8 \%$

responding cells; $p < 0.005$; $n = 5$; Fig. 5A). This demonstrates that depolarization induced by GlyRs stimulation triggers Na^+ channels activation leading to Ca^{2+} rise. Glycine also induces a Ca^{2+} increase in VZ cells (24.2 ± 6.7 % responding cells; $n = 5$), an effect similar to that activated by veratridine (26.3 ± 4.7 %; $n = 16$). Most importantly, the effect of glycine on VZ cells is blocked by TTX (9.0 ± 1.4 %; $p < 0.05$; $n = 5$; not shown) indicating that GlyR activation is sufficient to trigger both the activation of PP cells that express Na^+ channels and the propagation of the Ca^{2+} signal to other cells in a manner similar to that observed with direct activation of the Na^+ channels with veratridine.

DISCUSSION

In mice, voltage-dependent Na^+ channels appear very early in development, in the first generated neocortical neurons, at least two days before the expression of voltage-dependent Ca^{2+} channels (7, 10). In the present work, we show that stimulation of the preplate Na^+ channels by veratridine induces Ca^{2+} signaling via a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. The Ca^{2+} rise resulting from the activation of Na^+ channels leads to exocytosis in PP cells and glutamate secretion. The resulting paracrine stimulation extends the Ca^{2+} signal to neocortical cells devoid of Na^+ channels.

Veratridine is a plant alkaloid that specifically activates Na^+ channels at the concentration used (50 μM), inducing a state of low conductance associated with a lack of inactivation of Na^+ channel (11, 29). In E13 mouse néocortex, veratridine induces a Ca^{2+} rise which depends mostly on external Ca^{2+} . However, voltage-dependent Ca^{2+} channels are not yet expressed at E13 (7, 10). It can be hypothesized that depolarization resulting from Na^+ entry might release the block of NMDA in the presence of ambient glutamate. This is not the case since NMDAR antagonists only partially inhibit the response to veratridine. Hence, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange may be responsible for Ca^{2+} influx. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is known to regulate intracellular Ca^{2+} ion concentration in neurons (29, 30) even if its role in Ca^{2+} entry may be minor in regard to that of voltage-dependent Ca^{2+} channels (31). KB-R7943 is a thio-urea derivative that selectively blocks the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger without affecting other ion transporters at concentrations up to 30 μM (18). This drug completely inhibits the veratridine-induced Ca^{2+} rise in PP cells at E13. Specific implication of the exchanger is also confirmed by the use of benzamil (19), another selective and potent inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. Immunofluorescence double-stainings demonstrate that NCXs and Na^+ channels are located in the same PP cell population, thereby confirming their

potential partnership. Thus, in these cells, Na^+ accumulated in response to veratridine is exchanged with external Ca^{2+} , leading to Ca^{2+} influx. Intracellular Ca^{2+} stores are known to be functional in the néocortex at this stage (14). Thapsigargin partially blocks the veratridine effect, indicating that intracellular stores may contribute to signal amplification, probably via calcium-induced calcium-release. Alternatively, thapsigargin-induced Ca^{2+} release could activate the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, leading to Ca^{2+} efflux and Na^+ influx (32), accounting for a decreased effect of veratridine in the presence of thapsigargin.

The spatial distribution of Na^+ channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers is consistent with functional recordings of I_{Na} in the PP (10), but is far more limited than the widespread Ca^{2+} response to veratridine. This suggests that there might be an additional and indirect mechanism involved in the spreading of the response. At this early stage of neurogenesis, synapses have not formed yet (21) and gap-junctions are not present in differentiated neuronal cells (22, 7). Radial glial cells could take part in communication between PP and VZ cells, even if their implication seems to occur later in development (33). At E13, some of the PP pioneer cells send processes towards the VZ (34). Cells may also communicate by paracrine means as reported in immature CA1 pyramidal neurons, before synapse formation (35). Our pharmacological studies, fluorescence visualization of exocytosis, immunolabeling and direct glutamate measurements provide converging evidence that Na^+ channel stimulation leads to glutamate secretion from PP cells and that this glutamate contributes to the Ca^{2+} signal observed in PP and VZ cells.

It is widely accepted that Na^+ channels must open before they can bind veratridine (11). This assumes that Na^+ channels are basically and physiologically active at E13, and it opens the question of the identity of a physiological activator of the Na^+ channel in PP cells. GABA and glycine are both excitatory transmitters during development (40, 41). In early mouse néocortex, GlyRs are known to be physiologically activated by non-synaptically released taurine (40) and GABA_A Rs are expressed in embryonic Cajal-Retzius cells (42). We show that GlyRs activation leads to a Ca^{2+} rise through a TTX-dependent pathway, thereby implicating Na^+ channels. Interestingly, 100 μM muscimol also induced a Ca^{2+} rise which is not prevented in the presence of TTX and therefore does not involve Na^+ channel activation (data not shown). Moreover, Ca^{2+} signaling activated by glycine spread to other cells in PP and VZ in a manner undistinguishable to that evoked by veratridine. At E13, glycine and taurine contents are at least 10 fold higher than GABA in néocortex (43), consistent with a major GlyR implication during cortical development. These observations underline the physiological relevance of the pathway described in this work, setting GlyRs as

potential actors implicated in early Na^+ channel activation, leading to the whole cascade of events described here.

This pathway is summarized in Figure 5. GlyR-dependent membrane depolarization or stimulation by veratridine induces a Na^+ entry into PP pioneer cells expressing a Na^+ channel. In these cells, Na^+ exchanges for Ca^{2+} via a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. The increase in intracellular Ca^{2+} triggers the release of vesicular glutamate into the extracellular medium. In turn, glutamate activates other PP and VZ cells, through paracrine and possibly autocrine communication. The absence of voltage-dependent Ca^{2+} channel expression at this developmental stage makes it possible to demonstrate unambiguously the direct involvement of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in Na^+ channel-mediated Ca^{2+} signaling. To our knowledge, this is the first direct evidence for the involvement of a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in Na^+ -dependent exocytosis.

Patterns of electrical and Ca^{2+} activity have a crucial significance in neurotransmitter expression in embryonic neurons (36). Consistently, our work shows that Na^+ channels emerge as soon as the first neurons are generated and that their immature activity controls neurotransmitter secretion in néocortex. Secreted neurotransmitters may then serve to regulate morphogenetic events, such as proliferation, growth, migration, differentiation and survival of neural precursor cells (23, 37). In mice, it has been shown that glutamate, distributed as a gradient in the neocortical wall from the pia to the VZ, stimulates proliferation in the VZ (4). As reported for mouse cerebellar granule cell migration (38, 39), glutamate probably also acts as a neuronal chemoattractant in néocortex, as well as in cultured murine embryonic cortical cells (6). Moreover, this would imply that both proliferative and neuronal migrating cells could potentially be involved in the Ca^{2+} signal recorded in the VZ.

Hence, before generating action potentials, Na^+ channels may carry out unusual functions in specific neuronal cells, perhaps in the interim prior to voltage-dependent Ca^{2+} channels expression. Preliminary evidence suggests that Na^+ channels are involved in spontaneous Ca^{2+} activity at E13, especially in cell synchrony which is strongly inhibited by TTX (Platel J. C. & Albrieux M., unpublished observations), suggesting a physiological role for Na^+ channels in both Ca^{2+} activity and cellular communication. Characterizing this role and the mechanisms involved may constitute a necessary step to fully unravel the functional implication of PP cells in cortical embryonic development.

REFERENCES

1. McConnell, S. K. (1995) *Neuron* 15, 761-8.
2. Marin-Padilla, M. (1998) *Trends Neurosci* 21, 64-71.
3. Spitzer, N. C., Kingston, P. A., Manning, T. J. & Conklin, M. W. (2002) *Curr Opin Neurobiol* 12, 315-23.
4. Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L. & Rakic, P. (2000) *J Neurosci* 20, 5764-5774.
5. LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B. & Kriegstein, A. R. (1995) *Neuron* 15, 1287-98.
6. Behar, T. N., Scott, C. A., Greene, C. L., Wen, X., Smith, S. V., Maric, D., Liu, Q. Y., Colton, C. A. & Barker, J. L. (1999) *J Neurosci* 19, 4449-61.
7. Picken-Bahrey, H. L. & Moody, W. J. (2003a) *Cereb Cortex* 13, 239-51.
8. Picken Bahrey, H. L. & Moody, W. J. (2003b) *J Neurophysiol* 89, 1761-73.
9. Corlew, R., Bosma, M. M. & Moody, W. J. (2004) *J Physiol* 560, 377-90
10. Albrieux, M., Platel, J. C., Dupuis, A., Villaz, M. & Moody, W. J. (2004) *J Neurosci* 24, 1719-25.
11. Ulbricht, W. (1998) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133, 1-54.
12. Cochilla, A.J., Angleson, J.K. & Betz, W.J. (1999) *Annu Rev Neurosci* 22, 1-10.
13. Windels, F., Bruet, N., Poupard, A., Urbain, N., Chouvet, G., Feuerstein, C. & Savasta, M. (2000) *Eur J Neurosci* 12, 4141-4146.
14. Faure, A. V., Grunwald, D., Moutin, M. J., Hilly, M., Mauger, J. P., Marty, I., De Waard, M., Villaz, M. & Albrieux, M. (2001) *Eur J Neurosci* 14, 1613-22.
15. Blaustein, M. P. & Lederer, W. J. (1999) *Physiol Rev* 79, 763-854.
16. Maric, D., Maric, I., Chang, Y. H. & Barker, J. L. (2000a) *Cereb Cortex* 10, 729-47.
17. Maric, D., Maric, I. & Barker, J. L. (2000b) *Cereb Cortex* 10, 561-73.
18. Iwamoto, T., Watano, T. & Shigekawa, M. (1996) *J Biol Chem* 271, 22391-7.
19. Smith J. P., Cunningham L. A. & Partridge L. D. (2000) *Brain Res* 887, 98-109.
20. Thurneysen, T., Nicoll, D. A., Philipson, K. D. & Porzig H (2002) *Mol Brain Res* 107:145-56.
21. Molnar, Z. & Blakemore, C. (1995) *Trends Neurosci* 18, 389-97.
22. Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1991) *Science* 252, 563-6.
23. Cameron, H. A., Hazel, T. G. & McKay, R. D. (1998) *J Neurobiol* 36, 287-306.

