



HAL
open science

Effets de l'alcoolisation prénatale sur le développement du système GABAergique et de la myélinisation chez l'humain

Florent Marguet

► **To cite this version:**

Florent Marguet. Effets de l'alcoolisation prénatale sur le développement du système GABAergique et de la myélinisation chez l'humain. Neurosciences [q-bio.NC]. Normandie Université; Gonzalez, 2020. Français. NNT : 2020NORMR075 . tel-03212776

HAL Id: tel-03212776

<https://theses.hal.science/tel-03212776>

Submitted on 30 Apr 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Effets de l'alcoolisation prénatale sur le développement
du système GABAergique et de la myélinisation chez l'humain**

**Présentée et soutenue par
Florent MARGUET**

**Thèse soutenue publiquement le 29 octobre 2020
devant le jury composé de**

Mme Gaëlle FRIOCOURT	Chargée de Recherche, Inserm UMR 1078, Brest	Rapporteur
Mme Homa ADLE-BIASSETTE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris	Rapporteur
Mme Pascale MARCORELLES	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Brest	Examineur
M. Stéphane MARRET	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rouen	Examineur
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche, Inserm UMR 1245, Rouen	Examineur
M. Jean-Christophe SABOURIN	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rouen	Membre invité
Mme Annie LAQUERRIERE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Madame Annie LAQUERRIERE

Laboratoire U1245 – Equipe 4



EFFETS DE L'ALCOOLISATION PRÉNATALE
SUR LE DÉVELOPPEMENT
DU SYSTÈME GABAERGIQUE ET DE LA MYÉLINISATION
CHEZ L'HUMAIN

**EFFECTS OF PRENATAL ALCOHOL EXPOSURE
ON THE DEVELOPMENT OF GABAERGIC SYSTEM AND
MYELINATION IN HUMANS**

RÉSUMÉ

L'exposition prénatale à l'alcool est une cause non génétique majeure d'anomalies structurales et fonctionnelles du système nerveux central dont la forme la plus sévère est le syndrome d'alcoolisation fœtale, et dont les effets perdurent tout au long de la vie, associant retard mental, troubles neurocognitifs et comportementaux. L'exposition prénatale à l'alcool est un enjeu de Santé Publique, car actuellement, la plupart des enfants ne sont pas précocement dépistés en l'absence des signes majeurs que sont la dysmorphie crânio-faciale caractéristique et le retard de croissance. Si de nombreuses études sur les anomalies neurodéveloppementales ont été réalisées chez l'animal et dont les résultats sont souvent contradictoires, très peu de données sont disponibles chez l'humain et concernent essentiellement l'enfant. Afin d'expliquer la symptomatologie de ces enfants, nous avons réalisé une étude de la mise en place des interneurones et de la glie de myélinisation, éléments essentiels intervenant dans la synchronisation des réseaux neuronaux. A partir d'une cohorte de 15 fœtus humains à tous les stades du développement et de deux cas post-nataux âgés de trois mois et deux ans exposés à l'alcool, nous avons étudié l'ontogenèse des interneurones GABAergiques et calrétinergiques ainsi que les caractéristiques de leur migration vasculaire dans le cortex. Nous avons identifié une interneuronopathie consistant en un retard majeur de génération dans les zones de production (éminences ganglionnaires) aux stades précoces de développement et une malposition des interneurones calrétinergiques au sein du cortex des fœtus alcoolisés aux stades plus tardifs comparativement à des contrôles appariés. Ce retard de génération touche également les précurseurs des oligodendrocytes exprimant le PDGFR α qui restent ensuite anormalement nombreux aux dépens des précurseurs et pré-oligodendrocytes exprimant Olig2. Ces derniers restent pratiquement absents dans le cortex des fœtus alcoolisés jusqu'en fin de la grossesse. L'interneuronopathie et le défaut de différenciation oligodendrogliale pourraient expliquer en partie les troubles neurologiques observés chez les enfants et adultes exposés *in utero* à l'alcool, la modulation de l'activité neuronale et la myélinisation étant indispensables à l'établissement des réseaux neuronaux et à la conduction des influx nerveux.

ABSTRACT

Prenatal alcohol exposure is a major non-genetic cause of structural and functional abnormalities of the central nervous system, the most severe form of which is fetal alcohol syndrome, and the effects of which persist throughout life, associating mental retardation, neurocognitive and behavioural disorders. Prenatal alcohol exposure is a public health issue, since currently most children are not early detected in the absence of the major signs consisting of characteristic cranio-facial dysmorphism and growth retardation. While numerous studies on neurodevelopmental abnormalities have been carried out in animals and the results of which are often contradictory, very little data is available in humans and mainly concerns children. In order to explain the symptoms of these children, we have conducted an ontogenetic study of interneurons and oligodendrocyte lineage, two essential events involved in the synchronization of neural networks. Using a cohort of 15 human fetuses at all stages of development and two postnatal cases aged three months and two years exposed to alcohol *in utero*, we studied the development of GABAergic and calretinergeric interneurons as well as the characteristics of their vascular migration within the cortex. We identified an interneuronopathy consisting of a major generation delay in the production areas (ganglionic eminences) at the early stages of development and a mispositioning of calretinergeric interneurons within the cortex of fetuses exposed to alcohol at later stages compared with age matched controls. This delay in generation also affects precursors of oligodendrocytes expressing PDGFR α , which then remain abnormally numerous at the expense of precursors and pre-oligodendrocytes expressing Olig2. The latter are virtually absent in the cortex of fetuses exposed to alcohol until the end of pregnancy. Interneuronopathy and the lack of oligodendroglial differentiation could partly explain the neurological disabilities observed in children and adults exposed *in utero* to alcohol, modulation of neuronal activity and myelination being essential for the establishment of neural networks and conduction of nerve outputs.

Mots-clés

Défauts du système GABAergique; interneurones calrétinergiques; interneuronopathie; encéphale humain fœtal et néonatal; syndrome d'alcoolisation fœtale; immunohistochimie; migration vasculaire des interneurones; précurseurs des oligodendrocytes; PDGFR- α ; Olig2; défauts de myélinisation.

Key words

Defects of the GABAergic system; calretinergic interneurons; interneuronopathy; human fetal and neonatal brain; fetal alcohol syndrome; immunohistochemistry; vascular interneuron migration; precursors of oligodendrocytes; PDGFR- α ; Olig2; myelination defects.

Intitulé et adresse du laboratoire où la thèse a été préparée

Inserm U1245 - Team 4 Epigenetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders

IRIB - Institute of Research and Innovation in Biomedicine Faculty of Medicine

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen Cedex

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail : Mme le Docteur Gaëlle Friocourt, Mme le Professeur Homa Adle-Biassette, Mme le Professeur Pascale Marcorelles, M le Professeur Stéphane Marret, M le Docteur Bruno Gonzalez, M le Professeur Jean-Christophe Sabourin et Mme le Professeur Annie Laquerrière. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la lecture de cette thèse.

Je remercie le Docteur Gaëlle Friocourt pour ses précieux conseils, la pertinence de son jugement scientifique et sa réactivité,

Madame le Professeur Homa Adle-Biassette, chère Homa, merci pour votre joie de vivre et votre positivisme à toute épreuve qui m'ont beaucoup aidé,

Madame le Professeur Pascale Marcorelles, votre investissement de longue date dans la lutte contre l'alcoolisation fœtale a permis de mettre à notre disposition les éléments nécessaires à la réalisation de ce travail,

Au Docteur Bruno Gonzalez, nos réunions et nos discussions scientifiques sont toujours sources d'une grande richesse intellectuelle, et un grand merci à toute la Team 4 pour son accueil, avec une pensée particulière pour Céline,

Au Professeur Stéphane Marret, votre bienveillance, votre disponibilité et votre soutien ont été si précieux pour moi,

A mes collègues et amis qui ont supporté ma mauvaise humeur : Moutaz, Arnaud, Agathe, Nicolas, Aude et France. Merci !

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Sabourin, merci pour votre indéfectible soutien,

Une attention toute particulière pour Mme le Professeur Annie Laquerrière à qui je dois tout. Merci pour votre dévouement...

PARCOURS PROFESSIONNEL

FORMATION UNIVERSITAIRE

2011-2012 : MASTER 1 - Méthodes moléculaires, génétique médicale : applications au cancer - Faculté de médecine Rouen (Pr. T Frébourg).

2012-2013 : MASTER 1 – Immunologie - Faculté de médecine Rouen (Pr. O Boyer).

2013-2014 : MASTER 2 - Biologie et Santé, spécialité Cancérologie - Mention Assez Bien – Faculté de médecine Paris Sud (Dr. F Dautry).

2013-2015 : Diplôme Inter-Universitaire (DIU) de Neuropathologie Humaine et Expérimentale - Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris.
Sujet de mémoire : Statut MGMT des glioblastomes du sujet jeune avant 45 ans : à propos de 40 cas.

2016-2018 : Diplôme Inter-Universitaire (DIU) de Pathologie Fœtale et Placentaire - Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris.

Sujet de mémoire : Diversité morphologique des arthrogyrposes récidivantes d'origine neuromusculaire : à propos de 55 familles.

2015 : Diplôme d'Études Spécialisées (DES) d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (soutenance le 3 juin 2015 à Lille).

Sujet de mémoire : Caractérisation moléculaire du Pseudomyxome Péritonéal d'origine appendiculaire.

2015 : Thèse de Médecine (soutenance le 12 octobre 2015 à Rouen).

Sujet de thèse : Détection des mutations somatiques de l'ADN circulant par séquençage ciblé dans le plasma des patients atteints de lymphome primitif du système nerveux central.

FORMATION HOSPITALIÈRE

Externe des Hôpitaux de Rouen d'octobre 2006 à octobre 2009

Interne des Hôpitaux de Rouen de novembre 2009 à novembre 2015

Assistant Hospitalo-universitaire de novembre 2015 à septembre 2019

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier depuis le 1^{er} septembre 2019 dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques avec spécialisation en neuropathologie **et fonctions universitaires** en Histologie

APPARTENANCE À DES SOCIÉTÉS SAVANTES

2018- Membre des Sociétés Française et Européenne de Pathologie

2015- Membre des Sociétés Française et Européenne de Neuropathologie

2015- Membre du Groupe d'Etude en Myologie (GEM)

2015- Membre du Collège des Histologistes-Embryologistes-Cytogénéticiens

ACTIVITÉS HOSPITALIÈRES

Activité diagnostique en Neuropathologie Humaine : Pathologie tumorale, Pathologie neuromusculaire, Pathologie cardiaque, Pathologie neuro-développementale, Pathologie neuro-dégénérative

Activité diagnostique au sein du Laboratoire de Génétique Somatique des Tumeurs

Activités diagnostiques en Cytologie: Liquides Céphalo-rachidiens, de la plèvre, de l'arbre trachéo-bronchique et pulmonaire

Autres activités diagnostiques : Biopsies bronchiques et pleurales

Participations aux activités autopsiques

Prise en charge quotidienne d'étudiants : de la deuxième à la sixième année de Médecine au Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Enseignements magistraux d'Histologie et de Biologie cellulaire : 1^{ère} année des études médicales (PASS/LAS) : 31h.

Enseignement magistral d'Histologie : DFGSM2. 15h.

Travaux Pratiques d'Histologie : DFGSM2. 42h.

Enseignement magistral d'histologie : DFGSM3. 2h.

Enseignement Post-Universitaire de Biologie Moléculaire : 6h de cours magistral et 9 heures d'enseignement pratique

Diplôme Inter-Universitaire de Neuropathologie Humaine et Expérimentale : 2h/ 2 ans. 1 cours de 2h tous les 2 ans depuis décembre 2015 (Holoprosencéphalies, pathologies clastiques anté- et néonatales).

Diplôme Inter-Universitaire de pathologie fœtale et placentaire : enseignements dirigés : le cerveau normal et pathologique. 6 heures (2017-2019).

Enseignement paramédical : Institut de Formation des IADE. 6h par an.

Soit un total de **118 heures par an.**

ACTIVITÉS DE RECHERCHE COLLABORATIVE

- **Réseau National de Neuropathologie GIE Neuro CEB**, programme de « Don du cerveau pour la recherche ». Prélèvements et études neuropathologiques de cerveaux de patients souffrant de Maladies neurodégénératives (Maladies d' Alzheimer et apparentées).

- **PHRC national : Démembrement nosologique et génétique incluant la recherche de nouveaux gènes dans les arthrogyposes multiples congénitales de découverte anté- ou post-natales.** Pr Judith Melki, Paris. Co-responsable avec le Pr Annie Laquerrière des études morphologiques neuro-musculaires depuis 2015.

- **Agence Nationale pour la Recherche : 2016-2019 - ANR blanc « Dyneinopathies ».** Investigateur principal: Dr Nadia Bahi Buisson, Paris. Investigateur associé équipe 1: co-responsable avec le Pr Annie Laquerrière des études morphologiques: "Description of brain lesions by morphology, immunohistochemistry and confocal microscopy".

- **Contrat Era-net: 2016-2019, “Stem cells and mechanisms contributing to human cortical malformations”.** Investigateur principal: Dr Fiona Francis, Paris. Investigateur associé équipe 1: co-responsable avec le Pr Annie Laquerrière des études morphologiques: "Neuropathological characterization of brain progenitors in the human normal developing brain and in Type I lissencephalies. (Article en préparation).

- **Projet ALCOBRAIN : Exposition in utero à l'alcool : le PLGF, biomarqueur de lésions cérébrales fœtales, promoteur : Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation CHU de Rouen, essai multicentrique, prospectif et national.** Co-responsable avec le Pr Annie Laquerrière des études morphologiques.

PUBLICATIONS

1- **Marguet F**, Fontanilles M, Bohers E, Derrey S, Langlois O, Veresezan L, Leprêtre S, Sabourin JC, Jardin F, Laquerrière A. Low-grade dural extranodal marginal zone lymphoma. *Ann Pathol.* 2020 Jun;40(3):243-247. French. doi: 10.1016/j.annpat.2019.12.006.

2- El Husseini K, **Marguet F**, Lamy A, Magne N, Fontanilles M. Major response to temozolomide as first-line treatment for newly-diagnosed DDR2-mutated glioblastoma: A case report. *Rev Neurol (Paris).* 2020 May;176(5):402-404. doi: 10.1016/j.neurol.2019.09.007.

3- Fontanilles M, **Marguet F**, Ruminy P, Basset C, Noel A, Beaussire L, Viennot M, Viailly PJ, Cassinari K, Chambon P, Richard D, Alexandru C, Tennevet I, Langlois O, Di Fiore F, Laquerrière A, Clatot F, Sarafan-Vasseur N. Simultaneous detection of EGFR amplification and EGFRvIII variant using digital PCR-based method in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Apr 17;8(1):52. doi: 10.1186/s40478-020-00917-6.

- 4- Trimouille A, **Marguet F**, Sauvestre F, Lasseaux E, Pelluard F, Martin-Négrier ML, Plaisant C, Rooryck C, Lacombe D, Arveiler B, Boespflug-Tanguy O, Naudion S, Laquerrière A. Foetal onset of EIF2B related disorder in two siblings: cerebellar hypoplasia with absent Bergmann glia and severe hypomyelination. *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Apr 15;8(1):48. doi: 10.1186/s40478-020-00929-2.
- 5- Saugier-veber P, **Marguet F**, Vezain M, Bucourt M, Letard P, Delahaye A, Pipiras E, Frébourg T, Gonzalez B, Laquerrière A. Pontocerebellar hypoplasia with rhombencephalosynapsis and microlissencephaly expands the spectrum of PCH type 1B. *Eur J Med Genet.* 2020 Apr;63(4):103814. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103814
- 6- Marguet F**, Rendu J, Vanhulle C, Bedat-Millet AL, Brehin AC, Fauré J, Laquerrière A. Association of fingerprint bodies with rods in a case with mutations in the LMOD3 gene. *Neuromuscul Disord.* 2020 Mar;30(3):207-212. doi: 10.1016/j.nmd.2019.12.005.
- 7 - Goldenberg A, **Marguet F**, Gilard V, Cardine AM, Hassani A, Doz F, Radi S, Vasseur S, Bou J, Branchaud M, Houdayer C, Baert-Desurmont S, Laquerrière A, Frébourg T. Mosaic PTEN alteration in the neural crest during embryogenesis results in multiple nervous system hamartomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Dec 3;7(1):191. doi: 10.1186/s40478-019-0841-0.
- 8 - Bruet S, Francannet C, **Marguet F**, Biard M, Sarret C, Delmas HL. Prenatal diagnosis of hemimegalencephaly revealing tuberous sclerosis complex. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019 Sep 30. doi: 10.1002/uog.21874.
- 9 - Deniel A, **Marguet F**, Beauvissière L, Tobenas-Dujardin AC, Peillon C, Gambirasio MA, Veresezan O, Magne N, Di Fiore F, Laquerrière A, Sarafan-Vasseur N, Fontanilles M. TERTp Mutation Detection in Plasma by Droplet-Digital Polymerase Chain Reaction in Spinal Myxopapillary Ependymoma with Lung Metastases. *World Neurosurg.* 2019 Oct;130:405-409. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.111.
- 10 - Castel M, Cotten C, Deschamps-Huvier A, Commin MH, **Marguet F**, Jardin F, Duval-Modeste AB, Joly P. Primary central nervous system lymphoma following immunotherapy for metastatic melanoma. *Ann Dermatol Venereol.* 2019 Oct;146(10):634-639. doi: 10.1016/j.annder.2019.04.021.
- 11 - Ferey J, **Marguet F**, Laquerrière A, Marret S, Schmitz-Afonso I, Bekri S, Afonso C, Tebani A. A new optimization strategy for MALDI FTICR MS tissue analysis for untargeted metabolomics using experimental design and data modeling. *Anal Bioanal Chem.* 2019 May 15. doi: 10.1007/s00216-019-01863-6.
- 12 - Clavreul A, Soulard G, Lemée JM, Rigot M, Fabbro-Peray P, Bauchet L, Figarella-Branger D, Menei P; **FGB network**. The French glioblastoma biobank (FGB): a national clinicobiological database. *J Transl Med.* 2019 Apr 23;17(1):133. doi: 10.1186/s12967-019-1859-6.

- 13 - Boscher E, Husson T, Quenez O, Laquerrière A, **Marguet F**, Cassinari K, Wallon D, Martinaud O, Charbonnier C, Nicolas G, Deleuze JF, Boland A, Lathrop M, Frébourg T; FREX Consortium, Campion D, Hébert SS, Rovelet-Lecrux A. Copy Number Variants in miR-138 as a Potential Risk Factor for Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2019;68(3):1243-1255. doi: 10.3233/JAD-180940.
- 14 - Terrier L, Gilard V, **Marguet F**, Fontanilles M, Derrey S. Stereotactic brain biopsy: evaluation of robot-assisted procedure in 60 patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 2019 Mar;161(3):545-552. doi: 10.1007/s00701-019-03808-5. Epub 2019 Jan 24.
- 15 - Damian L, Sauvêtre G, **Marguet F**, Verdalle-Cazes M, Battistella M, Boutboul D. Pseudo-Sarcoidosis Revealing MonoMAC Syndrome. *J Clin Immunol*. 2018 Oct;38(7):739-741. doi: 10.1007/s10875-018-0551-6. Epub 2018 Oct 2.
- 16 - Nicolas G, Acuña-Hidalgo R, Keogh MJ, Quenez O, Steehouwer M, Lelieveld S, Rousseau S, Richard AC, Oud MS, **Marguet F**, Laquerrière A, Morris CM, Attems J, Smith C, Ansorge O, Al Sarraj S, Frebourg T, Campion D, Hannequin D, Wallon D, Gilissen C, Chinnery PF, Veltman JA, Hoischen A. Somatic variants in autosomal dominant genes are a rare cause of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Dec;14(12):1632-1639. doi: 10.1016/j.jalz.2018.06.3056. Epub 2018 Aug 13.
- 17 - Fontanilles M, **Marguet F**, Alexandru C, Langlois O, Veresezan O, Gilard V, David M, Laquerrière A, Hanzen C, Tennevet I, Di Fiore F, Clatot F. Early platelet variation during concomitant chemo-radiotherapy predicts adjuvant temozolomide-induced thrombocytopenia in newly diagnosed glioblastoma patients. *Support Care Cancer*. 2019 Feb;27(2):477-484. doi: 10.1007/s00520-018-4336-5. Epub 2018 Jul 5.
- 18 - Gilard V, Goia A, Ferracci FX, **Marguet F**, Magne N, Langlois O, Perez A, Derrey S. Spinal meningioma and factors predictive of post-operative deterioration. *J Neurooncol*. 2018 Oct;140(1):49-54. doi: 10.1007/s11060-018-2929-y. Epub 2018 Jun 20.
- 19 - Marguet F**, Piton N, Adle-Biassette H, Renaud F, Bohers E, Boyer T, Zarea A, Derrey S, Sabourin JC, Laquerrière A. Molecular characteristics of multifocal brain histiocytic sarcoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018 Apr 21. doi: 10.1111/nan.12490.
- 20 - Sudrié-Arnaud B, **Marguet F**, Patrier S, Martinovic J, Louillet F, Broux F, Charbonnier F, Dranguet H, Coutant S, Vezain M, Lanos R, Tebani A, Fuller M, Lamari F, Chambon P, Brehin AC, Trestard L, Tournier I, Marret S, Verspyck E, Laquerrière A, Bekri S. Metabolic causes of nonimmune hydrops fetalis: A next-generation sequencing panel as a first-line investigation. *Clin Chim Acta*. 2018 Feb 21. pii: S0009-8981(18)30084-6. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.023.
- 21 - Lacour M, Gilard V, **Marguet F**, Curey S, Perez A, Derrey S. Sudden paraplegia due to spontaneous bleeding in a thoracic epidural angioliopoma and literature review. *Neurochirurgie*. 2018 Feb 19. pii: S0028-3770(17)30174-1. doi: 10.1016/j.neuchi.2017.08.003.

- 22 - Piton N, Ruminy P, Gravet C, Marchand V, Colasse É, Lamy A, Naoures Mear CL, Bibeau F, **Marguet F**, Guisier F, Salaün M, Thiberville L, Jardin F, Sabourin JC. Ligation-dependent RT-PCR: a new specific and low-cost technique to detect ALK, ROS, and RET rearrangements in lung adenocarcinoma. *Lab Invest.* 2017 Dec 18. doi: 10.1038/labinvest.2017.124.
- 23 - Gremain V, Litrowski N, Boulard C, **Marguet F**, Courville P, Zarnitsky C, Langlois V. Necrotizing autoimmune myopathy associated with POEMS syndrome a report. *QJM.* 2017 Oct 24. doi: 10.1093/qjmed/hcx197.
- 24 - Sauvestre F, **Marguet F**, Rooryck C, Vuillaume ML, Cardinaud F, Laquerrière A, André G, Pelluard F. Early fetal presentation of Koolen-de Vries: Case report with literature review. *Eur J Med Genet.* 2017 Aug 12. pii: S1769-7212(17)30088-5. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.08.012.
- 25 - Touraine R, Laquerrière A, Petcu CA, **Marguet F**, Byrne S, Mein R, Yau S, Mohammed S, Guibaud L, Gautel M, Jungbluth H. Autopsy findings in EPG5-related Vici syndrome with antenatal onset. *Am J Med Genet A.* 2017 Jul 27. doi: 10.1002/ajmg.a.38342.
- 26 - Fontanilles M, **Marguet F**, Bohers É, Viailly PJ, Dubois S, Bertrand P, Camus V, Mareschal S, Ruminy P, Maingonnat C, Lepretre S, Veresezan EL, Derrey S, Tilly H, Picquenot JM, Laquerrière A, Jardin F. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget.* 2017 Jun 1. doi: 10.18632/oncotarget.18325.
- 27 - Piton N, **Marguet F**, Trintignac A, Michelin P, Benhamou D, Sabourin JC. A mysterious pleural lesion: A case report. *Ann Pathol.* 2017 May 19. pii: S0242-6498(17)30058-5. doi: 10.1016/j.annpat.2017.03.002.
- 28 - Sauvestre F, Moutton S, Badens C, Broussin B, Carles D, Houcinat N, Lacoste C, **Marguet F**, Pecheux C, Villard L, Pelluard F, Laquerrière A, André G. In utero seizures revealing dentato-olivary dysplasia caused by SCN2A mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 May 10. doi: 10.1111/nan.12409.
- 29 - Saugier-veber P, **Marguet F**, Lecoquierre F, Adle-Biassette H, Guimiot F, Cipriani S, Patrier S, Brasseur-Daudruy M, Goldenberg A, Layet V, Capri Y, Gérard M, Frébourg T, Laquerrière A. Hydrocephalus due to multiple ependymal malformations is caused by mutations in the MPDZ gene. *Acta Neuropathol Commun.* 2017 May 1;5(1):36. doi: 10.1186/s40478-017-0438-4.
- 30 - Langlois V, Bedat Millet AL, Lebesnerais M, Miranda S, **Marguet F**, Benhamou Y, Marcorelles P, Lévesque H. Small fiber neuropathy. *Rev Med Interne.* 2017 Apr 11. pii: S0248-8663(17)30106-6. doi: 10.1016/j.revmed.2017.03.013.
- 31 - Laquerriere A, Maillard C, Cavallin M, Chapon F, **Marguet F**, Molin A, Sigaudy S, Blouet M, Benoist G, Fernandez C, Poirier K, Chelly J, Thomas S, Bahi-Buisson N. Neuropathological Hallmarks of Brain Malformations in Extreme Phenotypes Related to DYNC1H1 Mutations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017 Mar 1;76(3):195-205. doi: 10.1093/jnen/nlw124.