24. Bicalho, A. F., Guatimosim, C., Prado, M. A., Gomez, M. V. & Romano-Silva, M. A. (2002) *Neuroscience* 113, 115-23.
25. Romey, G. & Lazdunski, M. (1982) *Nature* 297, 79-80.
26. Stier, C., Skorka, G., Sohr, R. & Ott, T. (1996) *Neuroreport* 7, 401-4.
27. do Nascimento, J. L., Ventura, A. L. & Paes de Carvalho, R. (1998) *Brain Res* 798, 217-222.
28. Halmosa, G., Gaborjan, A., Lendvai, B., Repassy, G., Szabo, L. Z. & Vizi, E. S. (2000) *Hear Res* 144,89-96.
29. Mulkey, R. M. & Zucker, R. S. (1992) *J Neurosci* 12, 4327-4336.
30. Koch, R. A. & Barish, M. E. (1994) *J Neurosci* 14, 2585-2593.
31. Meder, W., Fink, K., Zentner, J. & Gothert, M. (1999) *J Pharmacol Exp Ther* 290, 1126-31.
32. Chernaya, G., Vasquez, M. & Reeves, J. P. (1996) *J Biol Chem* 271, 5378-85.
33. Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C. & Kriegstein, A. R. (2004) *Neuron* 43, 647-61.
34. Meyer, G., Soria, J. M., Martinez-Galan, J. R., Martin-Clemente, B. & Fairen, A. (1998) *J Comp Neurol* 397, 493-518.
35. Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Aniksztejn, L. (2002) *Neuron* 36, 1051-1061.
36. Borodinsky, L. N., Root, C. M., Cronin, J. A., Sann, S. B., Gu, X. & Spitzer, N. C. (2004) *Nature* 429, 523-30.
37. Nguyen, L., Rigo, J. M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P. & Moonen, G. (2001) *Cell Tissue Res* 305, 187-202.
38. Komuro, H. & Rakic, P. (1993) *Science* 260, 95-7.
39. Rossi, D. J. & Slater, N. T. (1993) *Neuropharmacology* 32, 1239-48.
40. Flint, A. C., Liu, X. & Kriegstein, A. R. (1998) *Neuron* 20, 43-53.
41. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J. L. (1989) *J Physiol* 416, 303-25.
42. Mienville, J. M. (1998) *J Physiol* 512, 809-17.
43. Benitez-Diaz, P., Miranda-Contreras, L., Mendoza-Briceno, R. V., Pena-Contreras, Z. & Palacios-Prü, E. (2003) *Dev Neurosci* 25, 366-74.
44. Mienville, J. M. & Pesold, C. (1999) *J Neurosci* 19, 1636-1646.
45. Morante-Oria, J., Carleton, A., Ortino, B., Kremer, E. J., Fairen, A, Lledo, P. M. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12468-73.

Acknowledgments: We thank Prof. WJ Moody for introduction in the brain development field and stimulating discussions. We thank Prof. Nick Spitzer and Dr Nicolas Hussey for valuable suggestions and incisive discussions. We wish to thank Dr M. De Waard for his unvaluable support. We thank Prof. H. Porzig and Prof. K. Philipson for providing anti-NCXs antibodies. This work was funded by the University Joseph Fourier, the CEA Grenoble and INSERM. J. C. Platel was supported by an Emergence fellowship from the Rhône-Alpes Region.

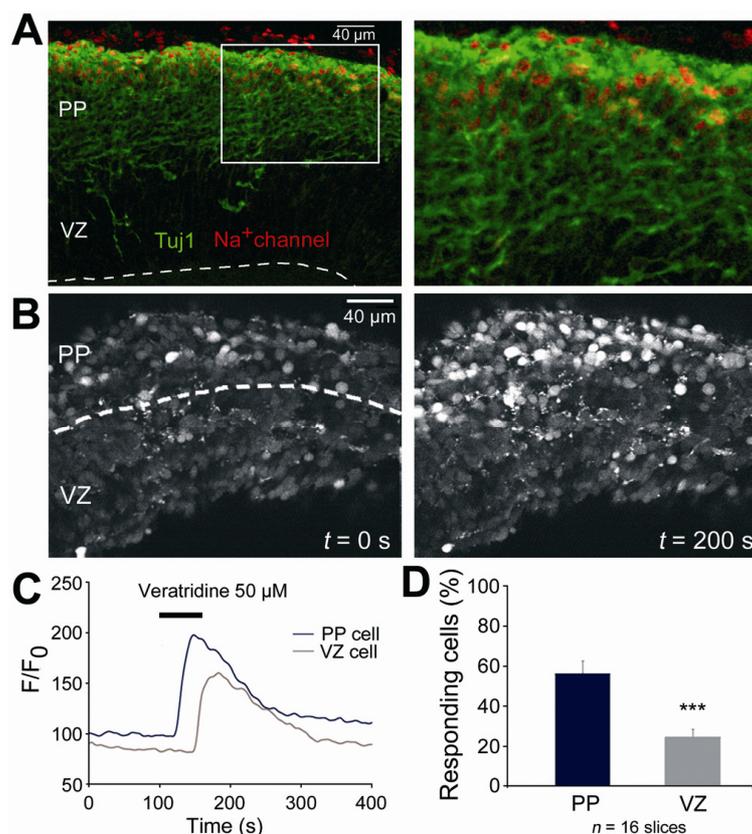


Figure 1. Activation of Na⁺ channels leads to Ca²⁺ activity in mouse neocortical slices. *A*, Na⁺ channel staining (red) labels most cells in the upper PP. Neuronal cells are identified with the TuJ1 staining (green). Upper meninges layer is TuJ1 negative and the dotted white line represents the ventricular border of the slice. *B*, Example of a fluorescence increase induced by 50 μM veratridine applied upon a E13 cortex slice loaded with 5 μM Fluo-4 AM. *C*, Corresponding fluorescence variations measured in two typical cells, one in the PP and one in the VZ, of the slice shown in *B*. *D*, Percentage of responding cells upon veratridine stimulation in the PP and VZ (*n* = 16 slices, 1281 and 2511 cells in the PP and in the VZ respectively).

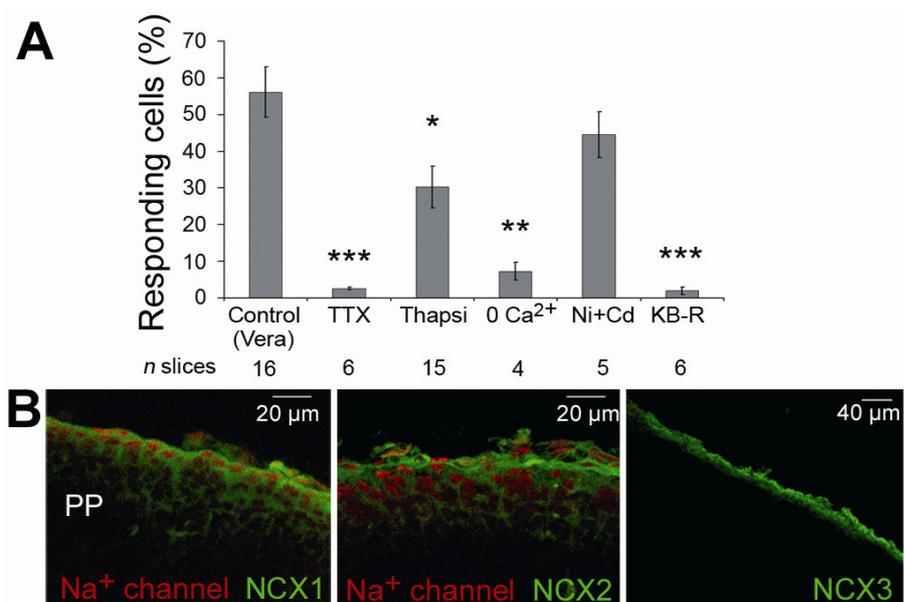


Figure 2. Na⁺/Ca²⁺ exchange is responsible for Na⁺-mediated Ca²⁺ signaling. *A*, Percentage of responding PP cells after 60 s of 50 μM veratridine application in presence of ACSF (control; *n* = 16 slices/1281 cells); TTX (1 μM tetrodotoxin; *n* = 6 slices/335 cells); Thapsi (2 μM thapsigargin; *n* = 15 slices/1242 cells); 0 Ca²⁺ (ACSF - 0 Ca²⁺ - 1 mM EGTA; *n* = 4 slices/240 cells); Ni²⁺ + Cd²⁺ (200 μM NiCl₂ + 200 μM CdCl₂; *n* = 3 slices/201 cells); KB-R (1 μM KB-R7943; *n* = 6 slices/655 cells). *, significantly different from control (vera). *B*, Immunofluorescence labelling of each of the three Na⁺/Ca²⁺ exchanger subtypes (NCX 1, 2 and 3) in green. NCX1 and NCX2 are co-expressed with Na⁺ channel staining (red) in most cells.