- 32 - Xue S, Maluenda J, **Marguet F**, Shboul M, Quevarec L, Bonnard C, Ng AY, Tohari S, Tan TT, Kong MK, Monaghan KG, Cho MT, Siskind CE, Sampson JB, Rocha CT, Alkazaleh F, Gonzales M, Rigonnot L, Whalen S, Gut M, Gut I, Bucourt M, Venkatesh B, Laquerrière A, Reversade B, Melki J. Loss-of-Function Mutations in LGI4, a Secreted Ligand Involved in Schwann Cell Myelination, Are Responsible for Arthrogryposis Multiplex Congenita. *Am J Hum Genet.* 2017 Mar 8. pii: S0002-9297(17)30073-3. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.02.006.
- 33 - Piton N, Angot É, **Marguet F**, Sabourin JC. HMGA2 immunostaining is a straightforward technique which helps to distinguish pulmonary fat-forming lesions from normal adipose tissue in small biopsies: a retrospective observational study about a series of 13 lung biopsies. *Diagn Pathol.* 2017 Feb 23;12(1):21. doi: 10.1186/s13000-017-0603-x.
- 34 - Nicolas G, **Marguet F**, Laquerrière A, Mendes de Oliveira JR, Hannequin D. Microangiopathy in primary familial brain calcification: Evidence from skin biopsies. *Neurol Genet.* 2017 Feb 8;3(2):e134. doi: 10.1212/NXG.0000000000000134.
- 35 - Girault V, Gilard V, **Marguet F**, Lesueur C, Hauchecorne M, Ramdani Y, Laquerrière A, Marret S, Jégou S, Gonzalez BJ, Brasse-Lagnel C, Bekri S. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis.* 2017 Feb 9;8(2):e2610. doi: 10.1038/cddis.2017.29.
- 36 - Piton N, Salaün M, Guisier F, **Marguet F**, Touré EK, Gémival P, Thiberville L, Sabourin JC. BRAF V600E Mutation Is not Always Present as Expected! A Case Report of Lung and Thyroid Carcinomas. *J Thorac Oncol.* 2017 Jan 17. doi: 10.1016/j.jtho.2017.01.008.
- 37 - Maluenda J, Manso C, Quevarec L, Vivanti A, **Marguet F**, Gonzales M, Guimiot F, Petit F, Toutain A, Whalen S, Grigorescu R, Coeslier AD, Gut M, Gut I, Laquerrière A, Devaux J, Melki J. Mutations in GLDN, Encoding Gliomedin, a Critical Component of the Nodes of Ranvier, Are Responsible for Lethal Arthrogryposis. *Am J Hum Genet.* 2016 Oct 6;99(4):928-933. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.07.021.
- 38 - **Marguet F**, Barakizou H, Tebani A, Abily-Donval L, Torre S, Bayouhd F, Jebnoun S, Brasseur-Daudruy M, Marret S, Laquerrière A, Bekri S. Pyridoxine-dependent epilepsy: report on three families with neuropathology. *Metab Brain Dis.* 2016 Dec;31(6):1435-1443.
- 39 - Piton N, Wason J, Colasse É, Cornic M, Lemoine F, Le Pessot F, **Marguet F**, Sabourin JC. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and development of colon adenocarcinoma. *Virchows Arch.* 2016 Aug;469(2):145-54. doi: 10.1007/s00428-016-1961-6.
- 40 - **Marguet F**, Laquerrière A, Goldenberg A, Guerrot AM, Quenez O, Flahaut P, Vanhulle C, Dumant-Forest C, Charbonnier F, Vezain M, Bekri S, Tournier I, Frébourg T, Nicolas G. Clinical and pathologic features of Aicardi-Goutières syndrome due to an IFIH1 mutation: A pediatric case report. *Am J Med Genet A.* 2016 May;170A(5):1317-24. doi: 10.1002/ajmg.a.37577.
- 41 - Gravet C, Roquet L, Rioux-Leclercq N, **Marguet F**, Sabourin JC. Glomus tumor of kidney: Unusual location of a rare mesenchymal tumor. *Ann Pathol.* 2015 Oct;35(5):440-4. doi: 10.1016/j.annpat.2015.05.021.

42 - **Marguet F**, Bergogne L, Laurent N, Rousseau T, Laquerrière A. Fetal presentation of congenital fibrosarcoma of the meninges: case report and literature review. *Clin Neuropathol.* 2015 Mar-Apr;34(2):70-5. doi: 10.5414/NP300811.

43 - **Marguet F**, Proust F, Crahes M, Basset C, Joly-Helas G, Chambon P, Laquerrière A. Malignant meningioma with adenocarcinoma-like metaplasia: a rare entity to be not misdiagnosed. *Ann Pathol.* 2014 Jun;34(3):223-7. doi:10.1016/j.annpat.2014.03.004.

Livres ou chapitres de livres :

Laquerrière A and **Marguet F**. Spinal Cord Lesions
In Developmental Neuropathology Book, second edition. Golden JF, Harding BN and Adle Biassette H Editors, Chapter 17, p 179-186.

Communications orales et/ou affichées

1 - **Marguet F**, Piton N, Colasse E, Lamy A, Guisier F, Thiberville L, Sabourin JC. STK11 mutations are associated with lower PDL1 expression in lung adenocarcinoma. *United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP), Vancouver, march 19-23 2018*

2- **Marguet F**, Piton N, Adle-Biassette H, Renaud F, Bohers E, Boyer T, Zarea A, Derrey S, Sabourin JC, Laquerrière A. Caractéristiques moléculaires du sarcome histiocytique cérébral: à propos d'un cas et revue de la littérature. *Société Française de Neuropathologie, Paris, 1 Décembre 2017.*

3 - **Marguet F**, Maillard C, Cavallin M, Chapon F, Molin A, Sigaudy S, Blouet M, Benoist G, Fernandez C, Poirier K, Chelly J, Thomas S, Bahi-Buisson N, Laquerrière A. Caractéristiques neuropathologiques des malformations cérébrales liées à des mutations dans le gène *DYNC1H1*. *Société Française de Neuropathologie, Paris, 2 Décembre 2016.*

4 - **Marguet F**, Fontanilles M, Bohers E, Viailly PJ, Bertrand P, Dubois S, Camus V, Mareschal S, Ruminy P, Maingonnat C, Lepretre S, Veresezan L, Derrey S, Tilly H, Picquenot JM, Laquerrière A, Jardin F, Sabourin JC. Somatic Mutations Detected in Plasma Cell-Free DNA by Targeted Sequencing: Assessment of Liquid Biopsy in Primary Central Nervous System Lymphoma. *United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP), Seattle, 15 Mars 2016.*

5 - **Marguet F**, Fontanilles M, Bohers E, Viailly PJ, Bertrand P, Dubois S, Mareschal S, Camus V, Veresezan L, Tilly H, Picquenot JM, Jardin F et Laquerrière A. Détection des mutations somatiques de l'ADN circulant par séquençage ciblé dans le plasma des patients atteints de Lymphome Primitif du Système Nerveux Central. *Société Française de Neuropathologie, Paris, 4 Décembre 2015.*

6 - **Marguet F**, Blanchard F, Lamy A, Sesboue R, Sabourin JC. Caractérisation des anomalies moléculaires du pseudomyxome péritonéal d'origine appendiculaire. *Carrefour Pathologie, Paris, 3 Novembre 2015.*

- 7 - **Marguet F**, Nicolas G, Vanhulle C, Goldenberg A, Charbonnier F, Vezain M, Coutant S, Quenez O, Laquerrière A. Présentation d'un phénotype extrême avec mutation dans le gène *IFIH1* récemment impliqué dans le syndrome d'Aicardi-Goutières. *Société Française de Neuropathologie, Paris, 5 Décembre 2014.*
- 8 - **Marguet F**, Zalar A, Maillochaud JH, Touré E, Sabourin JC. Tumeur intra-canalair papillaire mucineuse du pancréas. *Carrefour Pathologie, SFCC club de Cytopathologie, Paris, 19 Novembre 2014.*
- 9 - **Marguet F**, Proust F, Crahes M, Basset C, Joly-Helas G, Chambon P, Laquerrière A. Le méningiome malin avec métaplasie adénocarcinomeuse : une entité rare à ne pas méconnaître. *Société Française de Neuropathologie, Paris, 6 décembre 2013.*
- 10 - **Marguet F**, Blanchard F, Lamy A, Sesboue R, Sabourin JC. Pseudomyxoma Peritonei of Appendiceal Origin: Molecular Abnormality Characterization. *United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP), Boston, Mars 2015.*
- 11 - Mahjoub D, Gamahut M, Missaoui M, **Marguet F**, Ben Salah B, Derrey S, Miret N. Un neuro-Whipple d'allure métastatique. *Revue Neurol. Vol 170, Suppl 1, April 2014, p A163. Journées de Neurologie de langue française 2014.*
- 12 - **Marguet F**, Lamy A, Bolze PA, Colasse E, Paresy M, Sabourin JC and Patrier S. Short repeat tandem assay refines the diagnosis of molar trophoblastic diseases. *European Human Genetics Conference, Paris, 2012.*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 5HT3aR:** 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A
- ADH:** Alcohol déshydrogénase
- ADHD:** Attention Deficit Hyperactivity Disorder
- AKT:** Protein kinase B
- Ang1:** Angiogenin 1
- ANR:** Anterior neural ridge
- APC complex:** adenomatous polyposis coli complex
- aRG:** Cellule gliale radiaire apicale
- ARND:** Alcohol Related Neurodevelopmental Disorders
- Arx:** Aristaless Related Homeobox
- ASCL1:** Achaete-scute family bHLH transcription factor 1
- AUDIT:** Alcohol Use Disorder Identification Test
- BAI:** Brain angiogenesis inhibitor
- Bak:** BCL2-antagonist/killer 1
- Bax:** BCL2-associated X protein
- BBB:** Blood brain barrier
- Bcl2:** B-cell lymphoma 2
- BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor
- BMP:** Bone morphogenetic protein
- bRG:** Cellule gliale radiaire basale
- CAM :** Cellular adhesion molecule
- CASK:** Calcium/calmodulin dependent serine protein kinase
- CAT:** Catalase
- CCK:** Cholécystokinine
- CDC:** Centre for Disease Control
- Cdk:** Cyclin dependant kinase
- CNTF:** Ciliary neurotrophic factor
- CR:** Calrétinine
- Cxcl12:** C-X-C motif chemokine 12
- CGE:** Eminence ganglionnaire caudale
- COUP-TF2:** Chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor 2

CREB: AMPc Response Element-binding protein
Cxcr: Chemokine (C-X-C motif) receptor
DCX: Doublecortine
DLX: Distal less homeobox gene
DMS-V: Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders
DTI: Diffusion Tensor Imaging
ERRB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase
Etv1: ETS Variant Transcription Factor 1
FAS: Fetal Alcohol Syndrome
FASD: Fetal Alcohol Spectrum Disorder
FGF: Fibroblast growth factor
GABA: γ -aminobutyric acid
Gad: Glutamate Decarboxylase
GDNF: Glial cell line derived neurotrophic factor
GE: Eminences ganglionnaires
GFAP: Glial fibrillar acidic protein
GGT: gamma-glutamyl transférase
Glut1: Glucose Transporter Type 1
Gpr: G Protein Regulator
Gsh2: GS homeobox 2
GSK3: Glycogen synthase kinase-3
Gsx: Genetic-Screened Homeobox 2
HES1: Hes Family BHLH Transcription Factor 1
HIF: Hypoxia inducible factor
HPE: Holoprosencéphalie
IGF-1: Insulin-like growth factor 1
IL: Interleukin
IMG: Interruption médicale de grossesse
IOM: Hoymes-revised institute of medicine criteria
Iso: Isthmic organizer
iPC: Intermediate progenitor cell
iSVZ: Zone sous-ventriculaire interne
IZ: Zone intermédiaire
KCC: Echangeur potassium-chlore

L1CAM: L1 adhesion molecule
LCR: Liquide céphalo-rachidien
LGE: Eminence ganglionnaire latérale
Lhx6: LIM Homeobox 6
Lingo1: Leucine - rich repeat and immunoglobulin domain - containing Nogo receptor - interacting protein
Maf: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAGUK: Membrane associated guanylate kinase
MBP: Myelin basic protein
MEC: Matrice extra-cellulaire
Meis2: Myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2
MEKK: Mitogen-activated protein kinase
MFIU: Mort foetale *in utero*
MGE: Eminence ganglionnaire médiane
Mint: Msx2-interacting protein
MMP-9: métalloprotéinase-9 matricielle
MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MSIN: Mort subite inopinée du nourrisson
MZ: Zone marginale
NCAM: Neural cell adhesion molecule
ncARN: ARN non codant
NDMA: N-methyl-D-aspartate
NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
NGF: Nerve growth factor
Ngn: Neurogénine
Nkx2-1: NK2 Homeobox 1
NOS: Nitric oxide synthase
NPY: Neuropeptide Y
Nr2f2: Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2
Nrp: Neuropiline
Nrg: Neuréguline
NT3: Neurotrophine 3
NTD: Neural Tube Defect

OLIG2: Oligodendrocyte transcription factor
oRG: Outer glial radial cell
OPC: Oligodendrocyte precursor cells
oSVZ: Zone sous-ventriculaire externe
PAE: Prenatal Alcohol Exposure
PAK: p21-activated kinase
Par6: Partitioning defective 6 homolog
PAX6: Paired box 6
PDGFR- α : Platelet-derived growth factor receptor- α
PIK3: Phosphoinositol kinase 3
PGC-1 α : Proliferator-activator receptor gamma co-activator-1 alpha
PKC: Protein kinase P
PIGF: Placental like growth factor
PLP: Phospholipid protein
POA: Aire préoptique
POH: Aire préoptico-hypothalamique
PréOL: Pré-oligodendrocyte
Prox1: Prospero Homeobox protein 1
PSD: Postsynaptic density
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PV: Parvalbumine
RCIU: Retard de croissance *intra-utero*
RRTP: LAR-tip receptor-phosphotyrosine phosphatase
RMS: Rostral migratory stream
RNAseq: RNA sequencing
ROS: Reactive Oxygen Species
SA : Semaines d'aménorrhée
SAF: Syndrome d'alcoolisation fœtale
SAP102: Synapse-associated protein 102
Satb1: Special AT-rich sequence-binding protein-1
SEMA: Sémaphorine
SGL: Couche granulaire transitoire externe
SNC: Système nerveux central
SHH: Sonic Hedgehog

SOX: SRY-Box Transcription Factor

Sp9: trans-acting transcription factor 9

SP: Sous-plaque

St18: Suppression of tumorigenicity 18

STT: Somatostatine

SVZ: Zone sous ventriculaire

TCAF: Troubles cognitifs et comportementaux liés à une alcoolisation foetale

TBR2: T-brain gene-2

TGF- α : Transforming growth factor α

Tie: Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF factor homology domains

t-PA: activateur tissulaire du plasminogène

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

VIP: Vasointestinal peptide

VGM: Volume globulaire moyen

VZ: Zone ventriculaire

Wnt: Wingless + int (integration site)

Zfhx1B: Zinc Finger Homeobox 1B

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Principales étapes de formation du tube neural	30
Figure 2 : Régulation moléculaire de la fermeture du tube neural.....	31
Figure 3 : Voies Wnt canonique et non canonique.....	31
Figure 4 : Représentation schématique des centres organisateurs du télencéphale et des domaines dorsal et ventral de production des cellules nerveuses	32
Figure 5 : Représentation schématique de la polarisation dorso-ventrale du tube neural	33
Figure 6 : Représentation schématique de la métamérisation du tube neural et de ses domaines ventral et dorsal.....	33
Figure 7 : Evolution du tube neural entre 3 et 5 semaines de développement	34
Figure 8 : Principales étapes du développement du cortex cérébral	37
Figure 9 : Développement de l'arbre dendritique des neurones pyramidaux dans le cortex frontal humain par technique de tractographie.....	37
Figure 10 : Localisation des zones germinatives chez le fœtus humain sur coupe coronale passant par le diencéphale antérieur.....	38
Figure 11 : Immunomarquage par un anticorps anti-GABA permettant de visualiser les interneurons au niveau de la plaque corticale et de la couche de Brun	39
Figure 12 : Représentation schématique des principaux évènements neurogénétiques à différents stades de l'histogénèse du système nerveux central	40
Figure 13 : Les modes de division sont déterminés par l'orientation du fuseau	41
Figure 14 : Schéma comparatif du développement du cortex chez le rongeur et l'humain. ...	42
Figure 15 : Enrichissement de la glie radiaire à partir des oRGs	43
Figure 16 : Différentes étapes de la migration neuronale radiaire.	44
Figure 17 : Représentation schématique de la migration des neurones effecteurs selon le gradient inside-out au sein de la plaque corticale primitive	46
Figure 18 : Evolution morphologique des neurones de la sous-plaque.....	48
Figure 19 : Schéma représentant les modes de connexions inter-hémisphériques via le corps calleux.	50
Figure 20 : Représentation schématique des principales phases de la gyrification.....	51

Figure 21 : Comparaison de l'évolution de la gyration chez les mammifères	53
Figure 22 : Rôle des afférences corticales et des meninges au cours du processus de gyrogénèse.....	53
Figure 23 : Schématisation de la croissance des faisceaux et des connexions cérébrales au cours de la première moitié de la grossesse	55
Figure 24 : Schématisation de la croissance des faisceaux et des connexions cérébrales au cours de la deuxième moitié de la grossesse.....	56
Figure 25 : Interactions moléculaires impliquées dans la synapse mature.....	58
Figure 26 : Principales étapes du développement de la lignée oligodendrogliale.....	61
Figure 27 : Voies signalétiques impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins .	63
Figure 28 : Formation des perforantes intracorticales à partir du plexus méningé primitif....	65
Figure 29 : Développement du réseau vasculaire périventriculaire.	66
Figure 30 : Développement des perforantes intracorticales dans le cortex cérébral humain ..	67
Figure 31 : Gènes endothéliaux « cell-autonomous et non-cell-autonomous » régulant l'angiogénèse cérébrale.	68
Tableau 1 : Effets des facteurs angiogéniques et neurogéniques sur les systèmes nerveux et vasculaire.....	70
Figure 32 : Représentation de l'unité neuro-vasculaire mature.....	71
Figure 33 : Régulation transcriptionnelle du développement des interneurons à destinée corticale	72
Figure 34 : Sources de production, voies de signalisation et diversité phénotypique des interneurons intracorticaux	75
Figure 35 : Organisation régionale du sous-pallium embryonnaire chez la souris	76
Figure 36 : Organisation des trois grandes classes d'interneurones.....	81
Figure 37 : Localisation définitive des interneurons dans les différentes couches du cortex	84
Figure 38 : Représentation schématique de l'ARC	88
Figure 39 : Dysmorphie crânio-faciale du SAF	91
Tableau 2 : Comparaison des différents algorithmes diagnostiques du spectre lésionnel liés à l'exposition prénatale à l'alcool	98

Figure 40 : Représentation schématique des divers processus moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue du FADS après exposition à l'éthanol au cours de la vie embryo-fœtale	101
Figure 41 : Diagramme schématique du programme épigénétique au cours de la neurogénèse	106
Tableau 3 : Altérations de l'expression de divers miRs en fonction du modèle animal, du mode et de la durée d'exposition à l'éthanol, et du tissu analysé	108
Tableau 4 : Age gestationnel ou âge post-natal et causes du décès des cas contrôles	111
Tableau 5 : Principales caractéristiques cliniques et morphologiques des foetus et enfants exposés à une alcoolisation maternelle au cours de la grossesse	120
Figure 42 : Interneurones calrétininergiques de morphologie bipolaire situées dans les couches II-III d'un cortex humain normal à 36 SA.....	204
Figure 43 : Liste des substances anti-oxydantes proposées dans le traitement de la PAE ...	210

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	7
PARCOURS PROFESSIONNEL	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	22
INTRODUCTION	28
I- Développement du télencéphale chez l'homme	29
I-1- Premiers stades de développement	29
I-1-1- Formation du tube neural.....	29
I-1-2- Formation des vésicules cérébrales.....	34
I-1-3- Formation des cavités ventriculaires	35
I-1-4- Formation des plexus choroïdes	35
I-2- Mise en place de la plaque corticale	36
I-2-1- Sources de production des cellules nerveuses.....	38
I-2-2- Modalités de production de cellules nerveuses	39
I-2-3- Voies de migration	41
I-3- Formation de la plaque corticale	45
I-3-1- Mise en place du cortex cérébral.....	45
I-3-1-1- Stade de préplaque	45
I-3-1-2- Stade de plaque corticale primitive	45
I-3-1-3- Stade de plaque corticale mature	47
I-3-1-4- Une structure particulière : la sous-plaque	47
I-3-2- Mise en place des commissures.....	48
I-3-3- Mise en place des sillons et circonvolutions : la gyrification.....	50
I-4- Maturation des cellules nerveuses	53
I-4-1- Neurones effecteurs.....	54
I-4-2- Interneurones	58
I-4-3- Macroglie.....	59
I-4-3-1- Astrocytes.....	59
I-4-3-2- Oligodendrocytes.....	60
I-4-4- La microglie.....	62
I-5- Développement de la vascularisation cérébrale	62
I-5-1- Mise en place du système vasculaire	62
I-5-2- Mise en place de la vascularisation intracérébrale.....	64
I-5-3- Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogénèse.....	67
I-5-4- Formation de la barrière hémato-encéphalique.....	70

II- Développement du système GABAergique à destinée corticale.....	71
II-1- Génération des interneurons GABAergiques.....	71
II-2- Spécification spatiale des interneurons à destinée corticale.....	74
II-3- Spécification temporelle des cellules progénitrices interneuronales.....	76
II-4- Migration des interneurons et intégration dans les circuits corticaux.....	77
II-4-1- Migration tangentielle et dispersion des interneurons.....	77
II-4-2- Organisation laminaire intracorticale et intégration dans les circuits transitoires... 78	
II-5- Régulation du nombre d'interneurons corticaux.....	79
II-6- Diversité phénotypique des interneurons corticaux matures.....	80
II-6-1- Les interneurons parvalbuminergiques.....	82
II-6-2- Les interneurons somatostatinerigiques.....	82
II-6-3- Les interneurons exprimant la sous-unité 3a du récepteur à la sérotonine (HTr3aR)	
.....	83
II-7- Données disponibles chez l'humain.....	84
II-7-1- Lieux de production des interneurons.....	85
II-7-2- Extinction de la production des interneurons.....	86
III - L'exposition anténatale à l'alcool.....	88
III-1- Historique.....	88
III-2- Données épidémiologiques.....	89
III-3- Le syndrome d'alcoolisation fœtale humain.....	90
III-3-1- Données cliniques.....	90
III-3-1-1- La dysmorphie crânio-faciale.....	91
III-3-1-2- Le retard de croissance intra-utérin.....	91
III-3-1-3- Malformations viscérales et squelettiques.....	92
III-3-1-4- Anomalies cérébrales structurales.....	93
III-3-1-5- Troubles neurocognitifs et comportementaux.....	93
III-3-2- Etudes neuropathologiques.....	94
III-4- Critères diagnostiques.....	95
III-4-1- Critères diagnostiques du FADS.....	95
III-4-2- Diagnostic et dépistage de l'alcoolisation maternelle.....	99
III-5- Mécanismes physiopathologiques du FADS.....	100
III-5-1- Mécanisme d'action direct.....	101
III-5-2- Effets de l'éthanol sur l'expression génique.....	102
III-5-2-1- Effets à court terme.....	102
III-5-2-2- Effets à long terme.....	104
III-5-3- Ethanol et modifications épigénétiques.....	105
III-5-3-1- Ethanol et méthylation de L'ADN.....	106
III-5-3-2- Ethanol et histones.....	107
III-5-3-3- Ethanol et ncARNs.....	108
SITUATION DU SUJET.....	109

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	114
I- Patients	115
I-1- Groupe contrôle	115
I-2- Groupe FADS	115
II- Méthodes.....	116
II-1- Caractéristiques morphologiques de la cohorte	116
II-2- Etudes immunohistochimiques.....	117
II-3- Analyse quantitative du nombre et de la densité d'interneurones GABAergiques dans le cortex frontal.....	118
II-4- Analyse de la migration vasculaire dans la plaque corticale par microscopie confocale.....	118
RÉSULTATS	123
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	197
BIBLIOGRAPHIE	212
ANNEXES	238

INTRODUCTION

I- Développement du télencéphale chez l'homme

Ce premier chapitre est volontairement non exhaustif, il a pour but de rappeler les principaux événements au cours de la période embryo-fœtale qui ont constitué les pré-requis nécessaires à la réalisation de notre travail de Thèse.

Schématiquement, le développement du système nerveux central (SNC) se déroule en deux phases. La première phase dite de construction anatomique correspond à la mise en place des différents constituants du SNC, associée à une haute activité proliférative selon un gradient temporo-spatial afin de générer le capital en neurones et cellules gliales issus des zones germinatives. Au cours de la seconde phase dite de construction fonctionnelle se forment les circuits intracérébraux grâce à l'acquisition de fonctions spécifiques telles que la synaptogénèse et la myélinisation, associées à des phénomènes de maturation cellulaire.

I-1- Premiers stades de développement

I-1-1- Formation du tube neural

A la fin de la 3^{ème} semaine de développement embryonnaire, trois événements majeurs surviennent: la mise en place du tube neural ou neurulation, l'apparition des somites et la délimitation de l'embryon. Le processus de neurulation correspond à la mise en place du tissu nerveux à partir de l'ectoblaste sous l'induction de la corde dorsale à la fin de la troisième semaine post-conceptionnelle (J17). La plaque neurale est formée à J18 par épaissement ectoblastique dont les bords prolifèrent pour former les bourrelets neuraux qui se recourbent pour former la gouttière neurale qui se ferme entre J25 et J27 et forme l'ébauche de l'ensemble du système nerveux central : le tube neural.

Le tube neural allongé selon l'axe rostro-caudal est centré par une lumière qui correspond aux futures cavités ventriculaires. Cette lumière est bordée par des cellules à haut pouvoir mitotique situées dans les zones germinatives qui migrent jusqu'en périphérie pour former la plaque corticale en cheminant au travers de la zone intermédiaire après leur sortie du cycle mitotique.

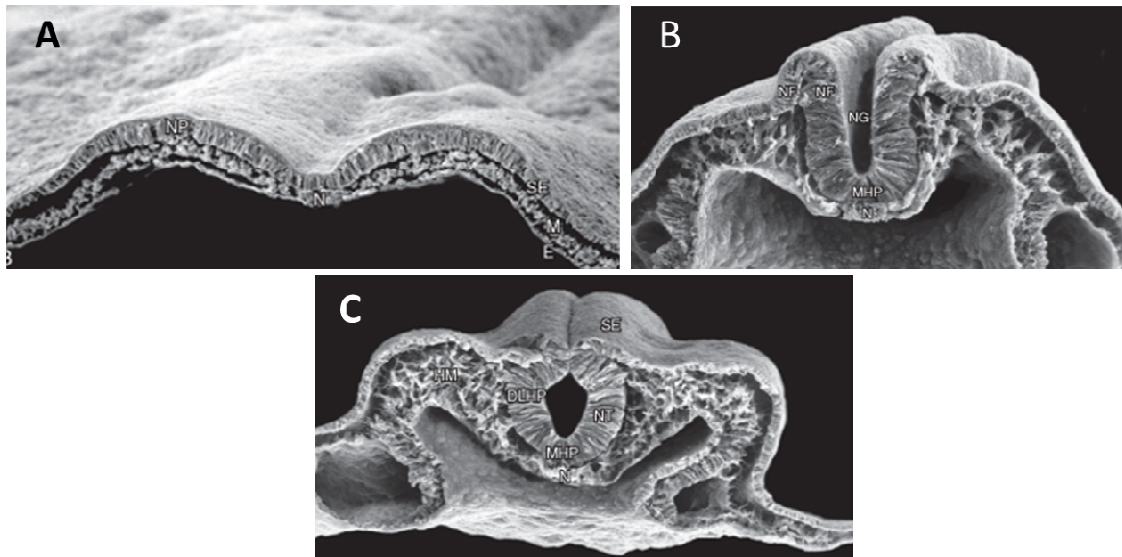


Figure 1 : Principales étapes de formation du tube neural. A : Stade de bourrelets (J19); B : Stade de gouttière (J23) ; C : Stade de tube neural (J27) [d'après Schoenwulf et coll., 2018].

Le phénomène d'induction neurale est lié à l'expression de molécules impliquées dans plusieurs voies signalétiques sécrétées dans des territoires appelés centres organisateurs. Trois voies sont indispensables à la spécification et la fermeture du tube neural : la voie Noggin, la voie Sonic Hedgehog (SHH) et la voie des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) qui permettent la fermeture du tube en créant des charnières, le mouvement consécutif des cellules dépendant de la voie non canonique Wnt/frizzled.

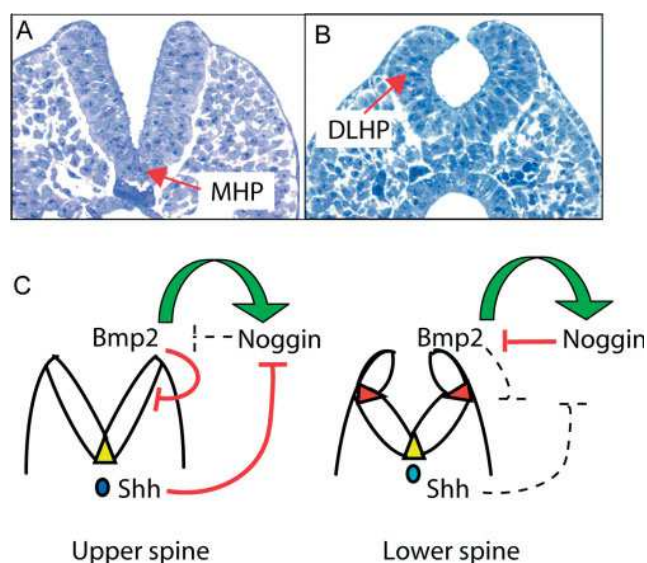


Figure 2 : Régulation moléculaire de la fermeture du tube neural. A et B : formation des charnières au niveau de la moelle épinière; C : dans la moelle cervicale, où SHH inhibe Noggin alors qu’au niveau de la moelle lombaire, SHH est diminuée et Noggin antagonise l’influence inhibitrice de Bmp2 permettant aux charnières de se former. En jaune : la charnière médiane, en rouge : les charnières dorso-latérales, les flèches vertes : action stimulatrice ; les lignes rouges : interactions inhibitrices ; lignes en pointillés : pas d’influence [d’après Copp et coll., 2010].

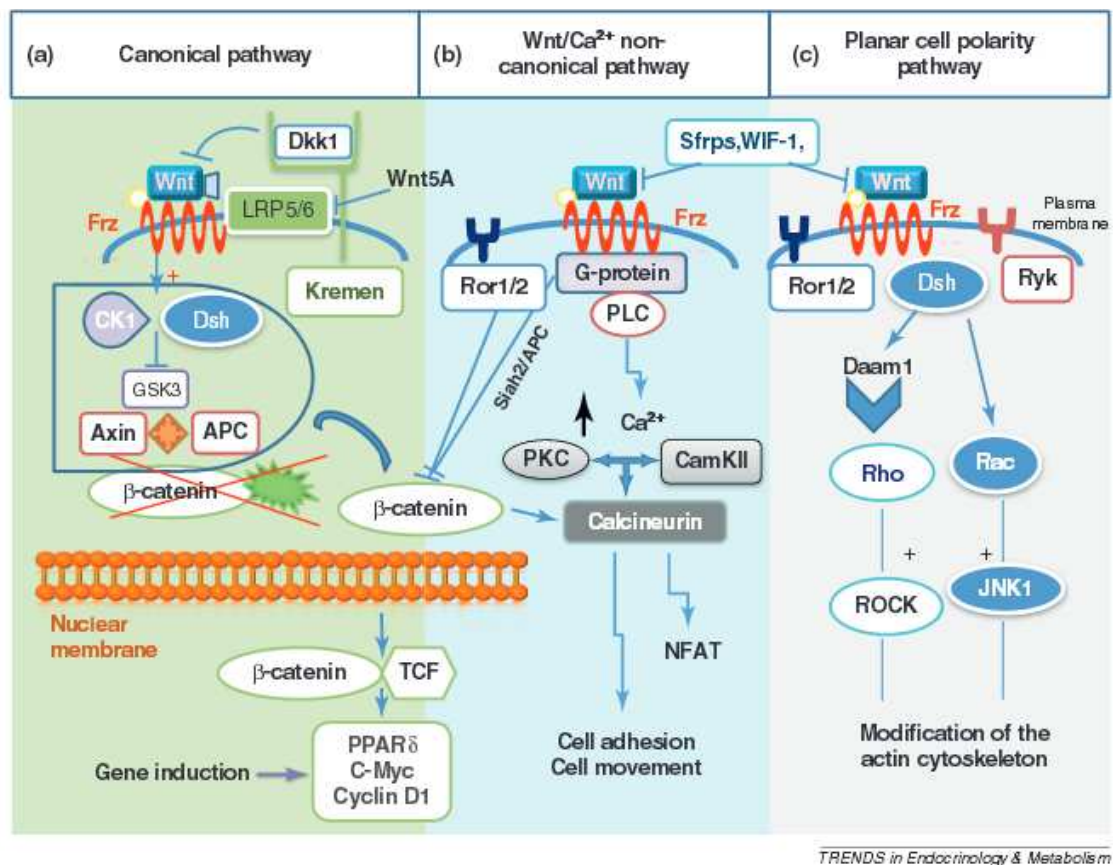


Figure 3 : Voies Wnt canonique et non canonique. La liaison de Wnt à Frizzled forme un complexe avec la G-protéine et la phospholipase C pour stabiliser la bêta-caténine induisant une libération de calcium intracellulaire grâce à l’activation de la cycline D1 et de C-MYC et de l’inactivation du complexe APC [D’après Marinou et coll., 2012].

Les centres organisateurs apparaissent dès la fermeture du tube neural. Le neuropore antérieur (Anterior Neural Ridge, ANR), l’organisateur isthmique situé entre le mésencéphale et le 1^{er} rhombomère (Isthmic organizer, Iso), les hems et anti-hems, et le centre ventral (Ventral center) sécrètent SHH, Fibroblast growth factors (FGFs), WNTs et BMPs, donnant

une information positionnelle par l'intermédiaire de gradients selon des axes dorsal-ventral, antéro-postérieur and medio-latéral. Le centre dorsal appelé cortical hem est une source dorsale des BMPs et WNTs, le centre ventral est une source de SHH, l'ANR est une source de FGF8 comme l'Iso, les régions anti-hems sont des sources de TGF- α and de FGF7. Ces centres organisateurs délimitent des régions spécialisées qui produisent différents sous-types de neurones et de cellules gliales : la région dorsale ou télencéphale dorsal produit des neurones pyramidaux et des astrocytes à destinée corticale ; la région ventrale ou télencéphale ventral comporte les éminences ganglionnaires médianes (MGE) et latérales (LGE), éminences ganglionnaires caudales (CGE) ainsi que l'aire pré-optique (POA), sources de facteurs de transcription associés aux voies de signalisation dorsales Neurogénine1/2 (NGN1, NGN2) et GLI3, et ventrales ASCL1, DLX1, DLX2. Ils produisent les neurones destinés aux noyaux gris sous-corticaux et des interneurones, dont les interneurones GABAergiques à destinée corticale.

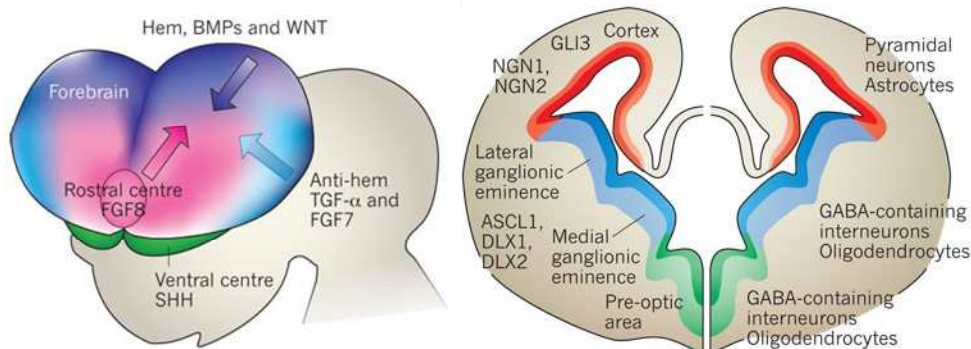


Figure 4 : A gauche : représentation schématique des centres organisateurs du télencéphale ; à droite : représentation schématique des domaines dorsal et ventral de production des cellules nerveuses [D'après Rowitch et Kriegstein, 2010].

Ainsi, dès la fin de la 4^{ème} semaine de développement, le tube neural est une structure polarisée selon un axe antéro-postérieur et une axe dorso-ventral : la polarisation dorso-ventrale s'acquiert sous l'influence de SHH sécrété dans la région ventrale de l'embryon, permettant l'acquisition d'un phénotype moteur, et des BMPs dans la région dorsale dont la sécrétion est responsable de l'acquisition d'un phénotype sensitif. La polarisation rostro-caudale se met en place grâce à la sécrétion d'acide rétinoïque qui induit l'expression des gènes *HOX* dans le rhombencéphale et la moelle ; sécrétion de FGF8 qui détermine la limite entre rhombencéphale et myélocéphale ; sécrétion de WNT1 au niveau du mésencéphale

qui diffuse de part et d'autre de l'isthme; dans la région rostrale ou plaque prochordale, sécrétion de protéines déterminantes pour la formation du prosencéphale.

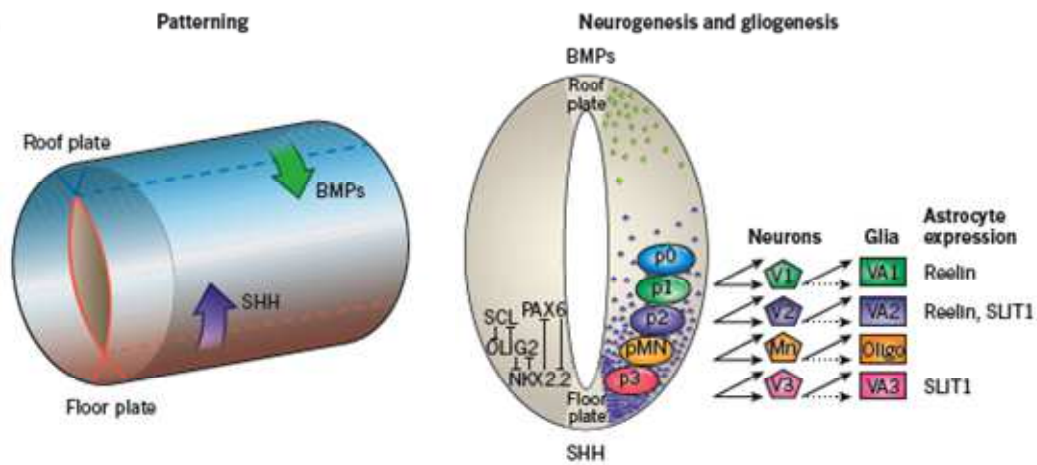


Figure 5 : Représentation schématique de la polarisation dorso-ventrale du tube neural [D'après Rowitch et Kriegstein, 2010].

**NEUROMERIC CODING OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM (Mammalian Model)
modified from JLR Rubenstein**

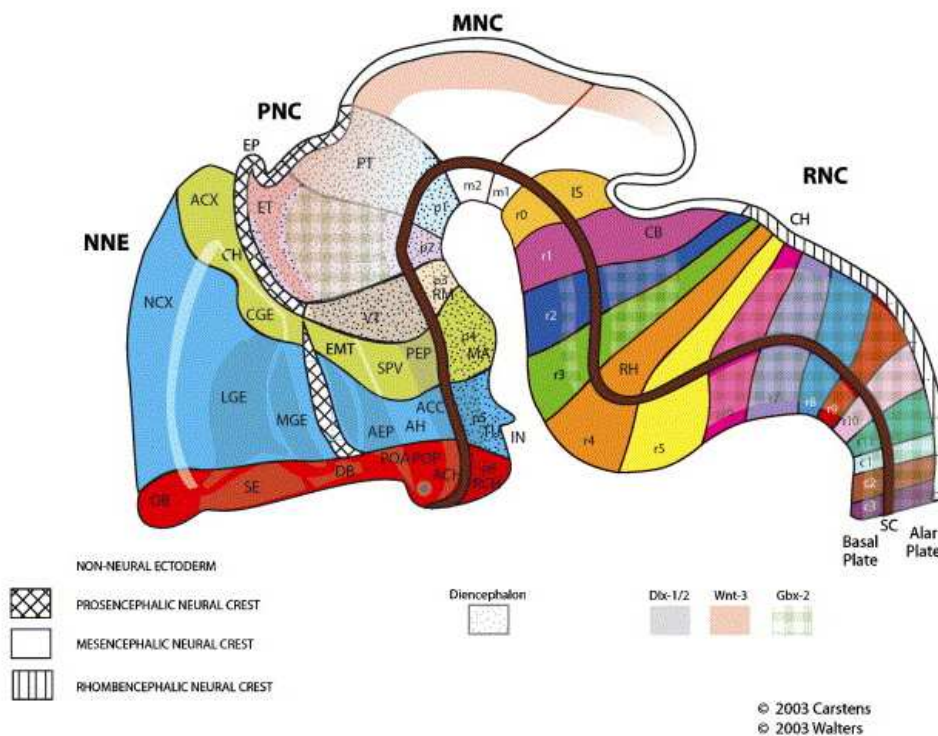


Figure 6 : Représentation schématique de la métamérisation du tube neural et de ses domaines ventral et dorsal [D'après Carstens, 2008].

I-1-2- Formation des vésicules cérébrales

Lors de la 4^{ème} semaine, l'extrémité rostrale du tube neural présente trois dilatations qui forment l'ébauche cérébrale. A quatre semaines de développement, le tube neural est constitué d'avant en arrière par trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Au cours de la 5^{ème} semaine, le tube neural évolue vers le stade de cinq vésicules : le rhombencéphale se divise en myélencéphale (futur bulbe rachidien ou medulla oblongata) et en métencéphale (futurs protubérance annulaire et cervelet). Le mésencéphale se scinde en tectum et tegmentum selon un axe dorso-ventral. Le prosencéphale donne naissance au diencéphale, structure médiane située à la face inférieure du prosencéphale à partir duquel dérivent le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus, et à deux évaginations latérales : les vésicules télencéphaliques, dont dérivent les futurs hémisphères cérébraux, les structures limbiques et les noyaux de la base. Les vésicules télencéphaliques sont réunies à leur extrémité rostrale par la lame terminale ou *lamina terminalis*, structure médiane qui correspond au point de fermeture du neuropore antérieur et constitue la structure à partir de laquelle se développeront les commissures dont le corps calleux.

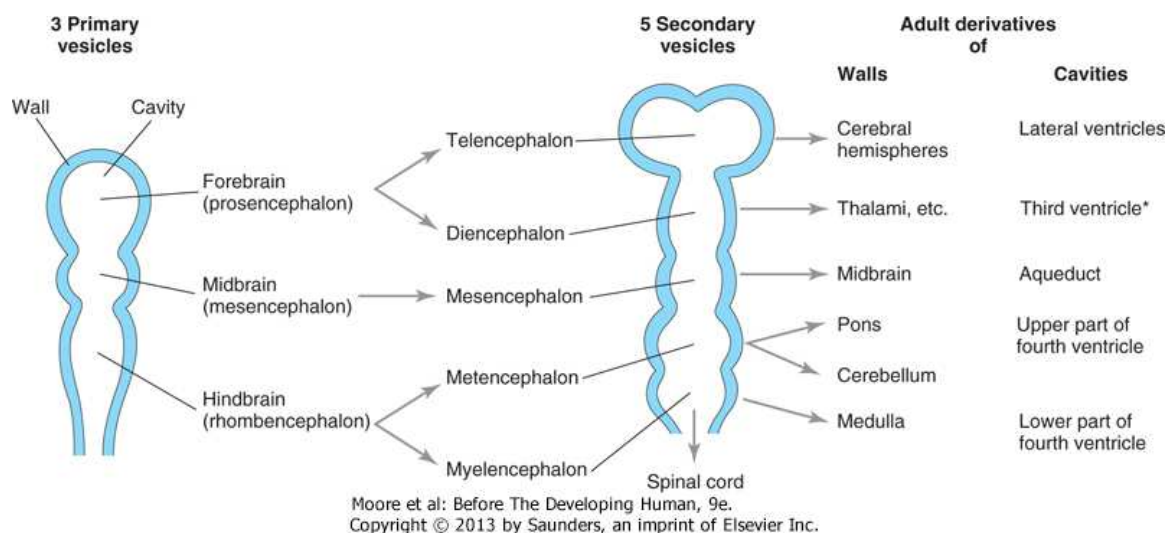


Figure 7 : Evolution du tube neural entre 3 et 5 semaines de développement [d'après Moore et coll., 2013].

La croissance ultérieure des hémisphères permet la formation des lobes frontaux, pariétaux, temporaux et occipitaux. L'accroissement de la surface de la plaque corticale est concomitant

de la formation des scissures primaires puis des sillons secondaires et des circonvolutions tertiaires.

I-1-3- Formation des cavités ventriculaires

Les cavités ventriculaires dérivent de la cavité épendymaire qui se forme lors de la fermeture du tube neural. Les cavités ventriculaires sont bordées par des cellules progénitrices, les cellules gliales radiaires, qui se transformeront en cellules épendymaires entre 26 et 28 SA. Le volume de la cavité épendymaire se modifie en se modelant sur l'évolution du tube neural. Dès le stade 5 vésicules, les différentes cavités ventriculaires sont reconnaissables. Au niveau du mésencéphale, la cavité épendymaire s'amincit progressivement au cours du 3^{ème} mois. Au cours du 4^{ème} mois, l'aqueduc de Sylvius acquiert sa configuration définitive et sera une zone préférentielle d'obstruction chez le fœtus [Del Bigio, 2010].

I-1-4- Formation des plexus choroïdes

Les plexus choroïdes ont une double origine embryologique : la composante mésenchymateuse (axe des villosités choroïdiennes) provient de la crête neurale par invagination de la méninge dans les cavités ventriculaires dès la période embryonnaire tandis que le revêtement épithélial cubique bordant l'axe des futures villosités choroïdiennes dérive du neuroépithélium. La spécification épithéliale des cellules neuroépithéliales survient précocement au cours de l'embryogénèse par répression des gènes proneuraux, en particulier de la neurogénine 2, et sous l'influence des facteurs de transcription Hes1, Hes2, Hes3 et Hes 5 qui favorisent le destin épithélial des progéniteurs situés dans le cortical hem, source de production des cellules de Cajal Retzius. D'autres facteurs de transcription tels qu'Emx2 et Otx2 interviennent dans la régulation et la survie des cellules épithéliales. La morphogénèse des plexus choroïdes est contrôlée par les BMPs, signaux dorsaux de la ligne médiane qui sont impliqués dans la constitution du revêtement épithélial unistratifié de type adulte [Lun et coll., 2015].

Dès la 6^{ème} semaine, la pie mère s'épaissit pour former la toile choroïdienne qui se superpose à l'épendyme. Les plexus choroïdes sont identifiés à 6 semaines dans le 4^{ème} ventricule, à 7 semaines dans les ventricules latéraux. Ils sont d'abord revêtus par un épithélium pseudostratifié qui devient cubique simple et riche en glycogène au cours du 3^{ème}

mois. La charge glyco-génique diminue à partir de 16 SA. La maturation de ces cellules est divisée en 4 stades selon leur aspect morphologique : 1- revêtement épithélial pseudostratifié, 2- revêtement épithélial cylindrique, 3- revêtement épithélial cubique et 4- faible teneur en glycogène et noyaux en position basal. L'épithélium recouvre un mésenchyme richement hématopoïétique qui devient progressivement pauci-cellulaire. Les plexus choroïdes occupent la majeure partie des ventricules jusqu' au 4^{ème} mois et les villosités choroïdiennes se développent par rétraction des plexus : le mésenchyme se condense, l'épithélium s'aplatit et adopte son aspect morphologique définitif [Del Bigio, 2010]. Les cellules épithéliales sont unies par des jonctions serrées qui maintiennent la polarité apico-basale des protéines membranaires et qui permettent l'établissement d'une barrière entre le compartiment sanguin et le liquide céphalo-rachidien (LCR) empêchant le passage des molécules présentes dans la circulation systémique vers le LCR. La vascularisation des plexus est assurée par les artères choroïdiennes antérieures et postérieures issues de l'artère cérébrale moyenne ainsi que de l'artère cérébrale postérieure pour les régions supratentorielles, et des artères cérébelleuses antérieures et postérieures provenant des artères vertébrales et du tronc basilaire pour les régions infratentorielles. Le riche réseau capillaire des plexus dont la croissance est sous la dépendance, outre du système VEGF, de SHH et de son récepteur Patched 1, est de type fenêtré, ce qui permet le passage de l'eau, des ions et des petites molécules [Lun et coll., 2015].

I-2- Mise en place de la plaque corticale

Le développement du cortex cérébral est un processus complexe qui s'échelonne depuis la 5^{ème} semaine embryonnaire jusqu' à l'âge adulte. Ce processus inclut prolifération, migration, établissement de la cytoarchitecture, différenciation et maturation neuronale : croissance axonale, développement des arborisations dendritiques, remodelage, synaptogénèse, maturation des systèmes de neurotransmission et myélinisation. Tous ces événements s'échelonnent à la fois dans le temps et l'espace mais surviennent de façon concomitante entre la 25^{ème} semaine de gestation et l'âge d'1 an. A noter que l'établissement des circuits intracorticaux (synaptogénèse et myélinisation) se poursuit jusqu' à l'âge adulte, les dernières connections intracorticales s'établissant vers l'âge de 30 ans.