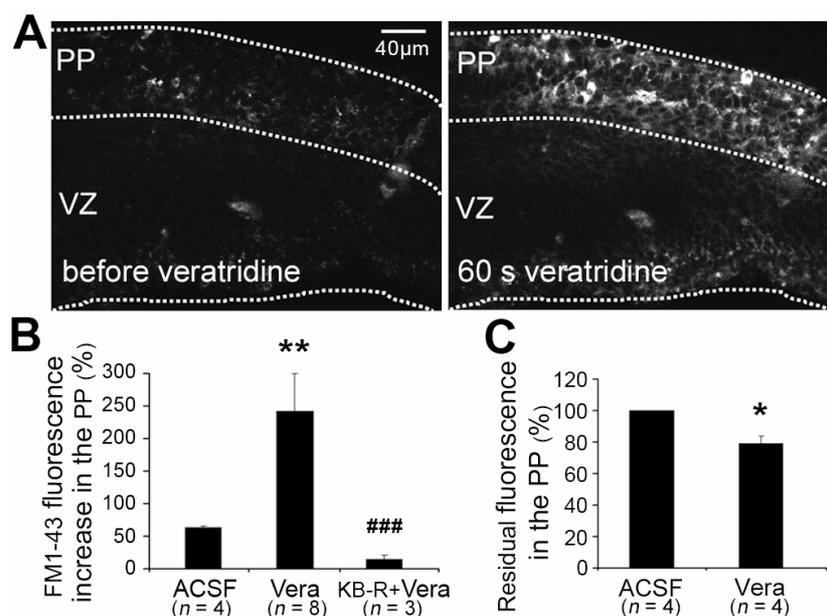


Figure 3. Veratridine-mediated Na⁺ channel activation induces exocytosis in PP cells.

A, FM1-43 fluorescence in slices treated with veratridine : the left panel shows the basal fluorescence, 30 seconds after the beginning of FM1-43 perfusion. The right panel shows the same slice one minute after application of 50 µM veratridine. *B*, FM1-43 fluorescence increase in the whole PP measured 120 seconds after the beginning of the FM1-43 perfusion. KB-R7943 is preincubated 2 minutes before and during FM1-43 perfusion. (*, significantly different from ACSF; #, significantly different from veratridine). *C*, Residual fluorescence, after a 5-minute wash of external FM1-43, measured after 1 minute in ACSF or in 50 µM veratridine.

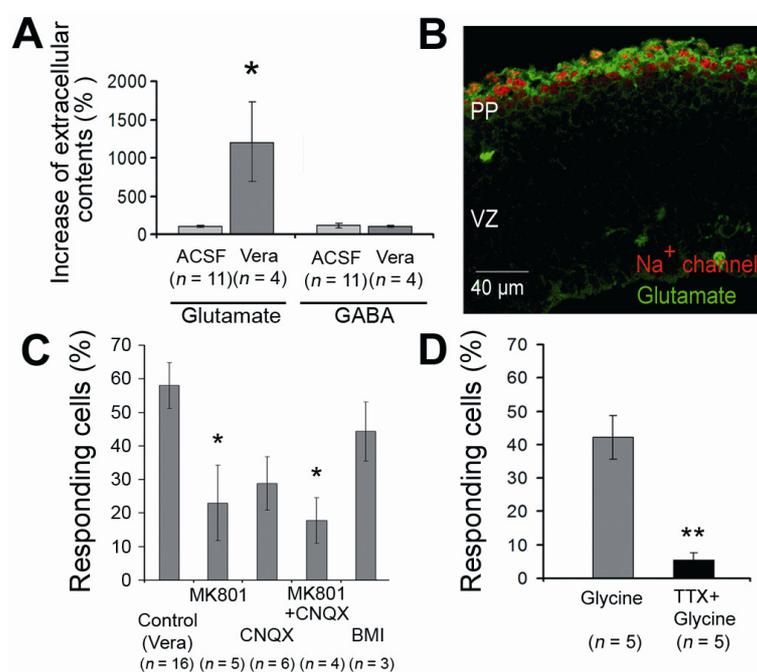


Figure 4. Na⁺ channel activation leads to glutamate secretion and can be physiologically activated by GlyRs. *A*, HPLC measurement of extracellular glutamate and GABA from neocortices incubated in 50 μM veratridine versus ACSF, during 3 minutes. All results are expressed as percentage of measures done at $t = 0$. *B*, Glutamate staining (green) in E13 cortex slices coincides with the Na⁺ channel staining (red) in the PP. *C*, Percentage of responding PP cells after 60 s of 50 μM veratridine application in the presence of ACSF (control; $n = 16$ slices/1281 cells); CNQX (10 μM; $n = 6$ slices/454 cells), MK801 (100 μM; $n = 5$ slices/422 cells); CNQX+MK801 ($n = 4$ slices/337 cells); BMI (20 μM bicuculline; $n = 3$ slices/230 cells). *, significantly different from control (vera). *D*, Percentage of responding PP cells after 60 s of 1 mM glycine application in presence of ACSF (control, $n = 5/x$ cells) or 1 μM TTX ($n = 5/y$ cells).

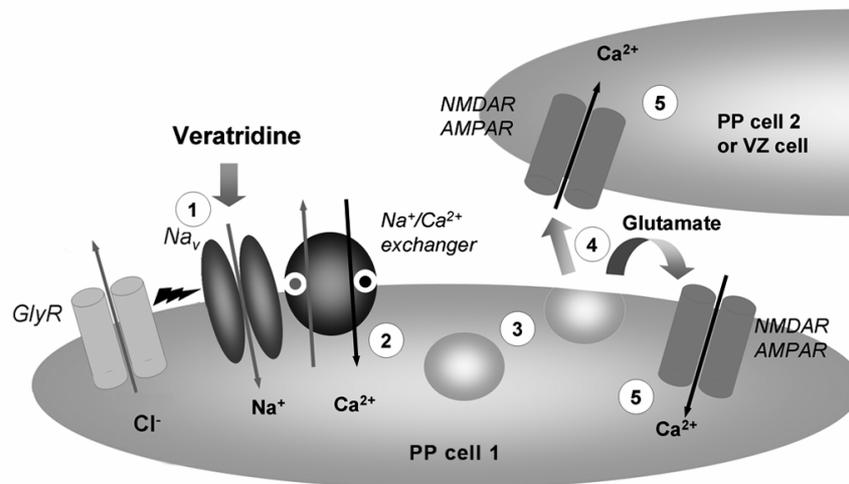


Figure 5. Schematic representation of the chain reaction triggered by activation of preplate neurons Na^+ channels in E13 néocortex. Stimulation of the Na^+ channel results in a transient influx of Na^+ [1]. Exchange of this Na^+ with extracellular Ca^{2+} via a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger induces a Ca^{2+} rise in the corresponding PP neurones [2]. The Ca^{2+} increase triggers exocytosis in these cells [3], leading to glutamate secretion in the extracellular medium [4]. Glutamate activates cells in the PP and VZ, through autocrine and/or paracrine communication mechanisms [5]. This results in Ca^{2+} increase in a larger neocortical wall cell population. GlyR may be the primary Na^+ channel activator *in vivo*.

Quatrième partie : Rôle de la signalisation calcique dans la corticogénèse

Les résultats obtenus dans les chapitres précédents nous ont amené à nous interroger sur les fonctions de l'activité calcique spontanée et de la voie de signalisation induite par les récepteurs glycinergiques. Pour cela, nous avons recherché un modèle expérimental nous permettant d'étudier l'effet de l'altération de cette signalisation calcique sur le néocortex en développement.

Plusieurs approches avaient déjà été utilisées dans le même but. Une technique consistant à injecter en intra-ventriculaire des drogues à l'embryon *in utero* a donné des résultats prometteurs mais elle est pratiquée à des stades plus tardifs et est très difficile à mettre en œuvre au stade E13. La technique de culture organotypique statique de tranches a été développée initialement par Luc Stoppini sur de l'hippocampe postnatal (Stoppini *et al.*, 1991). L'équipe de Pasko Rakic a continué la mise au point de cette technique en l'appliquant aux mesures de prolifération et de migration dès le stade E13 (Haydar *et al.*, 1999). Dans ces cultures, les tranches de cerveau, d'une épaisseur de 400 μm , sont déposées sur une membrane perméable qui permet la diffusion du milieu de culture. La tranche est recouverte par le milieu de culture qui forme un film de faible épaisseur autorisant une bonne oxygénation de la tranche. Le tissu, dans ces conditions, conserve son intégrité pendant 48 h. Nous avons, dans un premier temps, utilisé cette technique en adaptant les conditions décrites par cette équipe à notre modèle.

L'étude de la prolifération des cellules précurseurs et de la migration des cellules filles s'effectue en injectant du BrdU à la mère afin de marquer les cellules précurseurs en phase S. L'utilisation de marqueurs neuronaux telle que la tubuline β -III (TuJ1) et gliaux tel que RC2 permet ensuite de vérifier la structure de la tranche et d'indexer la migration neuronale. Ce système n'était néanmoins pas très satisfaisant : nous avons notamment pu observer que seule la partie située au centre de l'épaisseur de la tranche conserve un développement relativement "normal". Une autre limite importante de ce modèle de culture est due au fait que les méninges se détachent lors de la réalisation des tranches épaisses. Or, il a été démontré que leur présence est essentielle pour la survie des cellules de Cajal-Retzius (Super *et al.*, 1997),

ce qui est très gênant dans le contexte de notre problématique. De plus, dans ces expériences, les tranches d'une épaisseur de 400 μm et d'une largeur approximative de 100 μm sont très fragiles et très difficiles à manipuler. Pour réaliser des immuno-marquages, ces tranches épaisses sont recoupées en tranche fine de 10 μm et on conserve uniquement les tranches fines du milieu de la préparation. Des améliorations ont été apportées récemment par l'équipe d'André Goffinet en cultivant ces tranches dans une atmosphère oxygénée, ce qui augmente considérablement l'intégrité de la tranche (Jossin *et al.*, 2003).

Nous avons réalisé des immuno-marquages après 24 h de culture que nous avons comparé à des marquages de tranches non cultivées, prélevées au stade E14. L'orientation radiale des prolongements des cellules gliales radiaires est respectée et les marquages des neurones sont similaires, confirmant l'intégrité de ce modèle (Figure 28, comparer les panneaux du milieu et du haut). De plus, le marquage BrdU est cohérent avec ce qu'on doit obtenir après 24 h de culture : la majorité des cellules sont en phases M, G1 ou G2 et quelques unes semblent avoir migré hors de la VZ (Figure 32, panneau du milieu à droite).

Avant d'utiliser ces cultures, nous avons essayé lors des expériences d'imagerie calcique, d'appliquer soit de la TTX, soit l'antagoniste de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (KB-R7943). Ces 2 antagonistes ne bloquent que très peu les activités spontanées (de l'ordre de 20%, $n = 6$ pour la TTX et $n = 5$ pour le KB-R7943). En revanche des premiers résultats nous laissent entrevoir que la TTX bloquerait la synchronie entre les cellules, comme c'est le cas en postnatal (Schwartz *et al.*, 1998). En utilisant les cultures de tranche, nous avons essayé de voir l'impact d'un blocage de ces canaux sodiques sur la corticogenèse. L'application de TTX ne semble perturber ni la migration, ni la prolifération. La structure de la tranche reste normale, un des seuls effets phénotypiques visibles semble être une diminution de la largeur du mur néocortical.

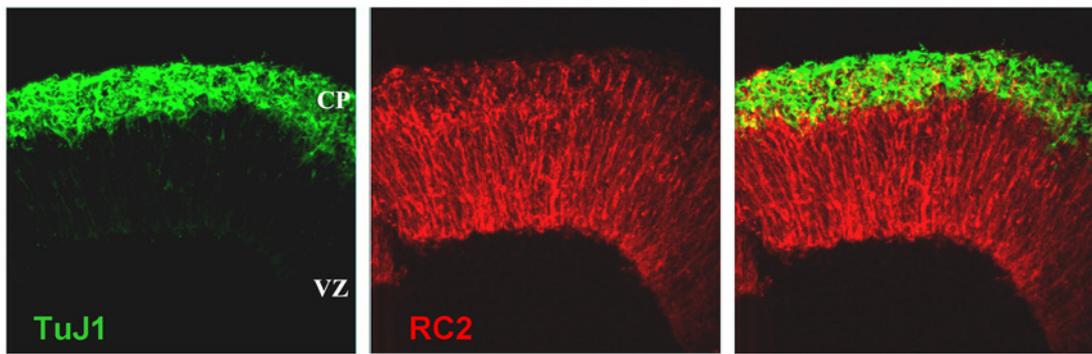
Le KB-R7943 que nous avons utilisé lors des expériences d'imagerie calcique bloque uniquement le mode reverse de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et ne devrait donc pas perturber le fonctionnement physiologique de l'échangeur en mode "forward". L'application de cet inhibiteur sur les tranches en culture nous a permis d'observer une désorganisation totale de la structure des cellules gliales radiaires. La répartition des précurseurs marqués par le BrdU est également fortement perturbée : il existe des zones où la progression des cellules dans le cycle cellulaire semble s'être arrêté (Figure 28). La migration est également fortement perturbée

puisque très peu de cellule sortent de la VZ. Cette différence d'effet observée pour le KB-R versus la TTX suggère, s'il est confirmé, que l'échangeur a un effet plus ubiquitaire que les canaux sodiques, peut-être en étant couplé à d'autres canaux également impliqués dans l'activité calcique.

Ces résultats nécessitent une analyse informatique statistique plus poussée permettant de quantifier l'épaisseur de la tranche, l'étendue des marquages tels que TuJ1, la localisation et le nombre de noyaux cellulaires marqués par le BrdU. Plusieurs contrôles seront également nécessaires pour confirmer ces résultats. A commencer par l'utilisation d'un autre inhibiteur de l'échangeur, tel que le benzamil qui agit sur un autre site que le KB-R7943 (Smith *et al.*, 2000). Le blocage des récepteurs glycinergiques et glutamatergiques sera également la prochaine étape pour confirmer l'implication de la cascade identifiée dans la corticogenèse. Une des limites de cette approche est le risque de faire face à des systèmes redondants et compensateurs, qui pourraient masquer la fonction de chacun des acteurs.

Mais globalement, les résultats préliminaires obtenus avec cette technique de culture organotypique de tranche sont très prometteurs et laissent envisager l'obtention de nombreuses informations (qui devront être confirmées par ailleurs) sur le rôle physiologique de l'activité calcique dans la corticogenèse précoce. Plus généralement, le blocage spécifique de chaque canal et récepteur présent nous fournirait des informations importantes sur le rôle joué par chacun dans ces processus que sont la prolifération, la migration et la différenciation.

Cerveau E14



Cerveau E13 - 1 DIV - contrôle

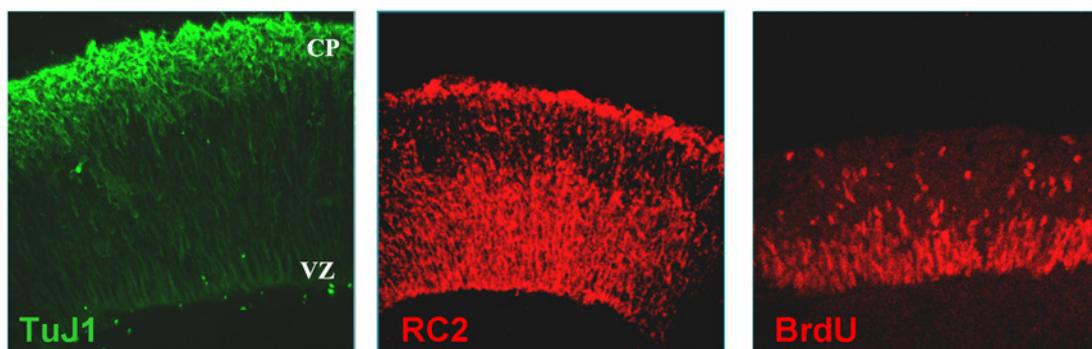
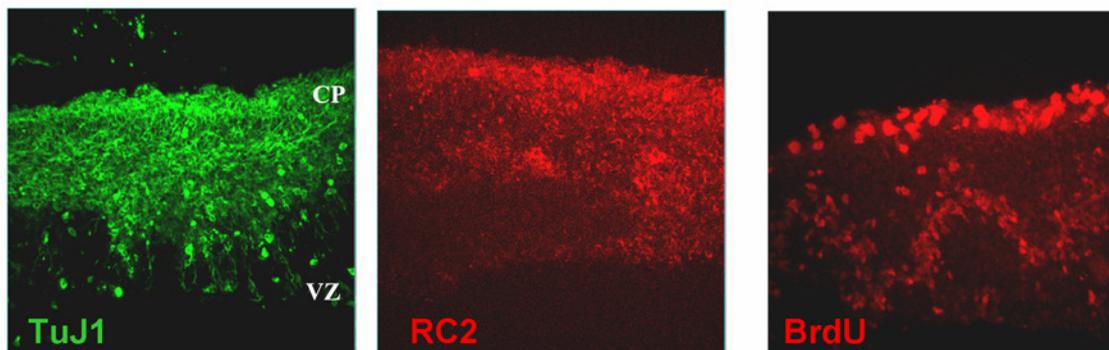
Cerveau E13 - 1 DIV - KBR 1 μ M

Figure 28: Culture organotypique de tranche de cerveau.

Panneau du haut : tranche de cerveau contrôle non cultivée au stade E14.

Panneau du milieu : tranche de cerveau contrôle au stade E13 après 24 heures de culture.

Panneau du bas : tranche de cerveau au stade E13 cultivée 24 heures en présence d'un antagoniste des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (KB-R7943, 1 μ M).