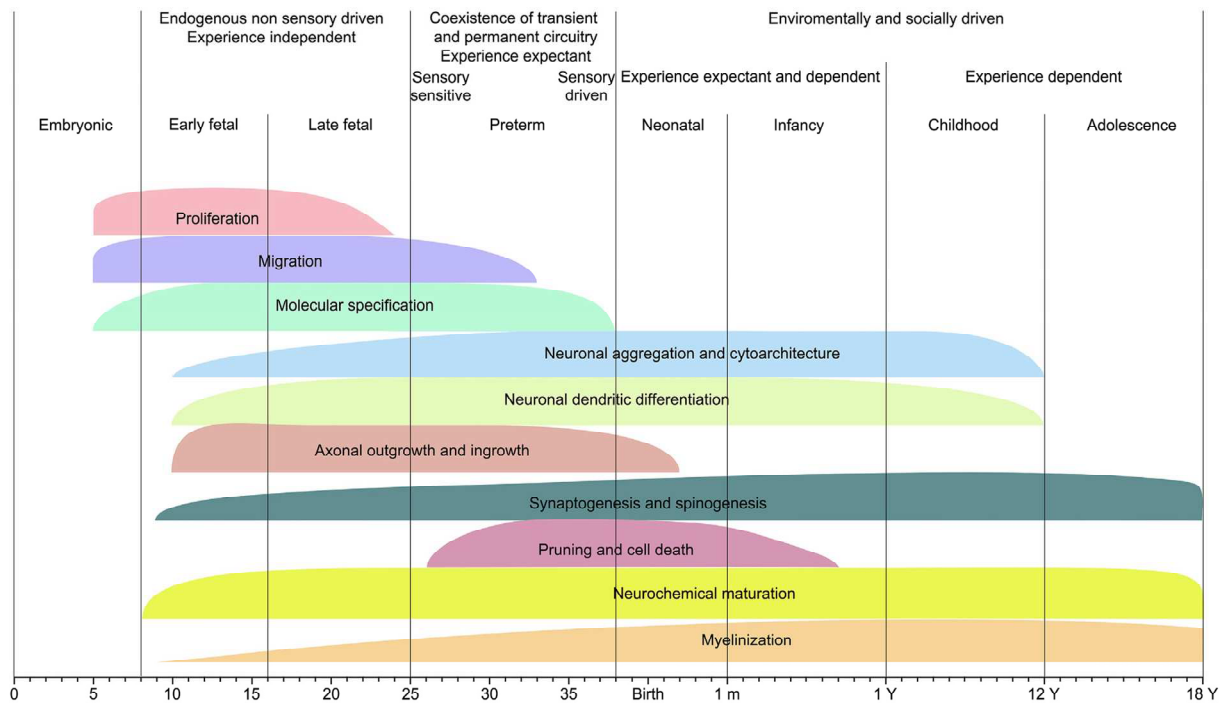


Figure 8 : Principales étapes du développement du cortex cérébral [d'après Kostovic et coll., 2019].

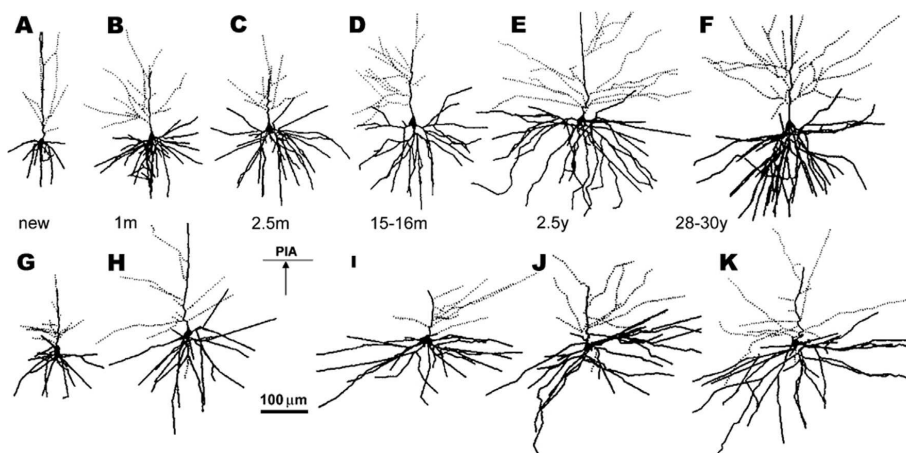


Figure 9 : Développement de l'arbre dendritique des neurones pyramidaux dans le cortex frontal humain par technique de tractographie [D'après Petanjek et coll., 2008].

I-2-1- Sources de production des cellules nerveuses

Les zones de neurogenèse sont divisées en une zone dorsale et une zone basale. La zone dorsale est appelée assise germinative du télencéphale dorsal (VZ/SVZ). Elle produit majoritairement des neurones effecteurs destinés aux voies de projection et aux voies associatives et est impliquée de façon plus restreinte dans la génération d'interneurones. La production d'interneurones dans la zone germinative du télencéphale dorsal suggère un rôle de coordination dans la localisation définitive des neurones effecteurs et interneurones. L'assise germinative du télencéphale dorsal disparaît entre 25 et 28 SA. La zone basale, essentiellement impliquée dans la production des interneurones s'épaissit et forme une protrusion intra-ventriculaire : les éminences ganglionnaires (GE). Celles-ci sont subdivisées par un sillon en éminences ganglionnaires médianes (MGE) et latérales (LGE). Une troisième zone constitue les éminences ganglionnaires caudales (CGE) formées par la fusion des MGE et des LGE au niveau de la partie médiane et caudale du thalamus. Les CGE comportent deux zones anatomiques: une zone ventrale et une zone dorsale qui saillent dans les ventricules. Dans ces zones s'expriment des protéines similaires à celles exprimées au niveau des MGE et des LGE.

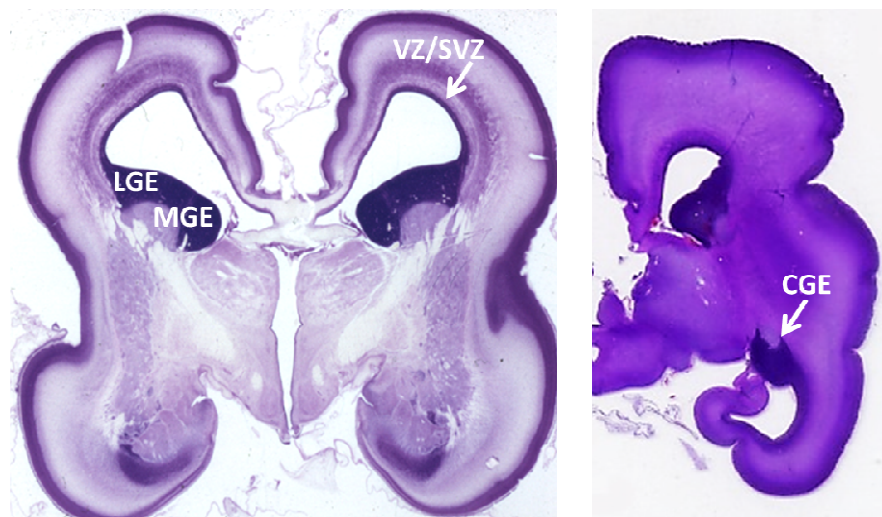


Figure 10 : Localisation des zones germinatives chez le fœtus humain à 24 SA sur coupe coronale passant par le diencephale antérieur à gauche, et par le diencephale postérieur à droite (coloration Hématoxyline-éosine ; données personnelles).

Une autre source de production, quoique mineure, est la couche granulaire externe transitoire (SGL) également appelée couche de Brun [Brun, 1965], située à la surface de la couche moléculaire, sous la méninge. Ces neuroblastes proviennent de la MGE et expriment le GABA.

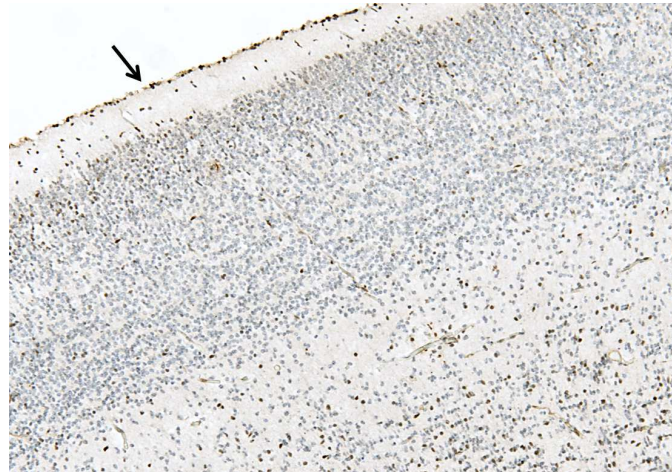


Figure 11 : Immunomarquage par un anticorps anti-GABA permettant de visualiser les interneurons au niveau de la plaque corticale et de la couche de Brun indiquée par la flèche (Données personnelles).

I-2-2- Modalités de production de cellules nerveuses

Dès la fermeture de tube neural, les cellules neuroépithéliales se multiplient et commencent à produire des neuroblastes. A partir de la VZ du télencéphale, les neuroblastes post- mitotiques migrent pour constituer les futurs neurones de projection et d'association au sein de la plaque corticale. La neuronogénèse à partir de la VZ s'effectue essentiellement pendant la première moitié de la grossesse par multiplication des cellules progénitrices formant le neuroépithélium qui expriment la nestine et les marqueurs épithéliaux de façon transitoire entre la 5^{ème} et la 6^{ème} semaine de développement. Après la 6^{ème} semaine de développement, les progéniteurs acquièrent un phénotype glial et sont appelés cellules gliales radiaires apicales (aRGs). Elles expriment vimentine, PAX6, SOX2 et HES1, et forment une couche de cellules d'aspect pseudostratifié à haut pouvoir mitotique situé le long de la lumière du tube neural. Cette couche de cellules est bordée par la SVZ qui est divisée en zone sous-ventriculaire interne (iSVZ) qui contient des progéniteurs intermédiaires (iPCs), et en zone sous-ventriculaire externe (oSVZ) qui contient non seulement des progéniteurs intermédiaires

exprimant TBR2 mais aussi des cellules gliales radiaires appelées cellules gliales radiaires basales (bRGs). Les aRGs, bRGs et iPCs seront à l'origine des lignées neuronales et gliales.

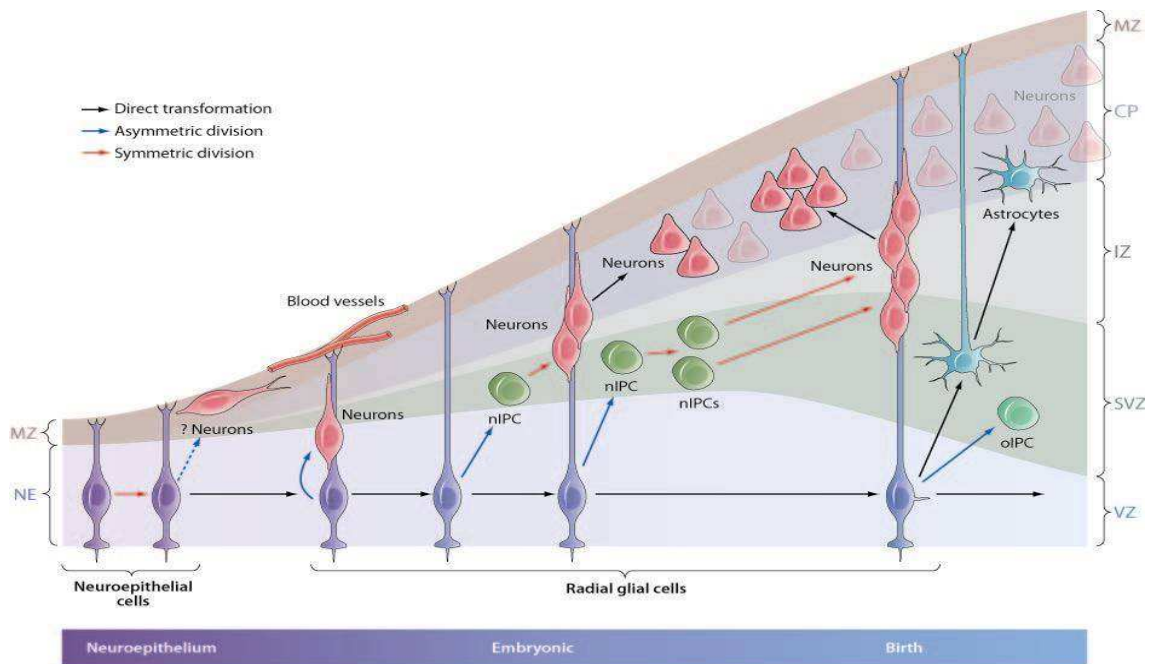


Figure 12 : Représentation schématique des principaux événements neurogénétiques à différents stades de l'histogénèse du système nerveux central [d'après Kostovic et coll., 2019].

La survenue des divisions asymétriques marque le début de la neuronogénèse soit par génération directe de deux neurones post-mitotiques, soit par génération indirecte en produisant deux progéniteurs intermédiaires puis neuroblastes post-mitotiques, soit enfin par génération indirecte produisant deux progéniteurs intermédiaires ou cellules gliales radiaires basales, amplification puis neuroblastes post-mitotiques. Les divisions symétriques permettent la génération de deux progéniteurs. Ce phénomène d'amplification permet d'augmenter considérablement le nombre de progéniteurs puis de neuroblastes post-mitotiques. La survenue des divisions asymétriques est liée à l'orientation du fuseau mitotique lors de la division des précurseurs :

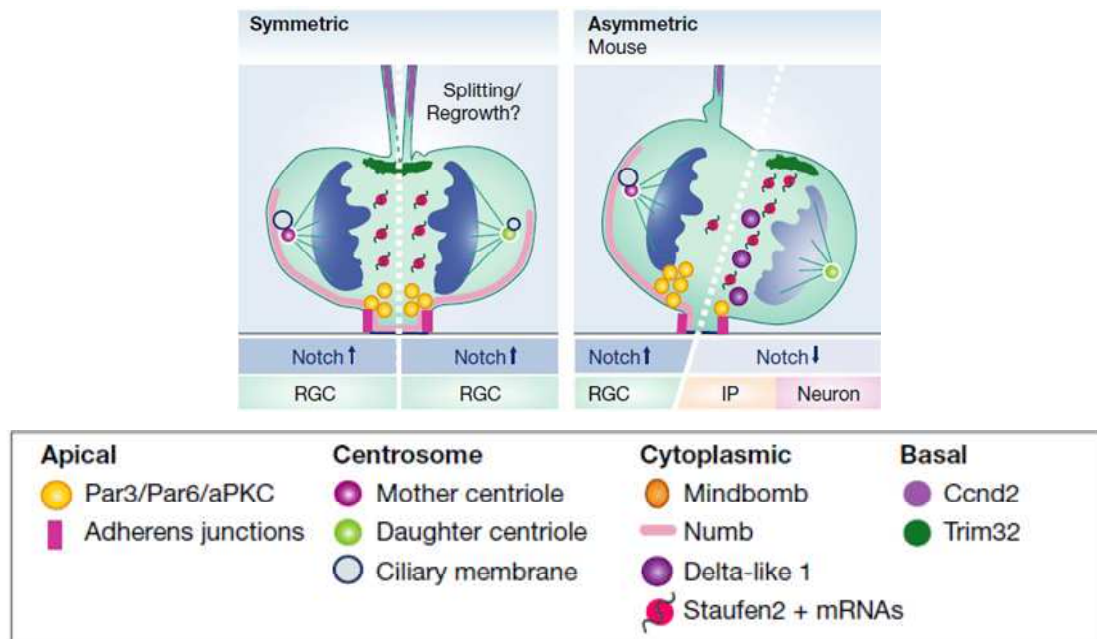


Figure 13: Les modes de division sont déterminés par l'orientation du fuseau ; les divisions symétriques donnent naissance à deux cellules progénitrices, les divisions asymétriques à une cellule progénitrice et un neuroblaste post-mitotique. L'orientation du fuseau est régulée par les protéines centrosomales et les complexes d'orientation du fuseau [d'après Paridaen, 2014].

I-2-3- Voies de migration

La migration neuronale sus-tentorielle s'effectue à partir des zones germinatives ventrale et dorsale jusqu'en surface pour former la plaque corticale, futur isocortex qui sera organisé en six couches. On distingue quatre modes de migration : la migration radiaire ou gliophilique le long de la glie radiaire, la migration tangentielle ou neurophilique empruntant des réseaux de fibres préexistants, la migration biphilique qui utilise les 2 modes migratoires précédents (migration des grains externes du cervelet vers la future couche des grains internes par exemple) et la migration vasculaire, le long des vaisseaux.

La migration radiaire le long de la glie radiaire est la voie empruntée par les neurones effecteurs. La glie radiaire le long de laquelle se déplacent les neuroblastes post-mitotiques est une expansion des cellules gliales radiaires apicales et basales qui s'insèrent sur une zone bordant la plaque corticale située sous la méninge : la glia limitans.

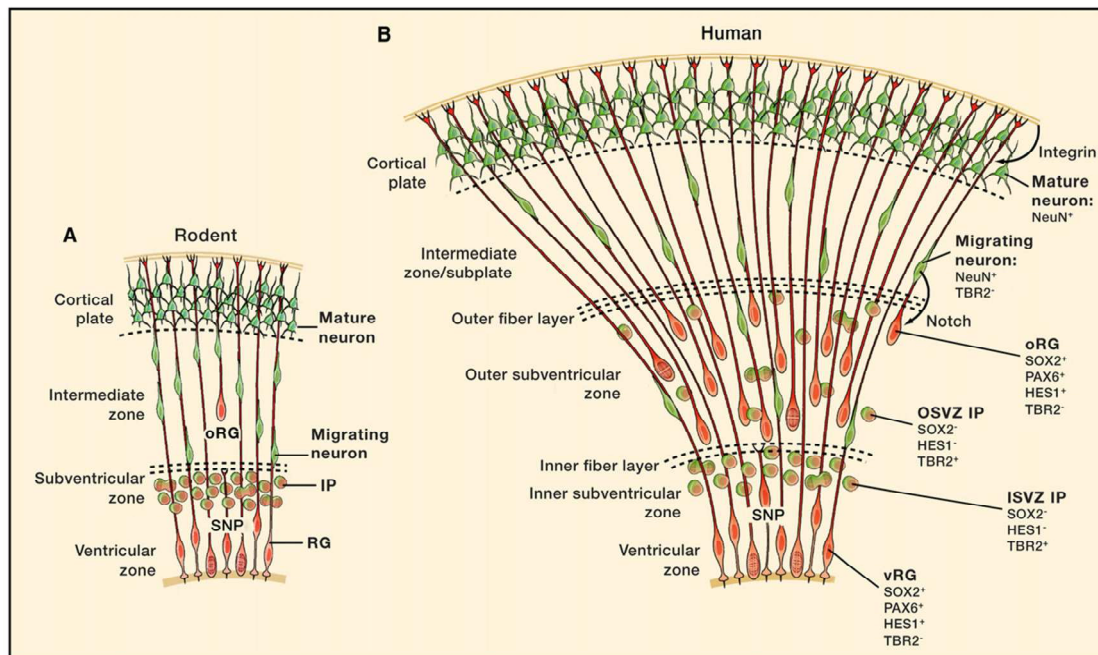


Figure 14 : Schéma comparatif du développement du cortex chez le rongeur et l’humain. Chez l’humain les cellules gliales radiaires génèrent le plus souvent des progéniteurs intermédiaires qui se divisent pour produire 2 neurones ou un neurone et un progéniteur [D’après Lui et coll., 2011].

L’enrichissement en fibres gliales radiaires est lié à la présence des iPCs et des oRGs qui permettent l’enrichissement considérable en neurones dans les couches superficielles du cortex humain comparativement aux autres espèces. Ce phénomène appelé expansion conique divergente permet d’augmenter considérablement le nombre de neuroblastes post-mitotiques migrant vers le futur cortex [Lui et coll., 2011 ; Hansen, 2011 ; Borrell et Götz, 2014 ; De Juan Romero et coll., 2015].

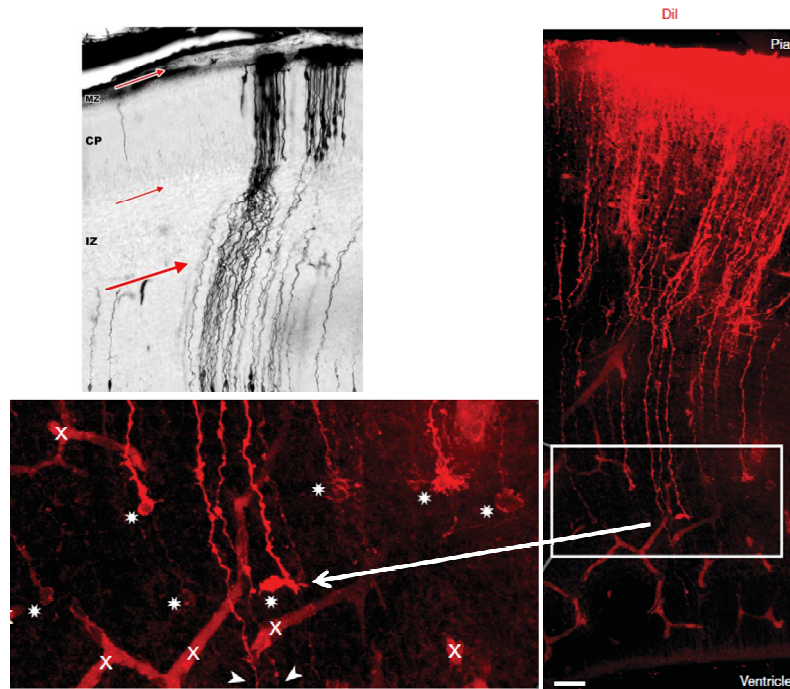


Figure 15 : Enrichissement de la glie radiaire à partir des oRGs (rectangle et flèche) : Organisation du futur cortex chez un embryon de 15 SA, l'insert agrandi en bas à gauche permet de visualiser les oRGs et les fibres gliales radiaires sous le manteau cortical [D'après Hansen et coll., 2010].

Les neuroblastes post-mitotiques migrent au travers de la zone intermédiaire (IZ), future substance blanche en formant des fronts de migration. Ils se déplacent sous l'influence d'une multitude de signaux médiés soit par les composants de la matrice extracellulaire, soit par l'activation de récepteurs de membrane, par la reeline, les éphrines, la voie Wnt et acide rétinoïque. L'extrémité antérieure ou leading edge du neuroblaste s'étend grâce à l'inhibition de RhoA par PIK3 et les extrémités « plus end » des microtubules sont recrutées par l'actine à l'apex. Il s'y associe un remodelage des microtubules au niveau du segment intermédiaire du leading edge sous l'influence de CDK5 et Dab. Le centrosome se projette en avant grâce à l'activation de Par6/PKC and GSK3. Le noyau est propulsé vers l'arrière qui se rétracte grâce à l'action du complexe formé par la dynéine, Lis1, Ndel1 et Dcx, ainsi qu'à l'interaction entre la myosine II et l'actine [Jiang et Nardelli, 2016].

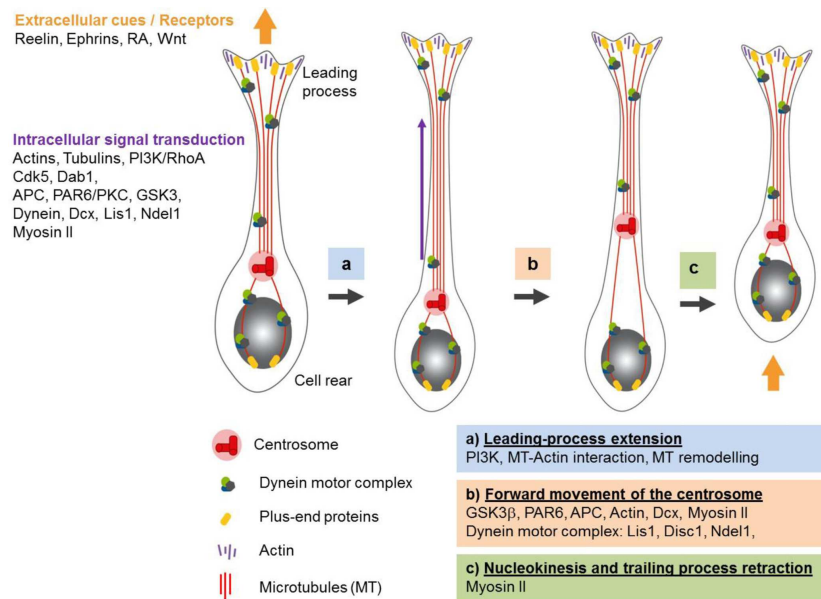


Figure 16 : Différentes étapes de la migration neuronale radiaire. La migration est médiée par des molécules de la matrice extracellulaire (cadhérines), par l'activation de récepteurs de membrane induite par la reeline, les éphrines, la voie Wnt ou l'acide rétinoïque [D'après Jiang et Nardelli, 2016].

La migration dite tangentielle est le mode essentiel de migration des interneurons et ne s'effectue pas le long de la glie radiaire, elle sera détaillée dans le chapitre II-1-2. Brièvement, les cellules empruntent des structures sans glie radiaire ou sans interactions neurone-glie. La migration tangentielle peut être parallèle à la surface du cerveau, le long des fibres axonales disposées tangentiellement à la surface du cerveau. Ce mode de migration s'observe aussi dans la VZ, la SVZ et la ZI, il concerne interneurons GABAergiques télencéphaliques issus des GE. Ce mode de migration survient très précocement et permet la formation de la préplaque.

La migration à la fois radiaire et tangentielle, appelée migration biphilique est utilisée par les neurones effecteurs et par les interneurons. Les neurones effecteurs adoptent d'abord un mode tangentiel dans les zones sous-ventriculaires où ils ont une morphologie multipolaire puis un mode radiaire de migration lorsqu'ils ont acquis une morphologie bipolaire. D'une façon similaire, les interneurons venant des GE entre 13 et 24 SA migrent d'abord selon un mode tangentiel dans la VZ/SVZ puis radiaire dans la zone intermédiaire superficielle vers le cortex. La migration à partir des GE est complexe car elle se fait à travers des territoires différents dans lesquels les interneurons sont exposés à des facteurs environnementaux

multiples qui guident leur migration qui passe d'un mode tangentiel à un mode radiaire [Marin, 2013].

La migration dite vasculaire a été plus récemment décrite, à la fois chez les rongeurs et chez l'homme. Ce mode de migration emprunté par les interneurons GABAergiques et par les précurseurs des oligodendrocytes (OPCs) exprimant le PDGFR- α sera détaillé dans le paragraphe consacré à la glie [Won et coll., 2013 ; Tsai et coll., 2016 ; Dejana et Betsholtz, 2016].

I-3- Formation de la plaque corticale

I-3-1- Mise en place du cortex cérébral

Tous les neurones effecteurs à destinée corticale proviennent de l'assise germinative du télencéphale dorsal et sont générés pendant la première moitié de la grossesse. La migration s'effectue selon un gradient inside-out le long de la glie radiaire.

I-3-1-1- Stade de préplaque

L'apparition de la préplaque est un phénomène très précoce mettant en jeu plusieurs types cellulaires. Dès la fermeture du tube neural, les premiers neuroblastes post-mitotiques migrent vers la zone du manteau. Dans la préplaque, les premières cellules sécrétant la reeline, les cellules de Cajal-Retzius, sont identifiées dès la sixième semaine de développement, soit un peu plus d'une semaine après l'arrivée des premiers neuroblastes post-mitotiques.

I-3-1-2- Stade de plaque corticale primitive

La plaque corticale primitive se forme par migration radiaire à partir de la VZ de neuroblastes post-mitotiques qui s'insèrent dans la préplaque qu'ils scindent en deux contingents inégaux : un superficiel peu abondant, la couche moléculaire contenant les cellules de Cajal Retzius et un profond plus abondant, la sous-plaque. Les neuroblastes post-mitotiques se positionnent dans la plaque selon un gradient inside-out, les neurones les plus précocement générés occupant les zones les plus profondes [Rakic, 1988]. Les couches profondes sont en place à 21 SA, et les plus superficielles à 24 SA soit à la fin de la migration radiaire des neurones effecteurs.

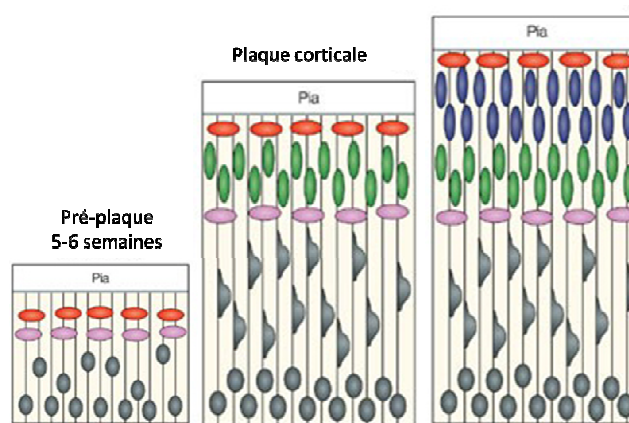


Figure 17 : Représentation schématique de la migration des neurones effecteurs selon le gradient inside-out au sein de la plaque corticale primitive : en orange, les futures cellules de Cajal Retzius ; en mauve, les neurones de la sous-plaque, en gris les neuroblastes post-mitotiques, en vert les neurones pyramidaux générés précocement ; en bleu, neurones migrant plus tardivement [d’après Gupta et coll., 2002].

La stratification appropriée des neurones effecteurs dans la plaque corticale est contrôlée par les cellules de Cajal-Retzius. L’aréalisation des neuroblastes post-mitotiques est acquise précocement et déterminée par une expression différentielle de gènes codant pour des facteurs de transcription exprimés selon des gradients eux-mêmes modulés par des gradients de morphogènes solubles provenant de régions définies. Ces facteurs de transcription contrôlent l’expression régionale de molécules d’adhésion et de récepteurs membranaires permettant de délimiter des aires aux fonctions spécifiques, notamment l’organisation des afférences thalamocorticales et des afférences provenant des noyaux de la base [Molnar et coll., 2019].

Par ailleurs, entre 11 et 13 SA apparaît une couche compacte de neurones qui recouvre toute la plaque corticale à 16 SA : la couche des grains externes transitoires (Subpial Granular cell Layer, SGL) qui n’est identifiable que chez les primates et est pratiquement absente chez les rongeurs. Ces neurones qui expriment le GABA et la calrétinine (CR) proviennent de la région péri-olfactive qui dérive des éminences ganglionnaires via le courant migratoire antérieur ou rostral migratory stream (RMS). La SGL est très épaisse à 22 SA, puis diminue progressivement à partir de 25 SA pour disparaître à 28 SA, comme les cellules de Cajal-Retzius transitoires. De nouvelles cellules de Cajal-Retzius ne sécrétant que de la reeline apparaissent juste sous la *glia limitans*, alors que un réseau de fibres calrétininergiques est

observé dans la moléculaire dont les corps cellulaires ont migré dans la couche des grains externes (couche II) par voie vasculaire [Meyer et Gonzalez-Gomez, 2018].

I-3-1-3- Stade de plaque corticale mature

Chaque couche de la plaque corticale mature contient préférentiellement un type de neurones. Les couches III, V et VI contiennent essentiellement des neurones pyramidaux et les couches II, III et IV des interneurones. L'organisation de l'isocortex en six couches identifiables après 26 SA comprend : la couche I couche moléculaire ou marginale, la couche II ou couche des grains externes, la couche III ou couche des petits neurones pyramidaux dont la majorité est à destination commissurale, la couche IV ou couche des grains internes, la couche V des grands neurones pyramidaux, appelés cellules de Betz dans les aires motrices 4 et 6 à l'origine de la voie corticospinale, enfin la couche VI constituée de neurones polymorphes [Kostovic et coll., 2019]. La couche IV ou couche des grains internes est d'abord présente dans toutes les aires corticales, puis disparaît à 34 SA dans le cortex moteur (aire 4 de Brodman) et prémoteur (aire 6 de Brodman), ensuite dans les zones associatives de 1^{er} et de second ordre au cours de la période néo-natale qui formeront l'isocortex dit agranulaire. Ces différentes couches contiennent des interneurones de morphologie variable : granulaires, bipolaires, multipolaires, en panier, en chandelier ou triangulaires et qui sont aussi caractérisés par leurs neurotransmetteurs spécifiques parfois co-exprimés: somatostatine (STT), neuropeptide Y (NPY), CR, cholécystokinine (CCK), peptide vasointestinal (VIP) et acide γ -amino-butyrique (GABA) qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau [Lim et coll., 2018].

I-3-1-4- Une structure particulière : la sous-plaque

La sous-plaque est un compartiment transitoire extrêmement volumineux chez l'humain contenant les neurones les plus précocement générés issus de la VZ et des GE puis des cellules gliales et des réseaux axonaux en cours de croissance. L'épaisseur de la sous-plaque est maximale à 30 SA et représente 40% du volume du télencéphale. Le phénotype des neurones est excitateur (glutamatergique) ou modulateur (GABAergique). Si leur rôle dans le guidage des afférences thalamocorticales vers la couche IV du cortex somato-sensoriel est établi depuis longtemps, ils jouent en fait un rôle important au cours d'autres événements clés du développement cérébral. Précocement, ils contrôlent la migration radiaire en établissant

des synapses transitoires avec les neurones multipolaires exprimant les récepteurs au N-méthyle-D-aspartate (NMDA) et induisent la transition des neuroblastes multipolaires en neurones bipolaires qui pénètrent la plaque corticale [Ohtaka-Maruyama et coll., 2018]. Ils interviennent dans le guidage axonal, la différenciation et la survie cellulaires ainsi que dans les phénomènes de plasticité synaptique en sécrétant des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) et jouent donc un rôle essentiel dans la formation des circuits corticaux. Au cours de la période périnatale, la majorité des neurones de la sous-plaque disparaît. Les neurones restants sont encore identifiés chez l'adulte et sont appelés neurones interstitiels [Hoerder-Suabedissen et Molnar, 2015].

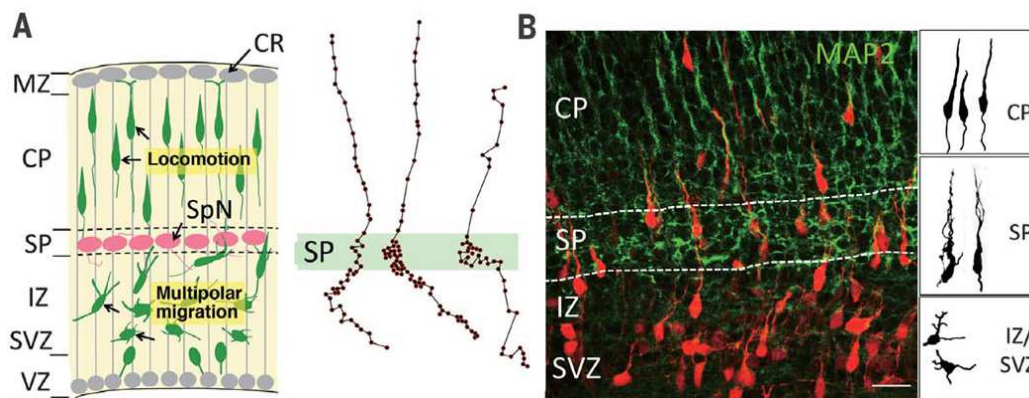


Figure 18 : Evolution morphologique des neurones de la sous-plaque : Les neurones ont d'abord une morphologie multipolaire. Après avoir acquis une morphologie bipolaire, ils commencent à migrer. Dans la sous-plaque, les neurones en migration adoptent une forme intermédiaire entre morphologie multipolaire et bipolaire [D'après Ohtaka-Maruyama et coll., 2018].

I-3-2- Mise en place des commissures

Les commissures cérébrales sont des faisceaux de substance blanche qui relient les deux hémisphères cérébraux et permettent ainsi au cerveau bi-hémisphérique de constituer un ensemble étroitement connecté. A 5 semaines, les deux vésicules télencéphaliques sont réunies en avant par la *lamina terminalis* primitive qui correspond au point de fermeture du neuropore antérieur. Les commissures cérébrales se développent à partir de cette *lamina terminalis* primitive. Celle-ci se modifie de façon importante entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine

de développement. Sa partie ventrale située à proximité du chiasma optique se modifie peu et deviendra la lame terminale définitive. Sa partie dorsale s'épaissit pour former une masse cellulaire située entre les éminences ganglionnaires appelée *lamina reuniens* d'où se développent les commissures cérébrales. A 8 semaines, des fibres provenant des parois ventro-latérales des vésicules cérébrales traversent la ligne médiane via la partie ventrale de la lamina reuniens et forment l'aire pré-commissurale ou *area praecommissuralis*, précurseur de la commissure antérieure. Ces fibres croisent la ligne médiane pour former la commissure antérieure. Au-dessus de l'aire pré-commissurale, se forme l'hippocampe primordial ou *primordium hippocampi*, future commissure fornicale. La commissure fornicale est formée à 10 semaines et permet d'associer les hippocampes aux tubercules mamillaires.

Le corps calleux, constitué de près de 200 millions d'axones, est la plus volumineuse des commissures cérébrales. Chez l'adulte, les corps cellulaires des neurones à destinée calleuse, situés majoritairement dans la couche III des petites cellules pyramidales de certaines aires corticales, émettent des axones qui traversent la ligne médiane et se projettent controlatéralement sur des aires le plus souvent homotypiques, mais parfois hétérotopiques. Le développement du corps calleux comporte trois étapes : commissuration (réalisation d'un point de passage entre deux hémisphères), puis passage des axones calleux au travers de la ligne médiane, enfin stade de maturation calleuse. Le corps calleux se forme dans la portion la plus dorsale de la *lamina reuniens*, en arrière de l'hippocampe primordial. Cette région s'invagine et forme une gouttière au fond de la scissure inter-hémisphérique. La méninge primitive bordant la gouttière se résorbe et ses berges fusionnent, isolant la gouttière de la scissure inter-hémisphérique. La masse ainsi formée appelée *massa commissuralis*, ébauche du corps calleux. Lors de la 11^{ème} semaine de développement, des neurones situés dans la plaque isocorticale émettent des axones qui traversent la masse commissurale et constituent le genou du corps calleux. La croissance des hémisphères entraîne celle des commissures par un mouvement d'enroulement autour des futurs thalami. Le genou se forme en premier, puis le corps, l'isthme et le splenium. Le rostre est le dernier à se mettre en place entre 18 et 20 SA. La portion de la lamina reuniens située entre le primordium hippocampi et la masse commissurale forme le septum pellucidum par cavitation (*cavum septi*) bordé par les deux feuillets du septum pellucidum. La maturation calleuse survient au cours de la période périnatale et chez le nourrisson par processus d'élimination axonale et de myélinisation. L'élimination postnatale des axones calleux est d'au moins 70% et s'effectue sans mort neuronale. Les axones éliminés proviennent de neurones situés normalement dans des zones acalleuses. La maturation calleuse permet le passage du stade néonatal à la situation adulte.

Certaines aires ne projettent pas sur le cortex controlatéral, elles sont appelées aires acalleuses et correspondent à des aires primaires : aires motrices (aires 4 et 6 de Brodman), aires sensibles (aires 1 et 2 de Brodman de la main et du pied), aire visuelle 17 de Brodman. Les axones éliminés proviennent également de neurones ayant établi des connections trans-calleuses aberrantes pendant la gestation et ce, dès la première semaine de vie. La myélinisation par les oligodendrocytes suit un gradient caudo-rostral et est responsable d'une augmentation de volume du corps calleux malgré l'élimination axonale [Catala, 2003 ; Richards et coll., 2004 ; Paul et coll., 2007].

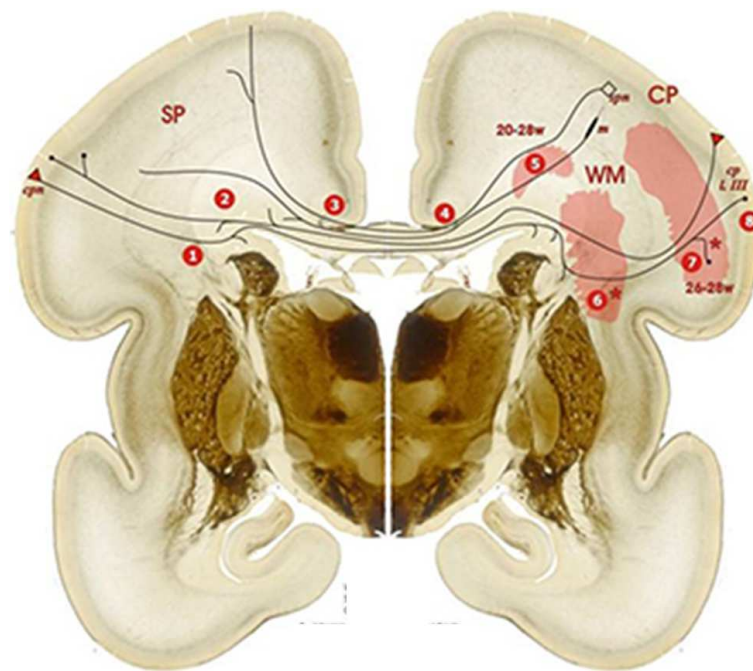


Figure 19 : Schéma représentant les modes de connexions inter-hémisphériques *via* le corps calleux. Les axones calleux traversent huit zones de croissance qui produisent des signaux chémoattractifs et chémorépulseurs [D'après Kostovic, 2019].

I-3-3- Mise en place des sillons et circonvolutions : la gyrification

L'apparition de scissures primaires puis de sillons secondaires et tertiaires permet d'évaluer la maturation de l'encéphale chez le fœtus humain. A 14 SA, les hémisphères cérébraux suivent un mouvement de bascule antéropostérieure. A 18 SA, la vallée sylvienne qui était sous forme de fossette depuis 14 SA se creuse et devient visible. A 22 SA, les fossettes correspondant aux futures scissures primaires apparaissent, en particulier le sillon

central ou scissure de Rolando. La vallée sylvienne forme un triangle comportant en avant de sa berge inférieure une fossette délimitant le futur lobe temporal. A 24-25 SA, les sillons post-central, intra-pariétal, occipital antérieur et frontal antérieur apparaissent. A 28 SA, les derniers sillons primaires frontal inférieur, temporal supérieur, moyen et inférieur, occipital latéral sont en place. Entre 28 à 32 SA, les sillons secondaires apparaissent. Les sillons tertiaires apparaissent à partir de 32 SA et sont formés à 35-36 SA. Les vallées sylviennes se ferment de façon asymétrique pour former les scissures sylviennes. A 38 SA, l'encéphale a une morphologie de type adulte.

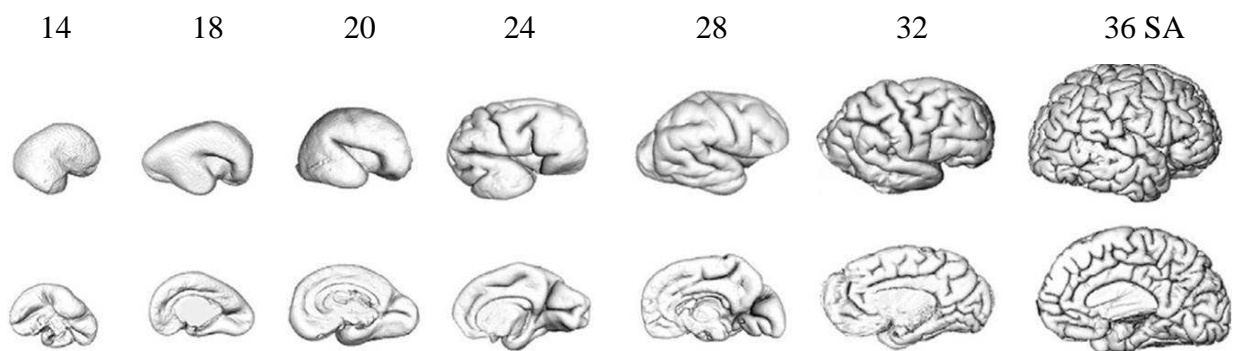
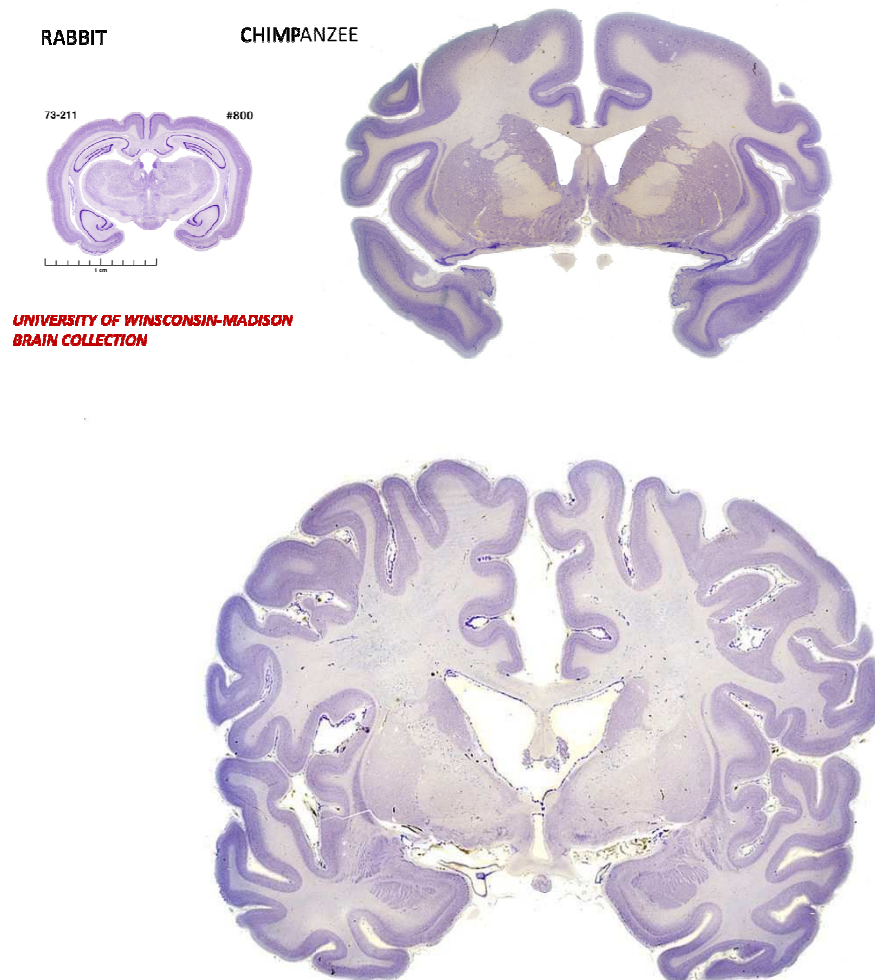


Figure 20 : Représentation schématique des principales phases de la gyrfication chez l'humain [D'après Kostovic, 2019].

La topologie et la présence de sillons varie en fonction des espèces. La formation des sillons primaires et secondaires est génétiquement déterminée. Les sillons primaires délimitant les lobes sont présents chez tous les mammifères. Les sillons intracorticaux sont présents chez les primates mais la gyration secondaire et tertiaire est spécifique d'espèce n'est retrouvée que chez les mammifères dits gyrencéphaliques. La topologie des sillons dépend également de multiples facteurs dont le plus important est la présence et l'abondance des différents types de progéniteurs notamment la présence d'oRGs, de la dynamique du cycle cellulaire au niveau des progéniteurs, de l'activation des voies de signalisation dans le neuroepithelium et le cil primaire, des mécanismes d'apoptose dont les dernières étapes sont régulées par l'autophagie, de l'expression différentielle de gènes contrôlant la génération des neurones dans les zones germinatives, des différences topologiques de l'expansion conique et du mode d'établissement des connections neuronales et neuro-gliales [Lewitus et coll., 2013 ; Sun et Hevner, 2014 ; De Juan de Romero et coll., 2015]. Chez les primates non hominiens, les oRGs produisent des précurseurs gliaux lorsque la neuronogénèse cesse. Ces cellules se

répartissent dans toutes les couches du cortex et dans la substance blanche avec des différences régionales, contribuant à la formation et à l'expansion des circonvolutions [Rash et coll., 2019]. Chez l'humain, la topologie des sillons tertiaires est soumise à des variations interindividuelles.



HUMAIN.

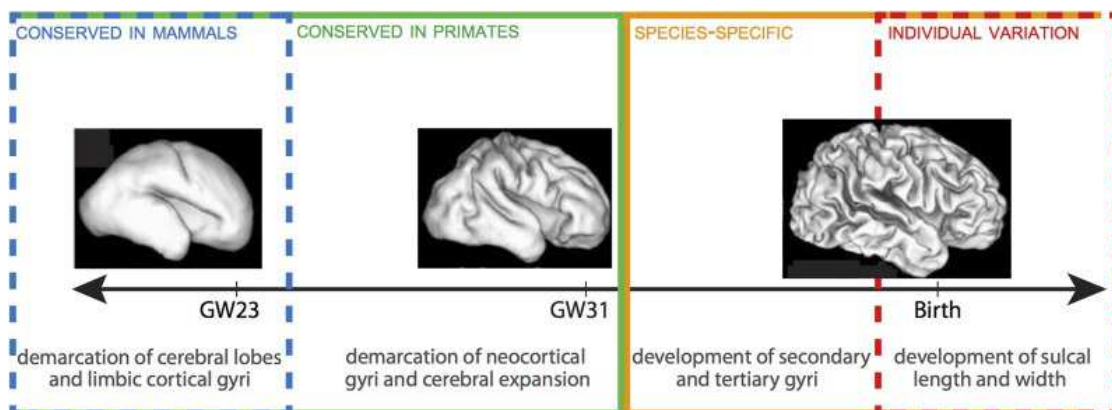


Figure 21 : Comparaison de l'évolution de la gyration chez les mammifères: la démarcation des sillons primaires est conservée chez les mammifères (lapin, singe et humain), la délimitation des sillons corticaux n'est présente que chez les primates (singe et humain). Le développement des sillons secondaires et tertiaires est spécifique d'espèce. La longueur et l'épaisseur des circonvolutions sont soumises à des variations individuelles [D'après Lewitus et coll., 2013].