Discussion et Perspectives

L'expression des canaux ioniques membranaires constitue une des premières étapes de la mise en place d'une activité électrique cérébrale. Nous avons cherché à déterminer le rôle précis de ces canaux dans cette activité, ainsi que la fonction jouée par ces mécanismes dans le développement du néocortex.

Nos premières expériences avaient pour but d'établir une cartographie de l'expression des canaux dépendants du voltage. L'utilisation de l'électrophysiologie et de la RT-PCR sur cellule unique nous a permis de montrer que plusieurs populations de neurones pionniers de la préplaque expriment des canaux sodiques et potassiques. L'apparition des canaux sodiques nous amène à penser qu'ils sont une des caractéristiques de la différenciation neuronale de ces cellules. Néanmoins, les neurones de la couche I ne seront capables de déclencher des potentiels d'action qu'à partir de P0 (Zhou & Hablitz, 1996 ; Picken Bahrey & Moody, 2003). L'expression précoce de ces canaux sodiques nous a suggéré qu'ils participaient à la mise en place d'une première excitabilité, différente de celle connue chez l'adulte, à l'image des activités décrites par Spitzer dans les neurones de la moelle épinière de Xénope (Spitzer *et al.*, 2000).

L'activité calcique spontanée présente dans le néocortex possède des profils similaires à ceux observés dans les neurones de la moelle épinière de Xénope. L'apparition de l'activité est corrélée à l'expression de canaux sodiques. Il a été montré dans le laboratoire que les stocks calciques intracellulaires sont présents et fonctionnels dès E13 (Faure *et al.*, 2001). Le récepteur de l'InsP₃ est exprimé dans toutes les cellules néocorticales, en revanche le récepteur de la ryanodine est fonctionnel uniquement dans 60% des neurones. Dans l'ovocyte d'ascidie, les stocks calciques sensibles à la ryanodine ou à l'InsP₃ sont des acteurs cruciaux dans les premières étapes de la fécondation avec cependant des rôles différents (Albrieux *et al.*, 1997). Notre hypothèse initiale était que ces stocks, de par leur localisation différente dans le néocortex, étaient en partie responsables des activités calciques spontanées : l'expression du récepteur de la ryanodine uniquement dans certaines cellules neuronales, permettait éventuellement d'expliquer les profils d'activité différents observés entre les cellules de la PP et celles de la VZ. Cependant, nous avons montré qu'aux stades E13 et E14, ces stocks ne sont

pas impliqués dans le déclenchement de ces activités. En revanche, ils contribuent à leur amplification certainement par un mécanisme de CICR. Au stade E14, les activités calciques dans les cellules neuronales ont un profil de pics calciques alors que dans la zone ventriculaire, ces activités sont plus longues et ont plutôt un aspect de vagues calciques. La concentration cytoplasmique de calcium, et surtout la durée pendant laquelle elle reste élevée, conditionnent l'effet développementale du calcium (Gu & Spitzer, 1997). Or, le profil de ces activités est modifié lorsque les stocks calciques intracellulaires sont déplétés, avec notamment un raccourcissement des profils, suggérant un rôle de ces stocks dans la transduction du signal calcique liée au codage de l'information. Le blocage de la libération de calcium par les stocks intracellulaires, soit dans les cellules neuronales en bloquant le récepteur de la ryanodine, soit dans toutes les cellules en bloquant le récepteur de l'InsP3, dans des expériences de culture organotypique nous permettrait de mieux comprendre leur rôle dans la corticogenèse.

L'observation de l'activité calcique spontanée sur l'ensemble de la population laisse apparaître des synchronies entre certaines cellules. A l'échelle de temps que nous avons utilisée (une acquisition toutes les 4 s), il semble plus judicieux de parler de communication entre les cellules plutôt que de synchronie. Ces résultats seraient une démonstration de l'existence d'une communication au sein de la VZ, à la fois entre des cellules d'un même cluster (Lo Turco & Kriegstein, 1991) mais également entre des cellules appartenant à des colonnes corticales différentes (Rakic, 2000). Il est possible que cette communication intervienne dans la synchronisation des cellules au cours du cycle cellulaire ou encore dans la communication cellule-mère/cellule-fille neuronale. Dans ce contexte, il serait très intéressant de rechercher si, au sein de la VZ, l'activité calcique évolue au cours du cycle cellulaire. La sulforhodamine 101 est un fluorophore capturé spécifiquement par les astrocytes (Nimmerjahn *et al.*, 2004). Il est fort possible que les cellules gliales radiaires puissent être marquées par cette molécule. Ceci nous permettrait lors des expériences d'imagerie calcique d'identifier les cellules précurseurs. Comme la position du noyau oscille dans l'épaisseur de la VZ au cours du cycle cellulaire, nous pourrions ajouter une fonction dans notre logiciel d'analyse Calsignal, qui permettrait de classer ces activités suivant la localisation du noyau par rapport à la bordure ventriculaire. Une communication entre les neurones de la PP et les cellules de la VZ a également été observée. Cette communication est fascinante puisqu'elle signifie qu'il pourrait exister un dialogue entre les cellules neuronales et les précurseurs. On peut imaginer qu'elle pourrait influencer sur la vitesse de prolifération (Haydar *et al.*, 2000), mais

il est également envisageable de retrouver un mécanisme similaire à celui observé dans les neurones de la moelle épinière de xénope (Borodinsky *et al.*, 2004) : si l'activité neuronale est trop importante les cellules précurseurs se différencieraient alors plutôt en neurones inhibiteurs, et réciproquement. Il est possible d'augmenter le niveau d'activité, en appliquant de faibles concentrations de vératridine (phénomène déjà observé sur tranche pour des concentrations de l'ordre de 10 μM) ou en augmentant la concentration de KCl à 50mM (Schwartz *et al.*, 1998). Des immuno-marquages permettraient d'observer l'expression de ces neurotransmetteurs dans les populations neuronales 24 ou 48 h après.

Nous avons entrepris d'élucider les mécanismes moléculaires de ces activités. Nous avons ainsi recherché la présence de certains acteurs de la signalisation calcique. L'expression précoce des récepteurs du GABA, du glutamate et de la glycine dans la PP a été surprenante puisque ces neurones pionniers étaient considérés comme "immatures". L'étude histologique de la distribution de ces récepteurs dans les différents types cellulaires du néocortex au stade E13 nous permettrait de mieux comprendre le rôle joué par chacun, et surtout de connaître, au niveau cellulaire, les interactions possibles entre ces récepteurs. Lors de la migration, la chémo-attraction jouée par le glutamate ou le GABA permettait de justifier l'expression précoce de ces récepteurs (Behar *et al.*, 1996; Behar *et al.*, 1999). Mais comme nous l'avons déjà vu, les neurones pionniers arrivent dans la PP par translocation nucléaire avant la présence de neurotransmetteurs. La présence de ces récepteurs dans les cellules neuronales, avant même la présence de synapses, signifie qu'ils ont une fonction différente, comme par exemple de participer à la communication paracrine au sein de la PP.

L'expression de canaux sodiques a également pu être reliée à la signalisation calcique. L'activation de ces canaux par la vératridine entraîne une importante augmentation de calcium. La réponse de certaines cellules dans la VZ nous a intrigué et nous a amené à émettre l'hypothèse que ces canaux sodiques pouvaient être impliqués dans une communication intercellulaire, via un signal calcique. Nous avons alors cherché à disséquer les mécanismes qui conduisaient, après activation de ces canaux, à une augmentation de calcium dans tout le mur néocortical. Les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont connus pour réguler la concentration intracellulaire de calcium en l'extrudant contre du sodium. Le KB-R7943 est un antagoniste des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui bloque uniquement le mode reverse de l'échangeur, (calcium extracellulaire échangé contre du sodium intracellulaire). Cette drogue bloque complètement l'effet de la vératridine. L'implication des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est confirmée

par l'utilisation du benzamil, un autre bloqueur des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ agissant sur un autre site que le KB-R7943 (Smith *et al.*, 2000). Nous avons également montré que les canaux sodiques et les échangeurs sont tout deux localisés dans la bordure externe de la préplaque, dans les mêmes cellules, confirmant ainsi leur association fonctionnelle potentielle.

Cette localisation ne permet pas d'expliquer l'étendue de l'effet de la vératridine. Durant les premières étapes de la neurogenèse, les synapses ne sont pas encore formées (Molnar & Blakemore, 1995) et les jonctions communicantes ne sont pas présentes dans les cellules neuronales (Bahrey & Moody, 2003). Les cellules gliales radiaires sont de bons candidats pour participer à cette propagation puisqu'il a été montré qu'elles participaient, plus tard à E16, à des vagues calciques dans le néocortex (Weissman *et al.*, 2004). De plus, des courants sodiques ont pu être enregistrés dans ces cellules à partir du stade E14. Néanmoins, nos études pharmacologiques combinées à la mise en évidence d'une exocytose ainsi que la mesure directe de la libération de glutamate convergent toutes vers l'idée que l'activation des canaux sodiques entraîne une sécrétion de glutamate. Ces résultats représentent, à ma connaissance, la première démonstration d'une communication paracrine à un stade si précoce. Ce genre de communication impliquant le GABA a déjà été observé dans l'hippocampe (Demarque *et al.*, 2002) et lors de la neurogenèse postnatal dans la SVZ (Liu *et al.*, 2005) et pourrait donc représenter un moyen de communication plus générale dans le cerveau, lors de la neurogenèse.

La vératridine en se fixant sur les canaux sodiques bloque leur inactivation et provoque donc une entrée de Na^+ artificielle. Si notre modèle est exact, il doit exister un activateur physiologique de ces canaux. Le GABA et la taurine sont tous deux présents dans le mur néocortical au stade E13 (Benitez-Diaz *et al.*, 2003). Ces 2 neurotransmetteurs peuvent avoir un effet excitateur lors du développement (Ben-Ari *et al.*, 1989 ; Flint *et al.*, 1998). Ils pourraient dépolariser les cellules et induire l'ouverture des canaux sodiques. Nous avons montré que l'activation des récepteurs glycinergiques entraîne une augmentation de calcium sensible à la TTX, impliquant donc les canaux sodiques. De plus, cette signalisation calcique activée par les récepteurs glycinergiques se propage dans la PP et la VZ de la même façon que l'effet de la vératridine. A l'inverse, bien que l'activation des récepteurs GABA_A entraîne également une augmentation de calcium, cet effet ne semble pas passer par l'activation des canaux sodiques. Le rôle joué par les récepteurs GABA_A reste donc pour l'instant inconnu et nécessiterait investigation.

La taurine est connue pour jouer un rôle lors du développement cortical : les récepteurs glycinergiques sont activés physiologiquement dans les neurones de la plaque corticale par une libération non synaptique de taurine (Flint *et al.*, 1998). La dépolarisation induite par ces récepteurs entraîne l'activation des récepteurs NMDA et ainsi une augmentation de calcium. L'utilisation de la microdialyse dans l'hippocampe chez le lapin en postnatal, ont montré que l'activation des récepteurs du glutamate entraîne une libération de taurine (Lehmann *et al.*, 1985). Il s'agirait alors d'une sorte de boucle de régulation où les sécrétions de ces neurotransmetteurs se contrôlent l'une l'autre. Toutes ces données vont dans le sens d'une relation forte entre systèmes glutamatergique et glycinergique. Chez le chat, des carences en taurine lors de la gestation entraînent un certain nombre de malformations (Sturman *et al.*, 1994). Notamment, la lamination corticale est perturbée, l'épaisseur de chaque couche étant réduite alors que la couche I ne présente aucun problème apparent. Ceci laisserait envisager un rôle des récepteurs glycinergiques, non pas dans la formation de la couche I, mais plutôt dans la formation de la plaque corticale. Selon notre modèle, si les récepteurs glycinergiques ne sont plus activés alors toute la cascade de signalisation consécutive serait bloquée et le glutamate ne serait plus secrété. La mutation du gène *doublecortine* était connue pour perturber la migration neuronale. Il a été montré que cette mutation affectait également le nombre de cellules de Cajal-Retzius présente dans la PP ainsi que leur morphologie (Meyer *et al.*, 2002). Des expériences d'ablation ou de dégénération de la couche I chez le rat ont également abouti à des défauts de lamination (Super *et al.*, 1997). Ces observations montrent que des altérations des cellules de la couche I entraînent des problèmes de migration et de formation des couches corticales à l'image de ce qui est observé dans de nombreuses dysplasies.

Les expériences de culture organotypique nous ont d'ores et déjà permis d'observer, que le blocage de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ induit une désorganisation de la structure corticale. Les fibres radiaires sont désorganisées ce qui va perturber la migration et la lamination (Figure 28). La prolifération dans la VZ semble également affectée. Ces cultures *in vitro* peuvent donc se révéler un outil performant, permettant de transposer nos résultats mécanistiques à un niveau plus intégré, au niveau de la formation laminaire du cortex. Les résultats de ces études pourront par la suite donner les bases pour des investigations *in vivo*.

La caractérisation du rôle et de la mécanistique de cette signalisation calcique précoce constitue une étape primordiale dans la compréhension du développement cortical embryonnaire. Les cellules de la préplaque sont déjà connues pour le rôle qu'elles jouent dans cette corticogenèse. Nous venons de découvrir un nouveau mécanisme permettant de compléter la liste de leurs implications développementales mais il semble que ces cellules, découvertes il y a plus de 100 ans, possèdent encore bien des secrets...

Bibliographie

- Aguilo, A., T. H. Schwartz, V. S. Kumar, Z. A. Peterlin, A. Tsiola, E. Soriano et R. Yuste (1999). "Involvement of cajal-retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice." *J Neurosci* **19**(24): 10856-68.
- Albrieux, M., J. C. Platel, A. Dupuis, M. Villaz et W. J. Moody (2004). "Early expression of sodium channel transcripts and sodium current by cajal-retzius cells in the preplate of the embryonic mouse neocortex." *J Neurosci* **24**(7): 1719-25.
- Albrieux, M., C. Sardet et M. Villaz (1997). "The two intracellular Ca²⁺ release channels, ryanodine receptor and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, play different roles during fertilization in ascidians." *Developmental Biology* **189**(2): 174-85.
- Allen, K. M. et C. A. Walsh (1999). "Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex." *Epilepsy Res* **36**(2-3): 143-54.
- Anderson, S. A., O. Marin, C. Horn, K. Jennings et J. L. Rubenstein (2001). "Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences." *Development* **128**(3): 353-63.
- Bahrey, H. L. et W. J. Moody (2003). "Voltage-gated Currents, Dye and Electrical Coupling in the Embryonic Mouse Neocortex." *Cereb Cortex* **13**(3): 239-51.
- Beckh, S., M. Noda, H. Lubbert et S. Numa (1989). "Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development." *Embo J* **8**(12): 3611-6.
- Behar, T. N., Y. X. Li, H. T. Tran, W. Ma, V. Dunlap, C. Scott et J. L. Barker (1996). "GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms." *Journal of Neuroscience* **16**(5): 1808-18.
- Behar, T. N., A. E. Schaffner, C. A. Scott, C. L. Greene et J. L. Barker (2000). "GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex." *Cereb Cortex* **10**(9): 899-909.
- Behar, T. N., C. A. Scott, C. L. Greene, X. Wen, S. V. Smith, D. Maric, Q. Y. Liu, C. A. Colton et J. L. Barker (1999). "Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration." *J Neurosci* **19**(11): 4449-61.
- Behar, T. N., S. V. Smith, R. T. Kennedy, J. M. McKenzie, I. Maric et J. L. Barker (2001). "GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells." *Cereb Cortex* **11**(8): 744-53.
- Ben-Ari, Y. (2001). "Developing networks play a similar melody." *Trends Neurosci* **24**(6): 353-60.
- Ben-Ari, Y., E. Cherubini, R. Corradetti et J. L. Gaiarsa (1989). "Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones." *J Physiol* **416**: 303-25.
- Ben-Ari, Y., I. Khalilov, A. Represa et H. Gozlan (2004). "Interneurons set the tune of developing networks." *Trends Neurosci* **27**(7): 422-7.
- Benitez-Diaz, P., L. Miranda-Contreras, R. V. Mendoza-Briceno, Z. Pena-Contreras et E. Palacios-Pru (2003). "Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex." *Dev Neurosci* **25**(5): 366-74.
- Bentivoglio, M. et P. Mazzarello (1999). "The history of radial glia." *Brain Res Bull* **49**(5): 305-15.
- Borodinsky, L. N., C. M. Root, J. A. Cronin, S. B. Sann, X. Gu et N. C. Spitzer (2004). "Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons." *Nature* **429**(6991): 523-30.

- Bruckner, G. et D. Biesold (1981). "Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells." *J Neurocytol* **10**(5): 749-57.
- Caviness, V. S., Jr. et P. Rakic (1978). "Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice." *Annu Rev Neurosci* **1**: 297-326.
- Chanas-Sacre, G., B. Rogister, G. Moonen et P. Leprince (2000). "Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation." *J Neurosci Res* **61**(4): 357-63.
- Corlew, R., M. M. Bosma et W. J. Moody (2004). "Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones." *J Physiol* **560**(Pt 2): 377-90.
- Cotter, D. R., M. Honavar et I. Everall (1999). "Focal cortical dysplasia: a neuropathological and developmental perspective." *Epilepsy Res* **36**(2-3): 155-64.
- De Carlos, J. A., L. Lopez-Mascaraque et F. Valverde (1996). "Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat." *J Neurosci* **16**(19): 6146-56.
- Deacon, T. W., P. Pakzaban et O. Isacson (1994). "The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence." *Brain Res* **668**(1-2): 211-9.
- Del Rio, J. A., A. Mart'inez, M. Fonseca, C. Auladell et E. Soriano (1995). "Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody." *Cerebral Cortex* **5**(1): 13-21.
- Demarque, M., A. Represa, H. Becq, I. Khalilov, Y. Ben-Ari et L. Aniksztejn (2002). "Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation." *Neuron* **36**(6): 1051-61.
- Demarque, M., N. Villeneuve, J. B. Manent, H. Becq, A. Represa, Y. Ben-Ari et L. Aniksztejn (2004). "Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex." *J Neurosci* **24**(13): 3289-94.
- Easter, S. S., Jr., L. S. Ross et A. Frankfurter (1993). "Initial tract formation in the mouse brain." *J Neurosci* **13**(1): 285-99.
- Faure, A. V., D. Grunwald, M. J. Moutin, M. Hilly, J. P. Mauger, I. Marty, M. De Waard, M. Villaz et M. Albrieux (2001). "Developmental expression of the calcium release channels during early neurogenesis of the mouse cerebral cortex." *Eur J Neurosci* **14**(10): 1613-22.
- Flint, A. C., X. Liu et A. R. Kriegstein (1998). "Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development." *Neuron* **20**(1): 43-53.
- Fox, J. W., E. D. Lamperti, Y. Z. Eksioglu, S. E. Hong, Y. Feng, D. A. Graham, I. E. Scheffer, W. B. Dobyns, B. A. Hirsch, R. A. Radtke, S. F. Berkovic, P. R. Huttenlocher et C. A. Walsh (1998). "Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia." *Neuron* **21**(6): 1315-25.
- Frederiksen, K. et R. D. McKay (1988). "Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo." *J Neurosci* **8**(4): 1144-51.
- Froemke, R. C., V. S. Kumar, P. Czkwianianc et R. Yuste (2002). "Analysis of multineuronal activation patterns from calcium-imaging experiments in brain slices." *Trends Cardiovasc Med* **12**(6): 247-52.
- Frotscher, M. (1998). "Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers." *Curr Opin Neurobiol* **8**(5): 570-5.
- Galli, L. et L. Maffei (1988). "Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life." *Science* **242**(4875): 90-1.
- Garaschuk, O., E. Hanse et A. Konnerth (1998). "Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus." *Journal of Physiology* **507**(Pt 1): 219-36.