Ces variations sont liées aux neurotransmetteurs sécrétés par les fibres afférentes des faisceaux sous-corticaux, en particulier les afférences thalamiques. Certains axones relarguent du glutamate, de l'acétylcholine et des facteurs de croissance qui influencent la formation des gyri en régulant la prolifération des iPCs et des oRGs. Les leptoméninges sécrètent des facteurs diffusibles tels les chémokines et l'acide rétinoïque qui régulent aussi la prolifération des iPCs et des oRGs.

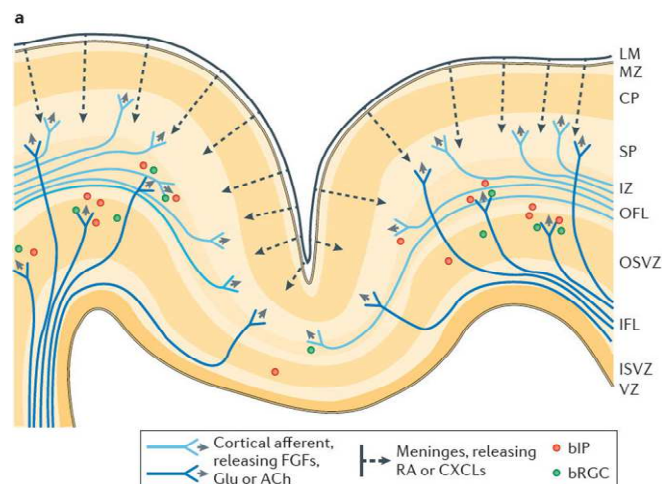


Figure 22 : Rôle des afférences corticales et des meninges au cours du processus de gyrogénèse [D'après Sun et Hevner, 2014].

I-4- Maturation des cellules nerveuses

Les neurones du cortex cérébral sont divisés en deux grandes classes : les neurones effecteurs qui sont excitateurs, soit de projection participant à la formation des voies longues, soit destinés à constituer les voies associatives, et les neurones neuromodulateurs ou inhibiteurs, correspondant aux interneurones qui sont destinés à l'établissement de connexions locales.

I-4-1- Neurones effecteurs

Les neurones de projection et d'association sont des neurones de morphologie pyramidale situés dans les couches III, V et VI. Ces neurones émettent des cônes de croissance dont l'élongation en direction de leur cible permet l'établissement de jonctions intercellulaires de signalisation spécialisées, les synapses.

Au cours du développement, la croissance de l'axone ainsi que son guidage jusqu'à sa destination finale sont assurés par cette structure transitoire qu'est le cône de croissance qui explore l'environnement extracellulaire sous l'influence de signaux spécifiques grâce à des lamellipodes et filopodes contenant actine et myosine, qui s'allongent ou se rétractent [Marin et coll., 2010]. Les signaux de guidage peuvent être attractifs ou répulsifs agissant localement ou à distance afin de supprimer les trajets et donc les connections aberrantes. Ces signaux sont de deux ordres, non diffusibles ou diffusibles. Les signaux diffusibles comprennent les molécules de la matrice extracellulaire (MEC), laminines, collagènes et fibronectine, et les molécules d'adhérence cellulaire (CAMs et cadhérines) alors que les signaux non diffusibles sont des substances chémoattractives comme les molécules de la famille des nétrines/Slit ou chémorépulsives comme les sémaphorines ou les éphrines [Skaper et coll., 2001 ; Marín et coll., 2010].

Grâce à des approches combinées de neuro-histologie, d'IRM *in vitro* sur coupes macroscopiques avec mesures volumétriques des différentes structures cérébrales et d'études par tractographie, Kostovic et coll. ont étudié les différentes phases de la croissance axonale, de la synaptogénèse et de la mise en place de la connectivité intracérébrale humaine. Dès la fin de l'embryogénèse, les afférences en provenance du tronc cérébral sont connectées aux structures supratentorielles de même que les connections entre noyau amygdalien et cortex temporal. Entre 15 et 25 SA apparaissent les premières arborisations dendritiques dans la zone marginale et la sous-plaque. Entre 24 et 28 SA, les afférences thalamiques et les fibres thalamocorticales se connectent. Avant 24 SA, les afférences thalamiques (voie spinothalamique) traversent les régions périventriculaires, se placent au contact de la capsule interne, puis cheminent dans la zone intermédiaire et atteignent la sous-plaque où elles « attendent ». Ces afférences en attente au niveau de la sous-plaque ne se connectent à la couche des grains internes qu'au troisième trimestre. Les projections passant par la capsule externe se projettent dans toutes les aires corticales.

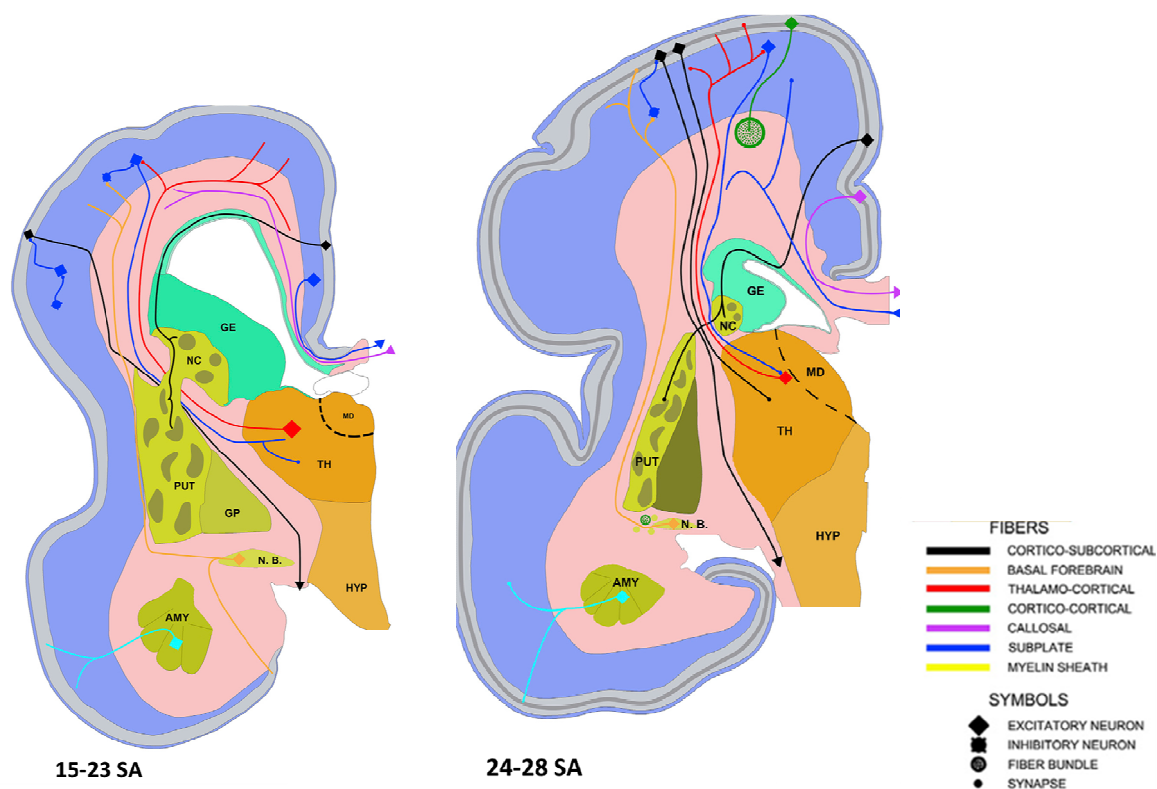


Figure 23 : Schématisation de la croissance des faisceaux et des connexions cérébrales au cours de la première moitié de la grossesse : entre 15 et 28 SA, les voies en croissance en provenance ou à destination de la plaque corticale sont les voies limbique, thalamo-corticale et cortico-thalamique, cortico-striatale, cortico-spinale, cortico-pontines et les fibres cortico-corticales; les structures transitoirement connectées sont les afférences du noyau basal de Meynert au cortex, et la voie thalamo-corticale qui est temporairement connectée aux neurones de la sous-plaque; les voies définitivement connectées sont les afférences provenant du tronc cérébral et de la moelle [D'après Kostovic et coll., 2019].

La période 29-34 SA est marquée par une croissance importante des voies associatives, ainsi qu'à un développement intense des synapses et des arborisations dendritiques. C'est à ce moment que la production d'oligodendrocytes est majeure. L'organisation du néocortex en six couches devient histologiquement évidente. Les voies de projection entre cortex, thalamus, striatum, protubérance annulaire et moelle sont en place. Les voies associatives, conjointement aux voies longues ascendantes et descendantes forment la corona radiata ou centre semi-ovale. Leur trajet se modifie et s'adapte aux circonvolutions secondaires qui se développent activement. La future substance blanche se segmente en quatre

compartiments distincts : corps calleux, carrefours périventriculaires, *corona radiata* et substance blanche sous-corticale.

La période néonatale est marquée par la disparition des connexions transitoires : afférences provenant des noyaux cholinergiques de la base, connexions cortico-striatales et connexions cortico-limbiques.

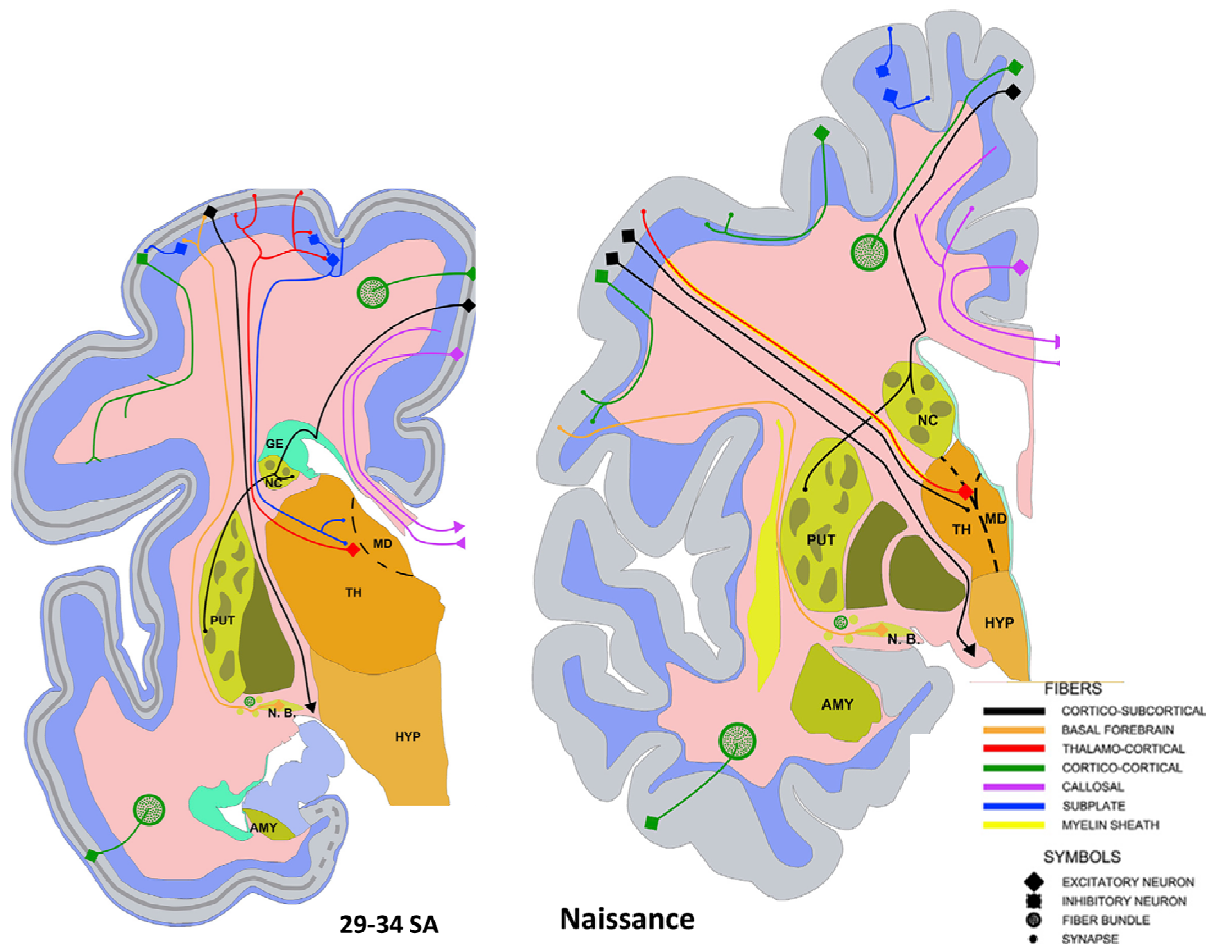


Figure 24 : Schématisation de la croissance des faisceaux et des connexions cérébrales au cours du dernier trimestre de la grossesse. Entre 29-34 semaines, les voies en croissance sont les fibres calleuses à destinée corticale et les voies associatives; une partie de la voie thalamo-corticale et de la voie cortico-striatale est encore transitoirement connectée; une autre partie des fibres thalamo-corticales, cortico-thalamiques, cortico-striatales, cortico-spinales, cortico-pontines et limbiques sont déjà connectées. A la naissance, les fibres calleuses et les autres faisceaux d'association sont encore en cours de croissance ou transitoirement connectés [D'après Kostovic et coll., 2019]

Les premières terminaisons synaptiques sont identifiées au sein du cortex cérébral humain dès la 9^{ème} semaine de gestation au niveau de la moléculaire et de la sous-plaque et proviennent de neurones monoaminergiques du tronc cérébral. Elles se développent massivement à partir de la deuxième moitié de la grossesse, et les premières synapses thalamocorticales se forment entre 24 et 28 SA, période à laquelle les synapses sont plus développées dans l'hippocampe (archéocortex) que dans l'isocortex. La formation de synapses se poursuit pendant plusieurs années. Après cette période de synaptogénèse intense, le nombre de synapses diminue de près d'un facteur 2 durant la 2^{ème} décennie par phagocytose astrocytaire et microgliale. Le nombre de synapses se stabilise au cours de la 3^{ème} décennie, période d'établissement définitif des circuits intracorticaux [Petanjek et coll., 2011].

Il existe de multiples variétés de synapses selon leurs propriétés biochimiques, le type de neurotransmetteurs, la composition des récepteurs post-synaptiques et leur plasticité à court et à long terme. De nombreuses molécules sont impliquées dans l'établissement des connexions, notamment les CAMs qui initient la formation des synapses puis médient l'organisation bidirectionnelle des versants pré- et post-synaptiques. Le relargage présynaptique de neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA est également impliqué dans la formation de la synapse, de même que de multiples CAMs synaptiques : neuréxines et leurs ligands, latrophilines, BAIs (Brain Angiogenesis Inhibitors), téneurines, RRTPs (LAR-type receptor-phosphotyrosine phosphatases), synCAMs, cadhérines, éphrines et leurs récepteurs, canaux calciques pré-synaptiques et récepteurs post-synaptiques aux neurotransmetteurs. Dès que la cellule cible est atteinte, le cône de croissance se différencie en arborisation terminale et établit des connexions étroites avec cette cellule. Cette adhésion cellule-cellule est dépendante du calcium et est régulée par des cadhérines qui forment des adhésions de faible ou de forte adhérence. La reconnaissance entre les éléments pré et post-synaptiques est réalisée par l'intermédiaire de la SynCAM1 présente au niveau du cône de croissance et les cadhérines [Arikkath et Reichard, 2008] qui en se liant à l'actine, permettent la stabilisation de la future synapse. Puis la zone présynaptique se développe grâce à un réseau de protéines d'échafaudage caractérisé par une accumulation de vésicules synaptiques et de transport avec une forte concentration de canaux calciques indispensables au processus d'exocytose. Sur le versant postsynaptique se développe une région appelée densité postsynaptique ou PSD qui contient des récepteurs aux neurotransmetteurs, des canaux, des protéines de transduction et un réseau de protéine d'échafaudage comme le PSD95, qui fait partie des MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase), S-CAM ou SAP102 (Synapse-associated protein 102) qui participe au recrutement des récepteurs

glutamatergiques post-synaptiques au niveau des synapses excitatrices. Deux protéines seraient particulièrement impliquées dans la mise en place des connexions synaptiques, la neuréxine présynaptique et la neuroligine postsynaptique qui possèdent la capacité de se lier l'une à l'autre [pour revue, Sudhof, 2018]. La liaison entre les neuroligines et les β -neurexines permet la formation et la stabilisation des éléments pré- et postsynaptiques ainsi que la liaison avec des protéines d'échafaudage. Les β -neurexines se lient aux protéines CASK (CALcium/calmodulin dependent Serine protein Kinase) et Mint (Msx2-interacting protein) qui permettent la liaison avec des canaux calciques. Elles sont indispensables à la libération des neurotransmetteurs. Les neuroligines peuvent se lier aux protéines PSD95 et S-CAM qui permettent le recrutement des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques.

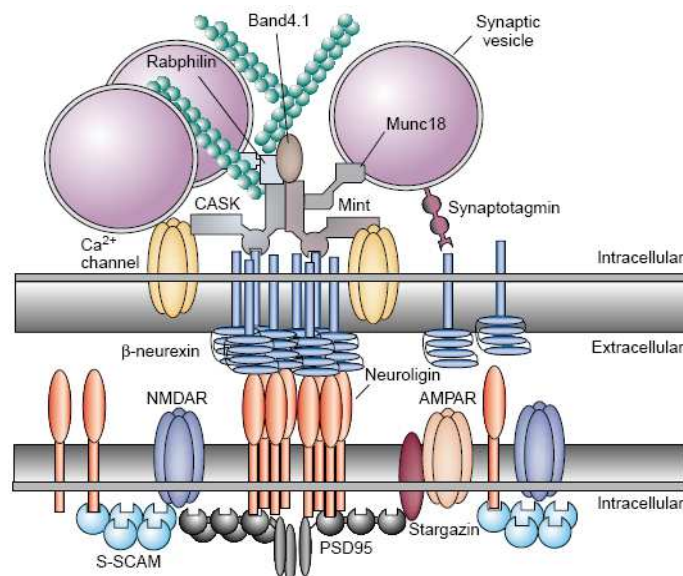


Figure 25 : Interactions moléculaires impliquées dans la synapse mature [D'après Dean et Dresbach, 2006].

I-4-2- Interneurones

Les interneurones constituent jusqu'à 30% des neurones corticaux selon les régions et sont indispensables à la mise en place des circuits intracorticaux. Ils sont classés en plusieurs sous-groupes qui diffèrent par leur morphologie, leurs connexions, les neurotransmetteurs sécrétés, sources de diversité fonctionnelle. Leur maturation est relativement tardive au cours de la période foetale et se poursuit après la naissance chez l'humain. Ils feront l'objet d'une étude détaillée dans le chapitre II.

I-4-3- Macroglie

La macroglie comporte : la glie radiaire transitoire qui est une caractéristique du cerveau en développement et sert de guide à la migration neuronale radiaire, la glie limitans et la glie définitive. La glie radiaire ne persiste que dans certaines structures : glie de Bergman dans le cortex cérébelleux et cellules de Muller dans la rétine. Les cellules gliales produites au cours du développement sont impliquées dans la migration car elles sécrètent des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion indispensables à la croissance et au guidage des neurones. La glie définitive comporte les épendymocytes, les astrocytes et les oligodendrocytes et représente plus de 50% des cellules dans le SNC.

I-4-3-1- Astrocytes

Les astrocytes proviennent de la différenciation de la glie radiaire et de précurseurs gliaux générés à partir des progéniteurs intermédiaires situés dans l'iSVZ dans des régions différentes et mutuellement exclusives des sites de production des oligodendrocytes. Avant 25 SA, ils sont majoritairement produits dans les régions de la VZ du télencéphale dorsal exprimant la neurogénine 2, par régulation négative de la neurogénine1 et de ERBB2, facteurs proneuraux [Rowitch et Kriegstein, 2010]. L'astrogénèse est maximale entre 15 et 25 SA. Il a été récemment démontré chez le singe que les astrocytes sont également générés à partir de l'oSVZ et migrent, comme les astrocytes précocement générés, par voie tangentielle puis radiaire et se différencient tout en gardant leur pouvoir mitotique. Cette gliogénèse à partir de l'oSVZ contribuerait à l'augmentation de la gyrification observée chez les primates [Rash, 2019]. Les astrocytes immatures expriment le vimentine et la GFAP- δ , comme les cellules gliales radiaires, et les astrocytes matures, la GFAP. Certains astrocytes expriment non pas la GFAP, mais Olig2 et sont localisés dans des territoires mutuellement exclusifs. On les observe dans les noyaux magnocellulaires de la base, le thalamus et les noyaux profonds du cervelet au niveau desquels les neurones expriment aussi les transporteurs du GABA, suggérant que cette sous-population particulière qui exprime le transporteur- 3 du GABA est impliquée dans la neurotransmission inhibitrice [Tatsumi et coll., 2018]. Les cellules gliales radiaires persistant le long des cavités ventriculaires se différencient en cellules épendymaires après 26 SA. En fin de gestation, l'astrogénèse est stimulée par trois voies : Notch, BMPs et la cytokine IL6 [Jiang et Nardelli, 2016].

I-4-3-2- Oligodendrocytes

Chez la souris, les précurseurs oligodendrogliaux (OPCs) sont produits en trois vagues successives, la première dans la MGE, puis les deux suivantes dans les LGE après régulation négative des gènes proneuraux et positive des gènes progliaux au niveau des progéniteurs de la VZ. Ils apparaissent à E12, empruntent le réseau du plexus vasculaire périventriculaire provenant du plexus méningé superficiel, parviennent à la jonction télencéphale dorsal-télencéphale ventral. Le nombre d'OPCs augmente considérablement entre E16 et E18 dans le cortex. Les pré-oligodendrocytes (pré-OLs) exprimant le facteur de transcription Olig2 envahissent le cortex dès E18 [Tsai et coll., 2016]. Chez l'homme, les oligodendrocytes sont essentiellement générés au cours de la seconde moitié de la grossesse, avec un pic maximal de production débutant vers 30 SA, leur nombre croissant encore après la naissance. Cependant, les premiers pré-oligodendrocytes sont observés dans la partie superficielle de la plaque corticale à partir de 14 SA, et la migration concomitante d'OPCs et de pré-oligodendrocytes est identifiée entre 18 et 24 SA.

La migration tangentielle est active pendant toute la durée de la grossesse et est le premier mode de migration des oligodendrocytes. Le second mode de migration est vasculaire. L'attraction des OPCs vers les vaisseaux est sous le contrôle d'une chémokine, le Cxcr4, et de la voie canonique Wnt. L'interaction entre vaisseaux et OPCs s'effectue par des molécules de la MEC et des protéines d'adhésion, en particulier le Gpr124 qui contribue non seulement à l'angiogénèse mais aussi à la formation de la barrière hémato-encéphalique [Chang et coll., 2017]. Les OPCs migrent en rampant le long des vaisseaux et en sautant d'un vaisseau à l'autre. Ce phénomène ne nécessite pas la présence de péricytes mais nécessite l'intégrité de l'endothélium donc la production de signaux endothéliaux appelée voie de signalisation angiocrine [Dejana et coll., 2016].

La spécification des OPCs requiert l'activation de la voie Shh qui contrôle les facteurs de transcription Nkx2, Gsh2, Olig1/2 et Ascl1 autrefois appelé Mash1, alors que les signaux dorsalisants (BMPs) induisent la spécification astrocytaire. La myélinisation est un processus complexe auquel on reconnaît plusieurs phases : prolifération et migration des OPCs dans les faisceaux de la future substance blanche, reconnaissance des axones cibles et signalisation axone-glie, différenciation en oligodendrocytes myélinisants, enroulement de la myéline autour des axones, puis compaction de la myéline et enfin formation des nœuds de Ranvier. La prolifération et la différenciation des OPCs sont régulées par des signaux neuronaux, positivement par Olig1/2, SOX10 et Ascl1, et négativement par Lingo1 et Gpr17. Afin

d'assurer un nombre équivalent d'oligodendrocytes à celui des axones qui doivent être myélinisés, les OPCs sont produits en excès sous l'influence des facteurs de croissance Platelet Derived Growth Factor- α (PDGF-A), FGF-2, Insulin Growth Factor 1 (IGF-1), neurotrophine 3 (NT-3) et Ciliary Neurotrophic factor (CNTF) puis éliminés par apoptose. Les OPCs étant parvenus dans leur localisation définitive commencent à se différencier et expriment la Myelin Basic Protein (MBP) et la PhosphoLipid Protein (PLP). Il est à noter que dans le cerveau fœtal et adulte humain, certains OPCs restent au stade de précurseurs et l'on reconnaît quatre populations d'OPCs selon l'expression de leurs marqueurs de différenciation : les OPCs A2B5 +, les OPCs O4 +, les OPCs A2B5/O4 + et les OPCs Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) + [Leong et coll., 2014 ; Simons et Nave, 2015].

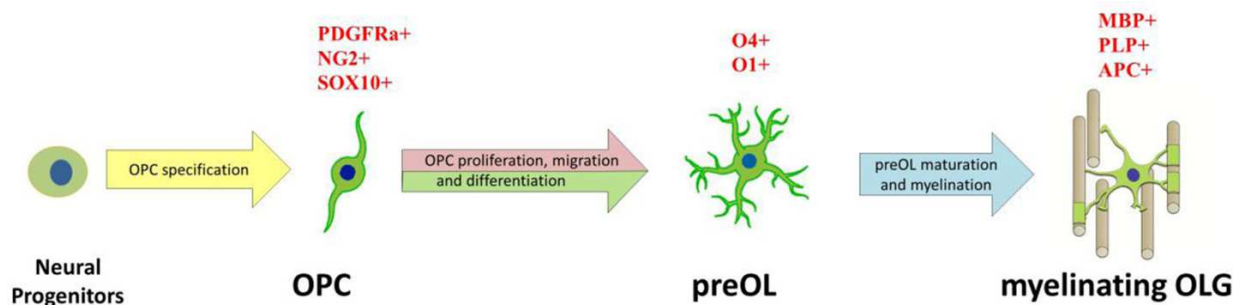


Figure 26 : Principales étapes du développement de la lignée oligodendrogliale [D'après Jiang et Nardelli, 2016].

La myélinisation dans le télencéphale humain apparaît au troisième trimestre. Par technique d'IRM avec séquences pondérées T1, il est possible de visualiser une pré-myélinisation dès 29 SA dans plusieurs structures, mais à la naissance la myéline n'est morphologiquement identifiée que dans le bras postérieur de la capsule interne. Toutes les autres structures supratentorielles se myélinisent après la naissance, principalement au cours des deux premières années de vie. En revanche, la myélinisation est précoce dans le tronc cérébral et le cervelet: axones du noyau du VIII à 16 SA ; axones des noyaux du V, X, et du XII, faisceau longitudinal médian, faisceaux tecto-bulbaires, corps trapézoïde et faisceau lemniscal latéral, et faisceau lemniscal médian à partir de 20 SA ; myélinisation débutante dans le tegmentum entre 21 et 24 SA : début de myélinisation des faisceaux sensitifs ascendants semaines, début de myélinisation vermienne, myélinisation autour du noyau

dentelé entre 24 et 28 SA ; myélinisation du faisceau lemniscal médian, du tegmentum et du vermis entre 28 et 32 SA. Entre 33 et 40 SA, la myélinisation est nette au niveau des faisceaux sensitifs alors qu'elle est débutante au niveau du faisceau pyramidal [Adamsbaum et coll., 2001].

I-4-4- La microglie

La microglie n'est pas produite par l'encéphale, mais provient de la moelle hématopoïétique et migre dans l'encéphale pour constituer le système histiocyto-macrophagique résident. Les cellules pénètrent par voie méningée et choroïdienne dès le stade d'hématopoïèse extra-embryonnaire (macrophages fœtaux d'origine vitelline), vasculaire (contemporaine de la mise en place de l'hématopoïèse intra-embryonnaire) et périventriculaire (à partir du plexus vasculaire périventriculaire situé dans SVZ). Ces cellules migrent ensuite en empruntant les faisceaux, en particulier la capsule interne et le corps calleux. La distribution de ces cellules devient uniforme à partir de 16 SA [Monier et coll., 2006].

I-5- Développement de la vascularisation cérébrale

I-5-1- Mise en place du système vasculaire

Les vaisseaux sanguins se développent selon deux modalités: vasculogénèse et angiogénèse. La vasculogénèse correspond à la prolifération de cellules issues du mésoderme, les angioblastes, qui se différencient en cellules endothéliales. La vasculogénèse débute en situation extra-embryonnaire dans la région de la vésicule ombilicale, entre J13 et J15, par la formation d'amas de cellules mésodermiques appelés îlots de Wolff et Pander constitués d'hémangioblastes. Au sein des agrégats, deux groupes de cellules s'individualisent : les cellules centrales et les cellules périphériques. Les cellules centrales donnent naissance aux hémocytoblastes, précurseurs des cellules sanguines. La formation intra-embryonnaire du tissu sanguin débute à la 5^{ème} semaine, dans le foie puis dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle. Les cellules périphériques donnent naissance aux angioblastes disposés en amas qui se tunnèllisent pour former un plexus vasculaire primitif autour de l'embryon établi au cours de la 3^{ème} semaine. Le développement de la vascularisation intra-embryonnaire ainsi que du tube cardiaque est induite par l'endoderme et se développe à partir

de cellules angioformatrices situées dans le mésoderme latéral (splanchnopleure) puis de cellules angioformatrices situées le long de la ligne médiane [Shoenwulf et coll., 2017].

Aux stades précoces de l'embryogénèse, la vasculogénèse et l'angiogénèse sont régulées par plusieurs voies de signalisation dont la plus importante est la voie VEGF. Les vaisseaux précocement formés sont les veines embryonnaires cardinales dont la destinée sanguine est liée à l'absence d'expression de Prox-1 (Prospero Homeobox protein 1), l'expression de Prox-1 constituant la première étape de la différenciation lymphatique, comme schématisé ci-dessous. Le destin artériel des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dépend principalement de la voie VEGF-Notch.

Les cellules futures endothéliales (angioblastes) produisent des signaux destinés aux tissus et organes en formation ainsi qu'aux cellules en contact direct avec elles par l'intermédiaire des récepteurs de basse et haute affinité au VEGF : cellules situées autour des gros vaisseaux appelées cellules murales correspondant aux futures cellules musculaires lisses et cellules du lit capillaire qui recouvre l'endothélium de façon discontinue, et péricytes. Lorsque les vaisseaux primitifs sont formés, des cellules mésenchymateuses recrutées sous la dépendance de signaux émis par l'endothélium viennent au contact des cellules endothéliales et forment progressivement la paroi des vaisseaux (cellules musculaires lisses et péricytes) sous le contrôle de la voie du PDGF dont les récepteurs sont exprimés par les progéniteurs des cellules musculaires lisses vasculaires, et de la voie du TGF- β .

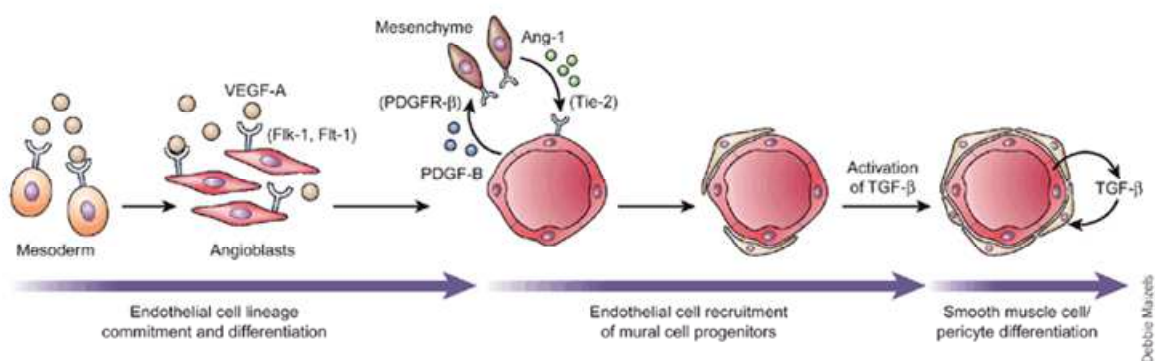


Figure 27 : Voies signalétiques impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins [D'après Cleaver et Melton, 2003].

Le VEGF qui appartient à la superfamille des facteurs de croissance représente le point clé de la régulation de l'architecture vasculaire de chaque organe, que ce soit au cours de

l'embryogénèse précoce, du développement fœtal ou de certaines pathologies telles que phénomènes de réparation tissulaire ou angiogénèse tumorale. Ce système comporte les VEGF A, B, C, D et le Placental-like Growth Factor (PlGF). Le VEGF-A est impliqué dans l'angiogénèse, le VEGF-B dans le développement du cœur et des vaisseaux coronaires, les VEGF-C et D dans la mise en place du système lymphatique. Les autres signaux clés sont le système angiopoïétine qui est secrété par l'environnement de la cellule endothéliale exprimant le récepteur tyrosine kinase Tie-2, le BMP2 qui est secrété par l'aorte dorsale permettant la différenciation des neurones de la crête neurale (système sympathique), le TGF β 1 qui induit la formation des cellules musculaires lisses à partir des cellules souches de la crête neurale, enfin le système angiopoïétine/ Tie (Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF factor homology domains). Parmi les quatre angiopoïétines, la 1 et la 4 stimulent le récepteur Tie2, alors que la 2 et la 3 ont une action inhibitrice sur ce récepteur. L'angiopoïétine 1 est exprimée dans le myocarde et dans les cellules musculaires lisses vasculaires et l'angiopoïétine 2 dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les sinusoides hépatiques. La génération de modèles murins a permis de préciser le rôle des angiopoïétines et des récepteurs Tie. Les souris dont le gène *Ang1* est invalidé présentent un défaut de développement de l'endocarde et du myocarde, une absence de péricytes, une diminution du nombre de gros vaisseaux et une létalité embryonnaire. La surexpression du gène *Ang1* chez la souris n'induit qu'une hypervascularisation cutanée, alors que la surexpression du gène *Ang2* reproduit le phénotype des souris invalidées pour les gènes *Tie*, à savoir un défaut d'intégrité des cellules endothéliales associé à des hémorragies et des œdèmes. Les souris invalidées pour le gène *Tie2* présentent un réseau vasculaire peu hiérarchisé et des anomalies du remodelage du plexus vasculaire méningé primitif. Les vaisseaux intracérébraux sont dilatés et n'émettent pas de collatérales [Lee HS, 2014].

I-5-2- Mise en place de la vascularisation intracérébrale

Dans la région céphalique, la vascularisation cérébrale débute au cours de la 3^{ème} semaine, au stade de plaque neurale. Les vaisseaux qui forment le plexus méningé primitif par vasculogénèse présents à la 4^{ème} semaine de gestation sont visualisés au-dessus du neuroepithelium. La vascularisation intracérébrale se développe à partir du plexus méningé primitif par angiogénèse, c'est à dire par formation d'un néo-vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant par bourgeonnement puis tunnelisation [Greenberg et Jin, 2005]. A noter que l'angiogénèse par mécanisme d'intussusception qui permet la formation de nouveaux

vaisseaux par subdivision d'un vaisseau préexistant par la formation de cloisons est pratiquement absente dans le SNC [Burri, 2004]. Le développement de la vascularisation du télencéphale débute en même temps que la corticogénèse, à partir de la 5^{ème} semaine de développement, après la fermeture du tube neural, et se poursuit bien au-delà de la naissance. La vascularisation se développe par vagues successives à partir du plexus vasculaire superficiel, pénètre dans le manteau cortical de façon radiaire et parallèle, croît activement pendant la phase de migration neuronale [Marin-Padilla et coll., 2011]. Ce système superficiel s'anastomose au système de la carotide interne qui se développe à partir du 3^{ème} arc aortique, au moment où le polygone de Willis est formé, soit à 12 SA. La connexion entre les deux systèmes de vascularisation se fait par l'intermédiaire d'un réseau capillaire, le plexus périventriculaire, qui proviendrait soit du plexus leptoméningé superficiel pour certains, soit des arcs pharyngés pour d'autres [Vasudevan et coll., 2008].

Pour Vasudevan et coll., l'angiogénèse progresserait selon un gradient ventro-dorsal régulé par des facteurs de transcription spécifiques de chaque région : Nkx2, Dlx1 et Dlx2 exprimés par les progéniteurs ventraux, et Pax6 exprimé par les progéniteurs du télencéphale dorsal.

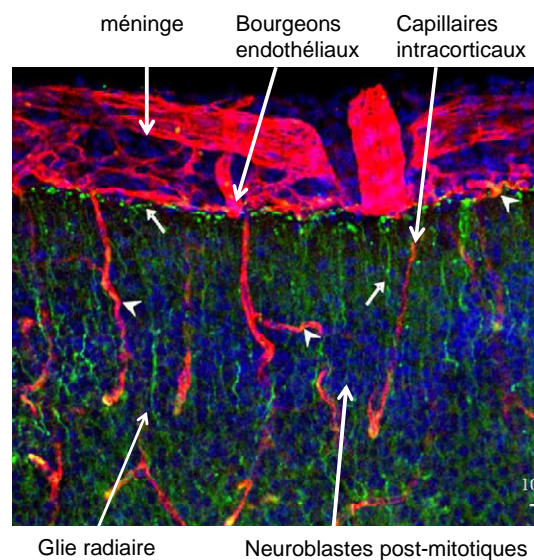


Figure 28 : Formation des perforantes intracorticales à partir du plexus méningé primitif révélée par immunomarquage CD31 [D'après Léger et coll., 2020a].

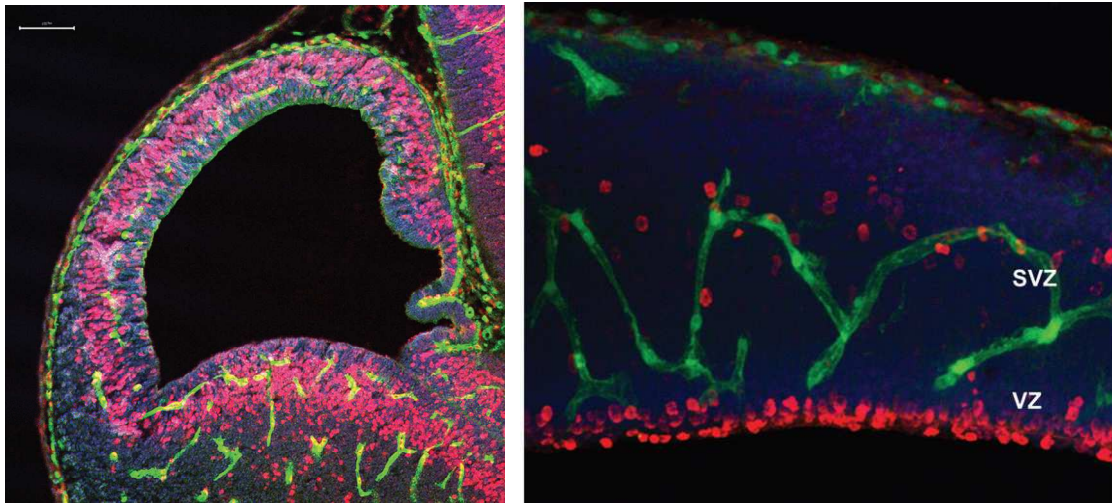


Figure 29 : Développement du réseau vasculaire périventriculaire. Mise en évidence par immunomarquage isolectine B4 [D'après Vasudevan et coll., 2008].

A partir du plexus méningé superficiel, six groupes de vaisseaux se forment et sont en place à 30 SA. Le groupe 1 vascularise les couches I et II du cortex, il est établi à 27 SA. Le groupe 6 est constitué par des vaisseaux qui traversent la plaque corticale et vascularisent la substance blanche, il est constitué à 15-16 SA. Concernant les groupes 2 à 5, les vaisseaux pénètrent dans le cortex, s'arrêtent à des niveaux variables, puis émettent des collatérales. Cette phase est appelée « phase de branching » d'où se formera le réseau capillaire intracortical définitif. Les premières collatérales se forment dans le cortex profond, en suivant le gradient inside- out de la migration neuronale. Le groupe 4 vascularise la couche VI, il est en place à 20 SA. Les groupes 2 et 3 se mettent en place entre 20 et 27SA et vascularisent les couches IV et V. Le réseau capillaire de la couche III se développe après la naissance pendant la phase intense de synaptogénèse et de myélinisation, entre le 3^{ème} mois post-natal et l'âge de 10 ans [Norman et O'Kusky, 1986].

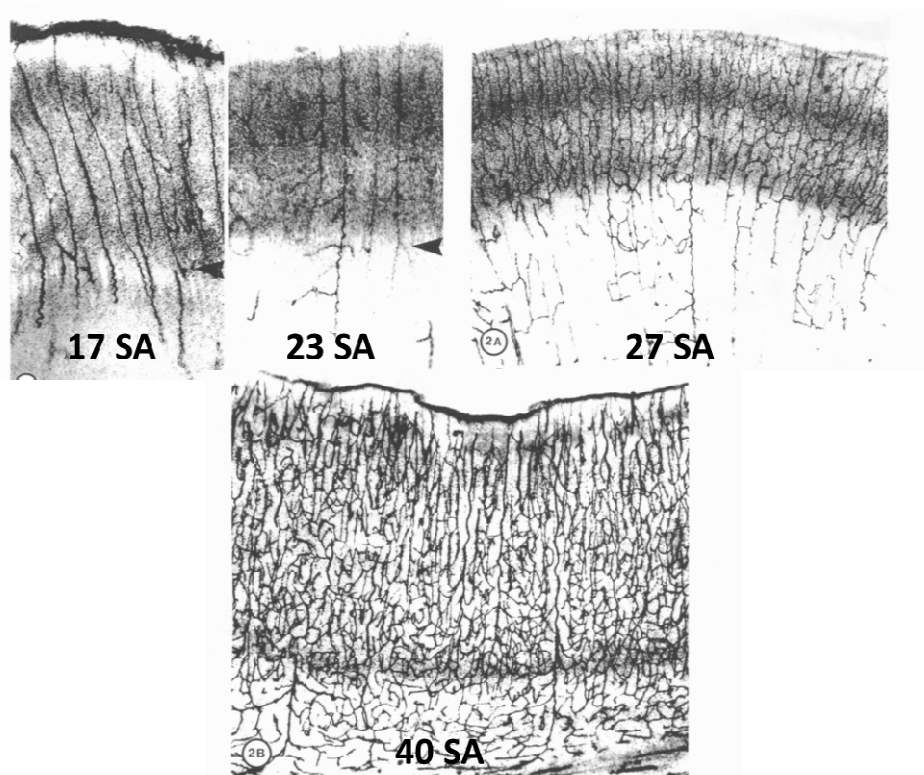


Figure 30 : Développement des perforantes intracorticales dans le cortex cérébral humain visualisé par technique d'inclusion en celloidine et coloration par la phosphatase alcaline [D'après Norman et O'Kusky, 1986].

I-5-3- Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus « multi-step » qui comporte schématiquement deux phases: une phase d'activation et une phase de résolution. Sous l'effet d'un stimulus angiogénique, les basales sont dégradées, les cellules endothéliales migrent et envahissent la MEC. Elles prolifèrent et se tunnellent ensuite. Lors de la phase de résolution, la prolifération des cellules endothéliales cesse de même que leur migration. La MEC se reconstitue, les complexes jonctionnels entre les cellules endothéliales se rétablissent, les péricytes affluent et s'organisent autour de l'endothélium. De nombreux facteurs de transcription coopèrent pour induire l'angiogénèse dont les 2 majeurs sont l'HIF1- α (Hypoxia-inducible factor 1) et la voie NF-kB. HIF1- α est une molécule clé dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygène. En conditions normoxiques, il est rapidement ubiquitiné et dégradé par le protéasome. En conditions hypoxiques, il existe une activation de la voie AKT et la voie MEKK. HIF1- α est transloqué au noyau et se lie à son partenaire HIF1- β . Ce

complexe se lie au promoteur de gènes impliqués dans la glycolyse et dans l'angiogénèse, notamment au promoteur du gène *VEGF*. La voie NF- κ B est également activée par la voie MEKK et AKT ainsi que par les variations de potentiel redox de la cellule. NF- κ B est transloqué au noyau, induisant l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la prolifération et la survie cellulaires ainsi que l'angiogénèse.

Au cours du développement, le VEGF est sécrété par le neuroectoderme sous une forme soluble et interagit avec les récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 exprimés par les cellules endothéliales cérébrales dans la zone ventriculaire et dans les cellules du manteau cortical, où il est et co-exprimé avec son récepteur de haute affinité mitogène VEGF-R2. L'endothélium des vaisseaux exprime fortement le VEGF mais cette expression n'est pas restreinte aux cellules endothéliales car il est également identifié dans les neurones, la glie radiaire et les cellules gliales radiaires. Des molécules impliquées dans la réception des signaux sont également exprimées : récepteurs au VEGF, Nrp1 et 2, TGF- β , β -caténine et Gpr 124 de même que des molécules de signalisation comme la voie Wnt et la voie des intégrines [Vallon et coll., 2014]. D'autres acteurs moléculaires ont été décrits comme jouant un rôle dans la formation du réseau vasculaire, tels les sémaphorines, les plexines ou les facteurs de guidage comme Slit, Nétrine et Nogo [Ruhrberg et Bautch, 2013 ; Wittko-Sneider et coll., 2014].

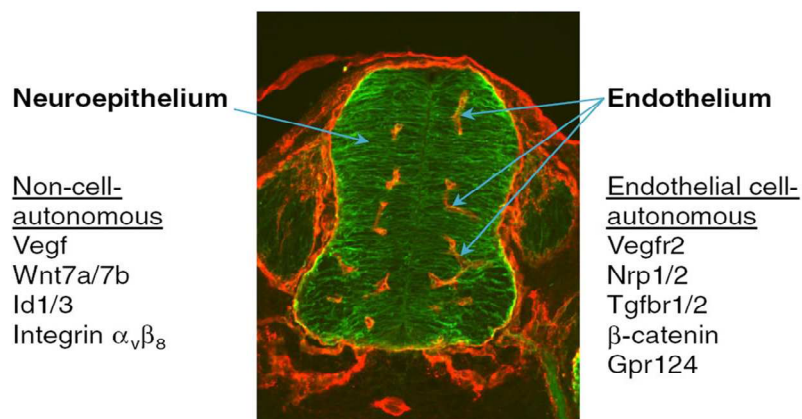


Figure 31 : Gènes endothéliaux « cell-autonomous et non-cell-autonomous » régulant l'angiogénèse cérébrale. Double immunofluorescence nestine/CD31 du tube neural à E10.5 permettant de visualiser les deux compartiments neuroépithélial et vasculaire [D'après Vallon et coll., 2014].

« Cell autonomous » signifie que le produit du gène est impliqué dans la réception des signaux et/ou la transduction des signaux mais ne participe pas aux interactions cellule-cellule ; « cell non autonomous » suggère que le produit du gène est une molécule de signalisation ou participe à la synthèse d'une molécule de signalisation.

Il est maintenant admis que certains précurseurs neuronaux et gliaux utilisent les vaisseaux sanguins comme support physique pour leur migration et partant, qu'un développement correct de la vascularisation cérébrale constitue le pré-requis nécessaire au positionnement adéquat des neurones et des oligodendrocytes. Plus tardivement, le réseau vasculaire régule également la croissance axonale et la mise en place du réseau neuronal, ces cellules contrôlant aussi la morphologie des vaisseaux sanguins [Saghatelyan, 2009 ; Won et coll., 2013 ; Dejana et Betscholz, 2016 ; Tsai et coll., 2016]. De nombreux facteurs angiogéniques agissent selon un mécanisme paracrine sur la fonction neuronale et réciproquement, des facteurs neurotrophiques peuvent moduler les fonctions endothéliales (voir Tableau 1). A titre d'exemple, le VEGF est un facteur proangiogénique qui favorise la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales. Il possède aussi des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs sur les cellules nerveuses par mécanisme paracrine et autocrine soit physiologiquement soit au cours de processus pathologiques variés [El Ghazi et coll., 2012]. Certains membres de la famille des sémaphorines, des nétrines et des éphrines qui sont impliqués dans les phénomènes de guidage axonal sont également impliqués dans le guidage vasculaire [Tam et Watts, 2010 ; Arese et coll., 2011].

	Facteurs	Effets sur le système vasculaire	Effets sur le système nerveux
Facteurs angiogéniques	VEGF	Survie, prolifération et migration des cellules endothéliales Induction de la croissance des vaisseaux sanguins	Stimulation des neurones et de la croissance axonale Neuroprotection
	IGF-1	Survie, prolifération et migration des cellules endothéliales	Promotion de la neurogenèse et synaptogenèse Croissance cérébrale et myélinisation
	bFGF	Survie, prolifération et migration des cellules endothéliales	Prolifération des progéniteurs corticaux et neurogenèse
	IL-8	Induction de l'angiogenèse Survie et différenciation des cellules endothéliales	Neuroprotection Favorise la survie neuronale
	Erythropoïétin	Stimulation de l'angiogenèse	Induction de progéniteurs neuronaux Neuroprotection paracrine au cours de l'ischémie Effet anti-apoptotique au cours du développement embryonnaire
	Angiopoïétin-1	Facteur de croissance endothéliale	Neuroprotection
Facteurs neurogéniques	NGF	Survie neuronale et différenciation	Induction de l'angiogenèse et de l'artériogenèse après ischémie Induction de facteurs vasoactifs et angiogénique
	BDNF	Survie neuronale et différenciation	Survie des cellules endothéliales et maintien de la stabilité vasculaire par une action directe sur l'angiogenèse
	Neuropilin	Guidance axonale	Migration et prolifération cellulaire par une action synergique avec le VEGF ₁₆₅ Développement vasculaire
	GDNF	Protection neuronale Développement neuronale	Régulation des jonctions serrées au cours de la formation de la BHE
	Artermin	Membre de la famille des GDNF	Guidance vasculaire

Tableau 1 : Effets des facteurs angiogéniques et neurogéniques sur les systèmes nerveux et vasculaire [D'après Park et coll., 2003].