- Gu, X. et N. C. Spitzer (1993). "Low-threshold Ca²⁺ current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca²⁺ in developing *Xenopus* neurons." *J Neurosci* **13**(11): 4936-48.
- Gu, X. et N. C. Spitzer (1995). "Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients." *Nature* **375**(6534): 784-7.
- Gu, X. et N. C. Spitzer (1997). "Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients." *Developmental Neuroscience* **19**(1): 33-41.
- Gupta, A., L. H. Tsai et A. Wynshaw-Boris (2002). "Life is a journey: a genetic look at neocortical development." *Nat Rev Genet* **3**(5): 342-55.
- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins et M. Gotz (2001). "Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia." *Dev Biol* **229**(1): 15-30.
- Haydar, T. F., L. L. Bambrick, B. K. Krueger et P. Rakic (1999). "Organotypic slice cultures for analysis of proliferation, cell death, and migration in the embryonic neocortex." *Brain Res Brain Res Protoc* **4**(3): 425-37.
- Haydar, T. F., F. Wang, M. L. Schwartz et P. Rakic (2000). "Differential Modulation of Proliferation in the Neocortical Ventricular and Subventricular Zones." *J Neurosci* **20**(15): 5764-5774.
- Henderson, L. P. et N. C. Spitzer (1986). "Autonomous early differentiation of neurons and muscle cells in single cell cultures." *Dev Biol* **113**(2): 381-7.
- Hevner, R. F., T. Neogi, C. Englund, R. A. Daza et A. Fink (2003). "Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin." *Brain Res Dev Brain Res* **141**(1-2): 39-53.
- Holliday, J., R. J. Adams, T. J. Sejnowski et N. C. Spitzer (1991). "Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons." *Neuron* **7**(5): 787-96.
- Holliday, J. et N. C. Spitzer (1990). "Spontaneous calcium influx and its roles in differentiation of spinal neurons in culture." *Developmental Biology* **141**(1): 13-23.
- Hubel, D. H. et T. N. Wiesel (1963). "Receptive Fields Of Cells In Striate Cortex Of Very Young, Visually Inexperienced Kittens." *J Neurophysiol* **26**: 994-1002.
- Jossin, Y., M. Ogawa, C. Metin, F. Tissir et A. M. Goffinet (2003). "Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development." *J Neurosci* **23**(30): 9953-9.
- Kato, M. et W. B. Dobyns (2003). "Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration." *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**: R89-96.
- Komuro, H. et P. Rakic (1992). "Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration." *Science* **257**(5071): 806-9.
- Komuro, H. et P. Rakic (1993). "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors." *Science* **260**(5104): 95-7.
- Komuro, H. et P. Rakic (1996). "Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration." *Neuron* **17**(2): 275-85.
- Komuro, H. et P. Rakic (1998). "Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex." *Journal of Neuroscience* **18**(4): 1478-90.
- Komuro, H. et P. Rakic (1998). "Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations." *Journal of Neurobiology* **37**(1): 110-30.
- Kriegstein, A. R. (1996). "Cortical neurogenesis and its disorders." *Current Opinion in Neurology* **9**(2): 113-7.
- Lavdas, A. A., M. Grigoriou, V. Pachnis et J. G. Parnavelas (1999). "The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex [In Process Citation]." *J Neurosci* **19**(18): 7881-8.

- Lee, C. W., S. J. Eglan et R. O. Wong (2002). "Segregation of ON and OFF retinogeniculate connectivity directed by patterned spontaneous activity." J Neurophysiol **88**(5): 2311-21.
- Lehmann, A., J. W. Lazarewicz et M. Zeise (1985). "N-Methylaspartate-evoked liberation of taurine and phosphoethanolamine in vivo: site of release." J Neurochem **45**(4): 1172-7.
- Leventer, R. J., D. T. Pilz, N. Matsumoto, D. H. Ledbetter et W. B. Dobyns (2000). "Lissencephaly and subcortical band heterotopia: molecular basis and diagnosis." Mol Med Today **6**(7): 277-84.
- Liu, X., Q. Wang, T. F. Haydar et A. Bordey (2005). "Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors." Nat Neurosci **8**(9): 1179-87.
- Lo Turco, J. J. et A. R. Kriegstein (1991). "Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex." Science **252**(5005): 563-6.
- LoTurco, J. J., D. F. Owens, M. J. Heath, M. B. Davis et A. R. Kriegstein (1995). "GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis." Neuron **15**(6): 1287-98.
- MacLeod, A. K. et A. Byrne (1996). "Anxiety, depression, and the anticipation of future positive and negative experiences." J Abnorm Psychol **105**(2): 286-9.
- Malatesta, P., E. Hartfuss et M. Gotz (2000). "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage." Development **127**(24): 5253-63.
- Manent, J. B., M. Demarque, I. Jorquera, C. Pellegrino, Y. Ben-Ari, L. Aniksztejn et A. Represa (2005). "A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration." J Neurosci **25**(19): 4755-65.
- Mao, B. Q., F. Hamzei-Sichani, D. Aronov, R. C. Froemke et R. Yuste (2001). "Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices." Neuron **32**(5): 883-98.
- Marin-Padilla, M. (1983). "Structural organization of the human cerebral cortex prior to the appearance of the cortical plate." Anat Embryol (Berl) **168**(1): 21-40.
- Marin-Padilla, M. (1998). "Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex." Trends in Neurosciences **21**(2): 64-71.
- McConnell, S. K. (1995). "Plasticity and commitment in the developing cerebral cortex." Progress in Brain Research **105**: 129-43.
- McConnell, S. K., A. Ghosh et C. J. Shatz (1994). "Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex." Journal of Neuroscience **14**(4): 1892-907.
- Meister, M., R. O. Wong, D. A. Baylor et C. J. Shatz (1991). "Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina." Science **252**(5008): 939-43.
- Metin, C., J. P. Denizot et N. Ropert (2000). "Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons [In Process Citation]." J Neurosci **20**(2): 696-708.
- Meyer, G., C. G. Perez-Garcia et J. G. Gleeson (2002). "Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement." Cereb Cortex **12**(12): 1225-36.
- Miyama, S., T. Takahashi, R. S. Nowakowski et V. S. Caviness, Jr. (1997). "A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium." Cerebral Cortex **7**(7): 678-89.
- Molnar, Z. et C. Blakemore (1995). "How do thalamic axons find their way to the cortex?" Trends Neurosci **18**(9): 389-97.

- Moody, W. J. (1998). "The development of voltage-gated ion channels and its relation to activity-dependent development events." Current Topics in Developmental Biology **39**: 159-85.
- Morest, D. K. (1970). "A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young." Z Anat Entwicklungsgesch **130**(4): 265-305.
- Nadarajah, B. et J. G. Parnavelas (2002). "Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex." Nat Rev Neurosci **3**(6): 423-32.
- Nguyen, L., J. M. Rigo, V. Rocher, S. Belachew, B. Malgrange, B. Rogister, P. Leprince et G. Moonen (2001). "Neurotransmitters as early signals for central nervous system development." Cell Tissue Res **305**(2): 187-202.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, J. N. Kerr et F. Helmchen (2004). "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo." Nat Methods **1**(1): 31-7.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman et A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." Nature **409**(6821): 714-20.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic et A. R. Kriegstein (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." Nat Neurosci **7**(2): 136-44. Epub 2004 Jan 4.
- O'Rourke, N. A., M. E. Dailey, S. J. Smith et S. K. McConnell (1992). "Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex." Science **258**(5080): 299-302.
- Owens, D. F., A. C. Flint, R. S. Dammerman et A. R. Kriegstein (2000). "Calcium dynamics of neocortical ventricular zone cells." Dev Neurosci **22**(1-2): 25-33.
- Owens, D. F. et A. R. Kriegstein (1998). "Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone." Journal of Neuroscience **18**(14): 5374-88.
- Picken Bahrey, H. L. et W. J. Moody (2003). "Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex." J Neurophysiol **89**(4): 1761-73. Order.
- Pixley, S. K. et J. de Vellis (1984). "Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin." Brain Res **317**(2): 201-9.
- Poluch, S. et N. Konig (2002). "AMPA receptor activation induces GABA release from neurons migrating tangentially in the intermediate zone of embryonic rat neocortex." Eur J Neurosci **16**(2): 350-4.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A. S. LaMantia et J. O. McNamara (1999). Neuroscience.
- Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.
- Rakic, P. (1974). "Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition." Science **183**(123): 425-7.
- Rakic, P. (2000). "Radial unit hypothesis of neocortical expansion." Novartis Found Symp **228**: 30-42; discussion 42-52.
- Represa, A. et Y. Ben-Ari (2005). "Trophic actions of GABA on neuronal development." Trends Neurosci **28**(6): 278-83.
- Sauer, F. C. (1935). "The cellular structure of the neural tube." The Journal of Comparative Neurology **63**(1): 13-23.
- Sauer, F. C. (1935). "Mitosis in the neural tube." The Journal of Comparative Neurology **62**(2): 377-405.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Poverino de Laureto, B. R. DasGupta et C. Montecucco (1992). "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block

- neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." *Nature* **359**(6398): 832-5.
- Schmechel, D. E. et P. Rakic (1979). "A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes." *Anat Embryol (Berl)* **156**(2): 115-52.
- Schwartz, T. H., D. Rabinowitz, V. Unni, V. S. Kumar, D. K. Smetters, A. Tsiola et R. Yuste (1998). "Networks of coactive neurons in developing layer 1." *Neuron* **20**(3): 541-52.
- Shoukimas, G. M. et J. W. Hinds (1978). "The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis." *Journal of Comparative Neurology* **179**(4): 795-830.
- Sisodiya, S. M. (2004). "Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy." *Lancet Neurol* **3**(1): 29-38.
- Smith, J. P., L. A. Cunningham et L. D. Partridge (2000). "Coupling of AMPA receptors with the Na(+)/Ca(2+) exchanger in cultured rat astrocytes." *Brain Res* **887**(1): 98-109.
- Spitzer, N. C., R. C. Debaca, K. A. Allen et J. Holliday (1993). "Calcium dependence of differentiation of GABA immunoreactivity in spinal neurons." *J Comp Neurol* **337**(1): 168-75.
- Spitzer, N. C. et X. Gu (1997). "Purposeful patterns of spontaneous calcium transients in embryonic spinal neurons." *Semin Cell Dev Biol* **8**(1): 13-9.
- Spitzer, N. C., N. J. Lautermilch, R. D. Smith et T. M. Gomez (2000). "Coding of neuronal differentiation by calcium transients." *Bioessays* **22**(9): 811-7.
- Stellwagen, D., C. J. Shatz et M. B. Feller (1999). "Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP." *Neuron* **24**(3): 673-85.
- Stoppini, L., P. A. Buchs et D. Muller (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." *Journal of Neuroscience Methods* **37**(2): 173-82.
- Sturman, J. A., P. Lu, Y. X. Xu et H. Imaki (1994). "Feline maternal taurine deficiency: effects on visual cortex of the offspring. A morphometric and immunohistochemical study." *Adv Exp Med Biol* **359**: 369-84.
- Super, H., A. Martinez et E. Soriano (1997). "Degeneration of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6-hydroxydopamine." *Brain Research* **98**(1): 15-20.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski et V. S. Caviness, Jr. (1995). "The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall." *Journal of Neuroscience* **15**(9): 6046-57.
- Tan, S. S. et S. Breen (1993). "Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development." *Nature* **362**(6421): 638-40.
- Tsien, R. Y. (1980). "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures." *Biochemistry* **19**(11): 2396-404.
- Valverde, F., C.-J. A. De et M.-L. L'Opez (1995). "Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat." *Cerebral Cortex* **5**(6): 483-93.
- Walsh, C. et C. L. Cepko (1992). "Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex." *Science* **255**(5043): 434-40.
- Watt, S. D., X. Gu, R. D. Smith et N. C. Spitzer (2000). "Specific frequencies of spontaneous Ca²⁺ transients upregulate GAD 67 transcripts in embryonic spinal neurons." *Mol Cell Neurosci* **16**(4): 376-87.
- Weissman, T. A., P. A. Riquelme, L. Ivic, A. C. Flint et A. R. Kriegstein (2004). "Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex." *Neuron* **43**(5): 647-61.

- Wiedehage, J., J. Schmidtayer et E. Buse (1992). "Development of membrane currents in mammalian neuroventricular cells from the early neural tube stage in vitro: aspects of the neuronal lineage." International Journal of Developmental Neuroscience **10**(5): 375-85.
- Yuste, R. et L. C. Katz (1991). "Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters." Neuron **6**(3): 333-44.
- Yuste, R., D. A. Nelson, W. W. Rubin et L. C. Katz (1995). "Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation." Neuron **14**(1): 7-17.
- Yuste, R., A. Peinado et L. C. Katz (1992). "Neuronal domains in developing neocortex." Science **257**(5070): 665-9.
- Zhou, F. M. et J. J. Hablitz (1996). "Layer I neurons of rat neocortex. I. Action potential and repetitive firing properties." J Neurophysiol **76**(2): 651-67.

Annexe

Durant ma thèse j'ai contribué à la réalisation de plusieurs projets de recherche qui ont amené à des publications. Le premier de ces projets consistait à rechercher comment une toxine de scorpion, la maurocalcine, pouvait pénétrer dans les cellules pour se lier au récepteur de la ryanodine et perturber l'homéostasie calcique. J'ai apporté ma maîtrise de la microscopie confocale pour suivre en temps réel l'entrée de cette toxine dans des cellules neuronales en culture et dans des myoblastes.

Le deuxième projet auquel j'ai contribué était axé sur l'étude du rôle d'une des isoformes de la triadine dans le complexe excitation-contraction du muscle squelettique. Dans cette étude, j'ai apporté mon expertise dans l'analyse des enregistrements d'imagerie calcique et j'ai notamment adapté mon logiciel qui a permis d'analyser statistiquement ces expériences.

Résumé

Dans le néocortex murin, la division des cellules précurseurs a lieu dès le stade E11 et donne naissance aux premiers neurones pionniers dont les cellules de Cajal-Retzius. L'activité électrique spontanée, portée par les canaux ioniques, joue un rôle prépondérant dans le développement du système nerveux central. Comprendre la place des canaux ioniques et de la signalisation calcique dans les phases précoces de la neurogenèse était l'objectif principal de mon projet. Nous avons montré l'apparition précoce de canaux sodiques dépendants du voltage dans 55% des cellules neuronales à E13, dont les cellules de Cajal-Retzius. En parallèle, nous avons observé des activités calciques spontanées dans les cellules proliférantes et neuronales au même stade. La conception d'un logiciel d'imagerie nous a permis d'analyser statistiquement ces activités et d'identifier les canaux ioniques impliqués. Alors que les synapses ne sont pas encore formées, nous avons observé la mise en place d'activités synchrones au sein du néocortex et démontré l'existence de communications paracrines entre les cellules. De plus, nous avons identifié l'existence d'une cascade de signalisation où la dépolarisation des récepteurs glycinergiques active les canaux sodiques présents sur les neurones pionniers. Dans ces neurones, l'influx sodique entraîne une augmentation de calcium cytoplasmique via un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puis une exocytose glutamatergique dont le libération paracrine induit l'activation d'autres cellules néocorticales. L'utilisation de la culture organotypique de cerveau nous a laissé entrevoir une implication physiologique majeure de cette cascade de signalisation dans la corticogenèse.

Mots clés : activité spontanée, cellules de Cajal-Retzius, communication paracrine, courants sodiques, échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, glutamate, imagerie calcique, néocortex, patch-clamp, préplaque, reeline, réseau neuronal, RT-PCR sur cellule unique.

Abstract

In mouse neocortex, precursor cell divisions occur as soon as E11 and give rise to the first pioneers neurons, including Cajal-Retzius cells. Spontaneous electrical activity, supported by ion channels, is a key factor in central nervous system development. In the present work, the main goal was to understand how ion channels and calcium signalling are implicated in early neurogenesis. First, we found an inward sodium current in 55% of neuronal cells, including all Cajal-Retzius cells. At the same stage, we observed spontaneous calcium activity in proliferative and neuronal cells of cortical slices. We developed an imaging software statistically analyze calcium activity and to identify ions channels involved. While synapses were not yet formed, we observed the presence of synchronous calcium activity and early paracrine communication between cells. We demonstrated the existence of a signalling cascade: glycine receptors depolarization activate sodium channels expressed in neuronal cells, which in turn lead to cytoplasmic calcium increases via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. The subsequent glutamate exocytosis paracrine release activate neocortical cells lacking sodium channels. The use of organotypic brain slice culture showed a major physiological implication of this original pathway in corticogenesis.

Key words : Cajal-Retzius cells, calcium imaging, glutamate, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, Na current, neocortex, network connectivity, paracrine communication, patch-clamp, preplate, reelin, single cell RT-PCR, spontaneous activity.