I-5-4- Formation de la barrière hémato-encéphalique

Au cours de la phase de différenciation et de maturation des vaisseaux encéphaliques s'établit une structure particulière: la barrière hémato-encéphalique (Blood Brain Barrier, BBB). Sa mise en place s'effectue en 3 stades : phase d'angiogenèse, phase de différenciation et phase de maturation. Au cours de la phase d'angiogenèse, les bourgeons endothéliaux pénètrent la plaque corticale sous l'influence du VEGF qui se lie à son récepteur VEGFR2, de Tie-2 et d'Ang1. Au cours de la phase de différenciation, les cellules endothéliales s'enrichissent en Glut1, récepteur cérébral au glucose. Les jonctions serrées se forment, et les astrocytes et péricytes entrent en contact avec l'endothélium. Au cours de la phase de maturation, l'étanchéité de la BBB est maintenue non seulement par les astrocytes et péricytes mais aussi par les neurones [Liebner et coll., 2011]. Malgré la multiplicité des études, la période à laquelle la BBB devient fonctionnelle chez l'humain reste incertaine. Cependant, l'occludine et la claudine 5 sont exprimées dans le réseau capillaire de façon identique à l'adulte dès 14 SA, et des études post-mortem ont démontré qu'il existe déjà une barrière au passage de colorants dès 12 SA, suggérant que la BBB est au moins partiellement fonctionnelle dès le début de la période fœtale [Serlin et coll., 2015].

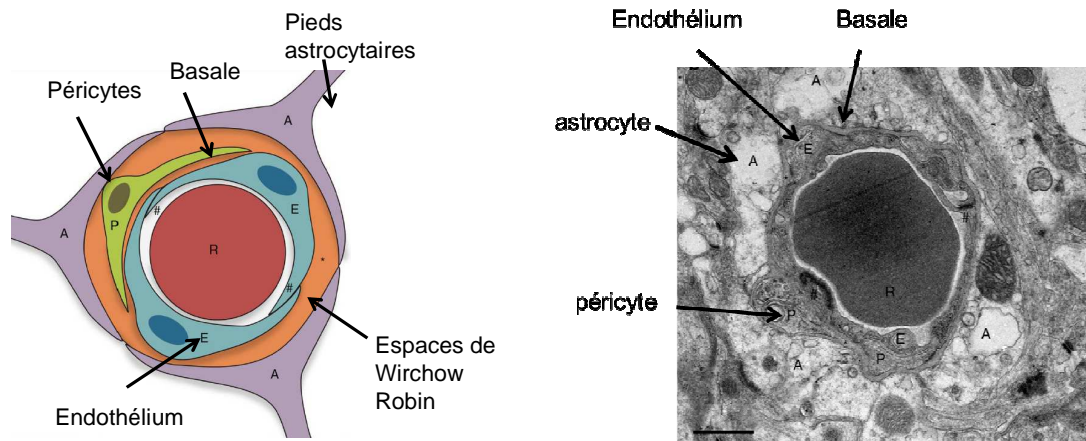


Figure 32 : Représentation de l'unité neuro-vasculaire mature schématisée à gauche et observée en microscopie électronique à droite. Les astrocytes et les péricytes interagissent pour enserrer les capillaires. Les péricytes sont connectés aux cellules endothéliales grâce aux jonctions *adherens* et *occludens* [d'après Vallon et coll., 2014].

II- Développement du système GABAergique à destinée corticale

Les interneurons GABAergiques naissent à partir de cellules progénitrices situées dans la VZ et la SVZ des zones germinatives du télencéphale basal, structures appelées aussi sous-pallium comprenant les éminences ganglionnaires médianes, latérales, caudales, l'aire préoptique et préoptico-hypothalamique. A partir de ces zones germinatives, les interneurons migrent par voie tangentielle puis radiaire pour atteindre leur destination finale. Ils acquièrent progressivement leur morphologie caractéristique, leurs propriétés moléculaires, biochimiques et synaptiques. Les données actuelles concernant le développement des interneurons ont été essentiellement établies à partir d'études effectuées chez les rongeurs et ont fait l'objet d'une revue récente par Lim et coll. [Lim et coll., 2018]. Néanmoins, un certain nombre de données a pu être aussi obtenue chez les primates non hominiens et chez l'humain.

II-1- Génération des interneurons GABAergiques

Chez la souris, le sous-pallium embryonnaire génère tous les neurones GABAergiques du télencéphale, qui sont soit des interneurons à destinée corticale, soit des neurones de projection essentiellement à destinée striatale, pallidale, amygdalienne et septale. Certains

progéniteurs donneront aussi naissance à des neurones de projection exprimant la somatostatine (STT) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) à destinée corticale [Jinno et coll., 2007; Melzer et coll., 2012 ; He et coll., 2016].

La spécification des interneurones GABAergiques à partir des GE est liée à l'expression d'un ensemble de gènes régulateurs codant pour les facteurs de transcription Dlx1 (Distal less homeobox gene), Dlx2, Ascl1 (Achaete-scute family bHLH transcription factor 1), Gsx1 et Gsx2 (Genetic-Screened Homeobox 1 et 2) [Long et coll., 2009; Wang et coll., 2013]. L'émergence de la diversité morphologique et fonctionnelle des interneurones est liée à la spécification spatiale et temporelle des cellules progénitrices grâce à des programmes de transcription spécifiques supplémentaires qui sont soit intrinsèquement codés, soit activés par des interactions avec le microenvironnement local, permettant de limiter le potentiel de ces cellules à ne générer que certaines classes de neurones GABAergiques.

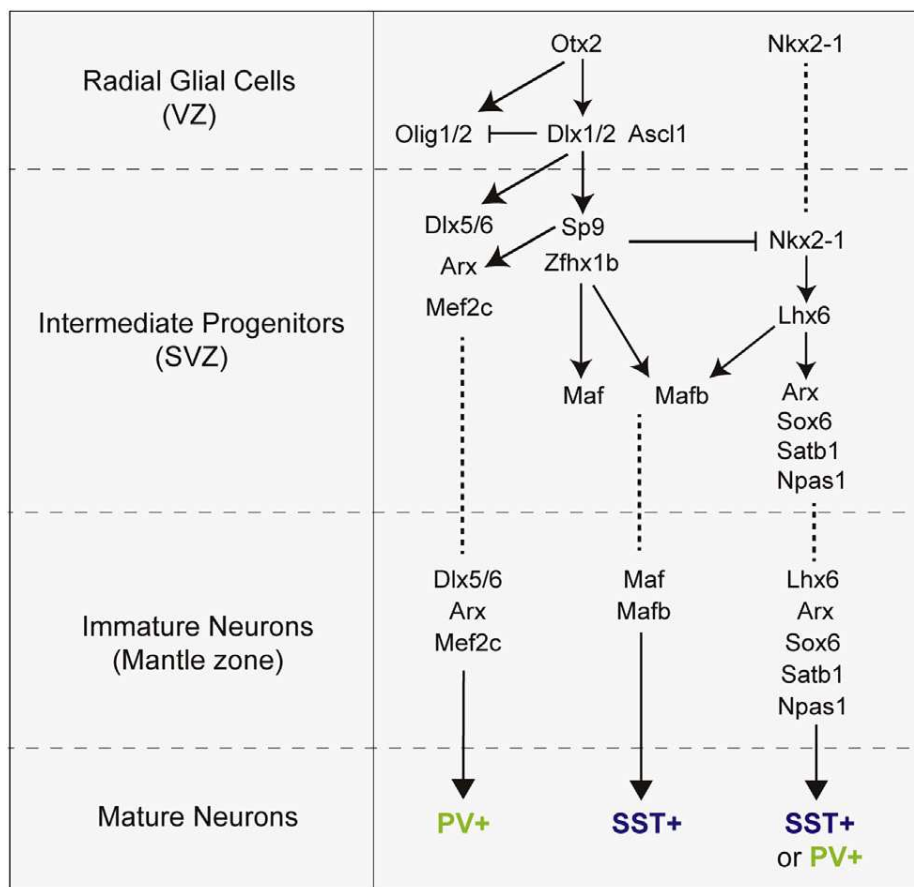


Figure 33 : Régulation transcriptionnelle du développement des interneurones à destinée corticale [d'après Lim et coll., 2018].

Les facteurs de transcription à homéodomaine Dlx constituent le premier réseau régulateur des gènes qui contrôlent le développement des interneurons GABAergiques. Dlx1 et Dlx2 sont initialement exprimés par les cellules progénitrices de la VZ dans lesquelles ils favorisent la spécification des lignées GABAergiques en réprimant Olig2, facteur de transcription requis pour la spécification des cellules oligodendrogiales [Petryniak et coll., 2007]. Dlx1 et Dlx2 orientent la différenciation des neurones post-mitotiques vers un destin GABAergique en induisant l'expression des gènes *Gad1* et *Gad2*, qui codent pour les enzymes qui convertissent le glutamate en GABA [Le et coll., 2017]. L'expression de Dlx1 et Dlx2 est également requise pour induire celle de Dlx5 et Dlx6, qui sont impliqués dans la migration et la différenciation des interneurons corticaux [Wang et coll., 2010 ; Pla et coll., 2018]. Au cours du développement précoce, Dlx1 et Dlx2 favorisent la migration en limitant la croissance neuritique par répression de PAK3 (p21-activated kinase 3), un effecteur situé en aval de la voie Rho-GTPases et en induisant l'expression de facteurs de transcription, notamment Arx (Aristaless Related Homeobox), essentiels pour la migration tangentielle et le développement du réseau axono-dendritique des interneurons corticaux [Cobos et coll., 2007 ; Colasante et coll., 2008 ; Pla et coll., 2018]. En l'absence de ces facteurs, les interneurons ne peuvent intégrer les circuits neuronaux naissants et beaucoup d'entre eux subissent une mort cellulaire programmée après la naissance, période à laquelle Dlx1 et Dlx2 sont exprimés différemment dans les interneurons dérivés des MGE. Les interneurons générés précocement exprimant à la fois Dlx1 et Dlx2 sont des interneurons parvalbuminergiques (PV+), alors que les interneurons PV+ générés après la naissance ne maintiennent que l'expression de Dlx2. En revanche, la génération d'interneurons SST+ repose principalement sur l'expression de Dlx1. La perte de Dlx1 ne perturbe donc que la survie des interneurons SST+ alors que la perte de Dlx1 et de Dlx2 est responsable d'une augmentation de la mort cellulaire des interneurons SST+ et PV+ [Cobos et coll., 2005 ; Pla et coll., 2018]. Le second réseau de régulation des gènes est activé par Nkx2-1 (NK2 Homeobox 1), facteur de transcription essentiel pour la spécification des interneurons SST+ et PV+ dans la MGE. Il induit l'expression de Lhx6 (LIM Homeobox 6), facteur de transcription important pour la maturation des neurones corticaux GABAergiques dérivés des MGE [Sussel et coll., 1999 ; Liodis et coll., 2007; Vogt et coll., 2014 ; Sandberg et coll., 2016]. La liaison de Nkx2-1 à Lhx6 favorise l'activation des gènes nécessaires à la migration des interneurons. Une régulation négative de Nkx2-1 est par la suite requise pour permettre la migration des interneurons dérivés des MGE vers le cortex [Nobrega-Pereira et coll., 2008]. Nkx2-1 est directement réprimé par Zfhx1b et Sp9, deux facteurs de transcription dont l'expression est

induite par Dlx1 et Dlx2 et maintenue dans les interneurons corticaux en migration [Long et coll., 2009; McKinsey et coll., 2013 ; Liu et coll., 2019]. Lhx6 et Sp9 favorisent l'expression de plusieurs gènes qui sont ensuite nécessaires à la migration et à la maturation des interneurons corticaux, notamment Arx, Cxcr7, Maf (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog), Mafb, Satb1 (Special AT-rich sequence-binding protein-1), Sox6 et St18 (Suppression of tumorigenicity 18) [Lim et coll., 2018].

II-2- Spécification spatiale des interneurons à destinée corticale

Le sous-pallium est divisé en plusieurs domaines, chacun étant caractérisé par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. Les interneurons sont produits majoritairement à partir des LGE, MGE et CGE, et à un moindre degré à partir de l'aire préoptique (POA) et l'aire préoptico-hypothalamique (POH) ainsi que l'aire septale. L'identité régionale de la MGE et de la POA est spécifiée par Nkx2-1. Les LGE et CGE ont en commun l'expression de plusieurs facteurs de transcription, l'expression de Nr2f2 (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2) étant restreinte à la CGE. La MGE et la POA donnent naissance à presque tous les interneurons parvalbuminergiques et somatostatinerigiques alors que la CGE produit tous les interneurons corticaux VIPergiques (VIP+) et cholecystokininerigiques (CCK+). Les cellules de morphologie neurogliale et les interneurons sécrétant le neuropeptide Y (NPY+) sont issus de la POA. La MGE est à l'origine de plusieurs types d'interneurons : les cellules somatostatinerigiques de Martinotti et non-Martinotti, les interneurons à projection longue, les cellules en panier, les cellules en chandelier et les neurones translaminaires, comme indiqué sur le schéma suivant:

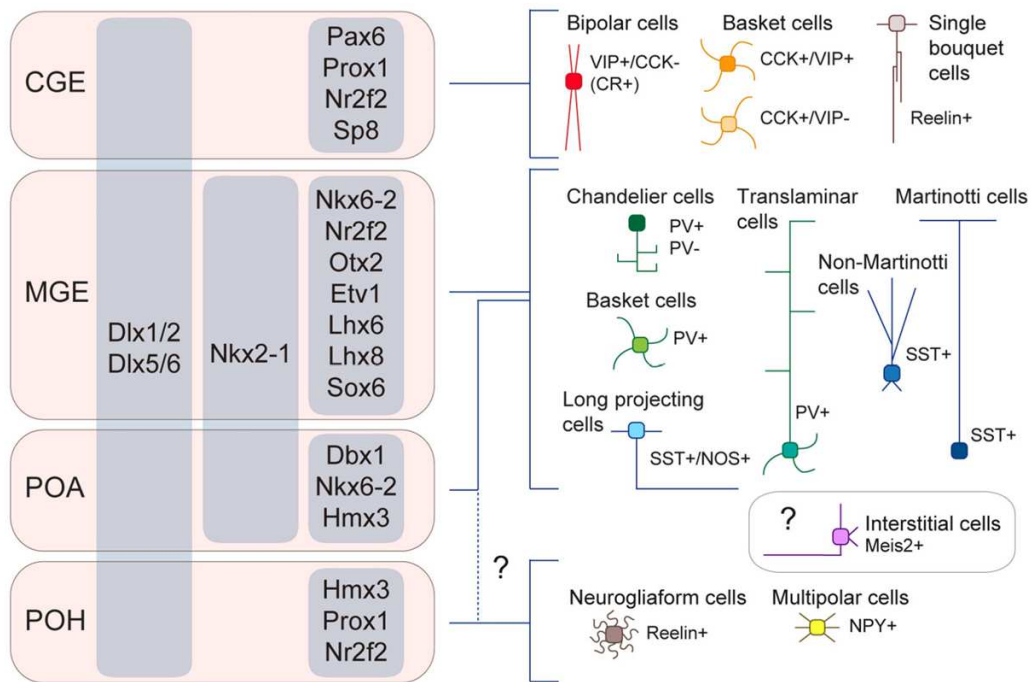


Figure 34 : Sources de production, voies de signalisation et diversité phénotypique des interneurones intracorticaux [D’après Lim et coll., 2018].

En vert foncé : cellules en chandelier PV+; en vert olive : cellules en panier PV+; en vert émeraude : cellules translaminaires PV+; en bleu clair : cellules non-Martinotti SST+; en bleu ciel : neurones de projection longue SST+/NOS+; en bleu foncé : cellules de Martinotti SST+; en rouge : cellules bipolaires Htr3a+/CR+; en orange foncé : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP+; en orange clair : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP- ; en brun : cellules de morphologie neurogliale Htr3a+/Reeline+; en brun clair : cellules en simple bouquet Htr3a+/Reeline+ ; en jaune : cellules multipolaires Htr3a+/NPY+; en violet : cellules interstitielles Htr3a+/Meis2+ [D’après Lim et coll., 2018].

Par ailleurs, chaque domaine de production peut être subdivisé en plusieurs sous-domaines. A titre d’exemple, on distingue cinq sous-domaines au sein de la MGE formant la MGE dorsale, médiale et ventro-caudale. La MGE dorsale est le site de production privilégié des interneurones somatostatinergergiques, alors que les interneurones parvalbuminergergiques sont essentiellement générés dans le domaine ventro-caudal comme illustré ci-dessous :

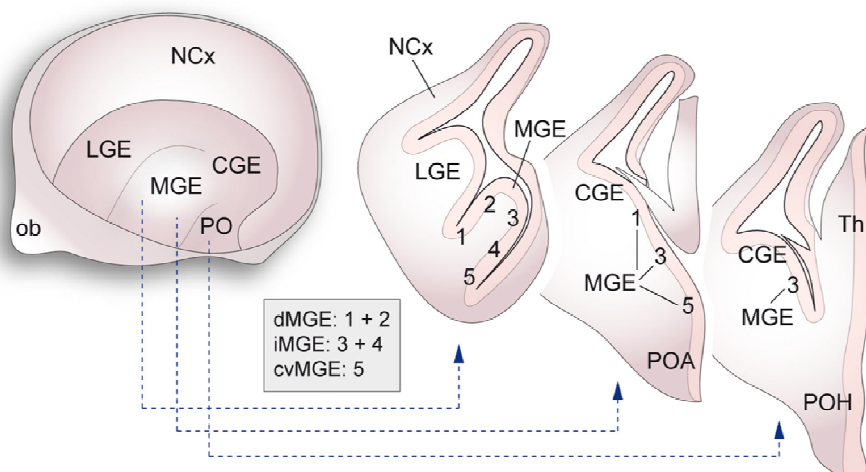


Figure 35 : Organisation régionale du sous-pallium embryonnaire chez la souris [D'après Flames, 2007].

II-3- Spécification temporelle des cellules progénitrices interneuronales

Chaque domaine de la MGE génère plusieurs types d'interneurons corticaux et cela n'est pas uniquement dû à l'existence d'un pool hétérogène de cellules progénitrices dans chaque domaine car une cellule progénitrice donnée peut générer des interneurons SST+ ou PV+, et des pools apparemment homogènes de cellules progénitrices pourraient générer différents types d'interneurons et ce, à différents stades du développement [Brown et coll., 2011; Ciceri et coll., 2013; Harwell et coll., 2015; Mayer et coll., 2015]. Par exemple, les cellules progénitrices Nkx6-2+ situées dans la POA produisent plusieurs types de neurones SST+ ainsi que certaines cellules PV+ en corbeille et en chandelier, et les cellules progénitrices Etv1+ dans la MGE produisent plusieurs types d'interneurons des classes SST+ et PV+ [He et coll., 2016].

Les progéniteurs de la MGE génèreraient la plupart des interneurons SST+ pendant la première moitié de la neurogénèse, tandis que les interneurons PV+ sont produits à un taux presque constant tout au long de la neurogénèse [Inan et coll., 2012; Miyoshi et coll., 2007]. Les interneurons dérivés des MGE adoptent leur distribution laminaire dans la plaque corticale selon un gradient «inside-out» similairement aux cellules pyramidales, les interneurons SST+ étant plus abondants dans les couches profondes dites infragranulaires que dans les couches superficielles ou supragranulaires [Fairen et coll., 1986]. En revanche, les cellules PV+ en corbeille qui constituent la majorité des interneurons PV+ sont observées

dans toutes les couches à l'exception de la couche 1 et les cellules en chandelier se distribuent dans les couches II à VI bien qu'elles soient générées tardivement au cours de la neurogénèse, indiquant que la répartition laminaire des interneurons corticaux ne dépend probablement pas que du moment où elles sont générées [Inan et coll., 2012; Taniguchi et coll., 2013].

Toutes les cellules progénitrices des MGE ne produisent pas de façon simultanée des interneurons corticaux : les cellules progénitrices de la VZ dans la MGE dorsale produisent des interneurons supragranulaires dès E13.5, tandis qu'au même stade les cellules progénitrices de la MGE intermédiaire produisent des interneurons à destinée corticale infragranulaire [He et coll., 2016]. Des études par marquage génétique des cellules progénitrices de la VZ aux premiers stades de la neurogénèse ont permis d'identifier une génération simultanée d'interneurons infra- ou supragranulaires mais majoritairement à destinée infra-granulaire, suggérant que les progéniteurs pourraient s'épuiser après avoir généré un certain nombre d'interneurons dont la répartition laminaire dépendrait du moment de leur naissance [Ciceri et coll., 2013].

II-4- Migration des interneurons et intégration dans les circuits corticaux

II-4-1- Migration tangentielle et dispersion des interneurons

Tous les interneurons utilisent les mêmes mécanismes cellulaires pour migrer vers le cortex. Quelle que soit leur identité transcriptionnelle, ils évitent le striatum et les autres régions du télencéphale basal en se dirigeant vers le cortex. Les interneurons issus des MGE expriment des récepteurs aux facteurs chémorépulseurs tels que Sema3A et Sema3F qui sont très abondants dans le striatum [Marin et coll., 2001]. L'expression de ces récepteurs Nrp1 et Nrp2 est réprimée par Nkx2-1 si bien que l'expression ou l'inhibition de l'expression de Nkx2-1 par les interneurons issus des MGE oriente leur migration vers le striatum ou vers le cortex cérébral respectivement [Nobrega-Pereira et coll., 2008].

Les interneurons migrent selon un gradient de permissivité croissant généré par des signaux chémoattractifs produits dans les LGE dont la neuréguline1 (Nrg1) [Marin et coll., 2003; Wichterle et coll., 2003 ; Mei et Nave, 2014]. La fonction de Nrg1 est médiée par le récepteur tyrosine kinase ErbB4, principal récepteur exprimé par les interneurons [Flames et coll., 2004; Yau et coll., 2003]. Alors que l'expression d'ErbB4 se limite à des types spécifiques d'interneurons dans le cortex adulte, il est exprimé par la majorité des

interneurones corticaux au cours de la période périnatale [Vullhorst et coll., 2009 ; Fazzari et coll., 2010; Neddens et Buonanno, 2010; Bean et coll., 2014].

Les interneurones se dispersent dans la plaque corticale grâce à deux grands flux migratoires, l'un superficiel traversant la zone marginale (MZ) et l'autre profond cheminant dans SVZ des GE [Lavdas et coll., 1999; Wichterle et coll., 2001]. Un troisième flux est représenté par des interneurones migrant au travers de la sous-plaque. L'utilisation exclusive des ces trois courants migratoires nécessite l'expression de la chémokine Cxcl12 par les cellules situées dans chacune des trois voies [Tiveron et coll., 2006 ; Stumm et coll., 2007; Li et coll., 2008; Lopez-Bendito et coll., 2008; Sanchez-Alcaniz et coll., 2011; Wang et coll., 2011]. Les interneurones pénètrent diffusément la plaque corticale, l'hippocampe et le cortex piriforme [Marin et Rubenstein, 2001]. Ils ne semblent pas se répartir de manière aléatoire entre les flux de la MZ et la SVZ, le profil transcriptionnel des interneurones migrant au travers de la MZ et la SVZ étant différent [Antypa et coll., 2011]. Les interneurones de morphologie neurogliale générés dans la POA atteignent préférentiellement le cortex en empruntant la MZ [Niquille et coll., 2018 ; Zimmer et coll., 2011]. Les interneurones de Martinotti SST⁺ et translaminaires PV⁺ migrent préférentiellement au travers de la MZ, contrairement aux cellules non-Martinotti qui migrent en empruntant la SVZ. La migration des cellules de Martinotti dépendrait d'un programme développemental plus complexe contrôlant aussi le développement de leur arborisations axonales dans la couche I, suggérant que le développement des axones dans la couche I est lié à leur interaction avec les composants de la MZ c'est-à-dire avec le microenvironnement cortical [Lim et coll., 2018].

II-4-2- Organisation laminaire intracorticale et intégration dans les circuits transitoires

L'adoption du mode de migration radiaire est probablement liée à une perte de réceptivité à Cxcl12 ainsi qu'à l'expression de la neuréguline Nrg3 par les cellules pyramidales, ce qui permettrait la dispersion des interneurones corticaux et leur positionnement laminaire qui survient à des stades ultérieurs. Les interneurones adoptent un mode de répartition laminaire après que les cellules pyramidales ont commencé à se différencier [Hevner et coll., 2004; Pla et coll., 2006 ; Li et coll., 2008 ; Miyoshi et Fishell, 2011; Bartolini et coll., 2017]. Les interneurones interagissent spécifiquement avec certaines cellules pyramidales lors de l'acquisition de leur position au sein d'une couche donnée et cette interaction précéderait la formation de connexions spécifiques entre neurones excitateurs et

inhibiteurs [Lodato et coll., 2011 ; Ye et coll., 2015]. La fin de la migration des interneurones corticaux est marquée par la surexpression de l'échangeur potassium-chlore KCC2 dans les interneurones qui réduit la fréquence des influx transitoires de calcium induits par le GABA, mécanisme qui pourrait être commun à toutes les classes d'interneurones [Bortone et Polleux, 2009 ; Inamura et coll., 2012].

L'intégration des interneurones dans les microcircuits corticaux contribue à la maturation de l'organisation en colonnes du futur cortex. Alors que le mode de connectivité de certains types d'interneurones reste relativement constant dans le cerveau juvénile et mature, d'autres modes de connectivité sont requis au cours du développement postnatal précoce pour former des microcircuits transitoires qui modulent l'émergence de la topographie fonctionnelle. A titre d'exemple, la couche IV qui reçoit la grande majorité des fibres thalamocorticales joue un rôle majeur dans le traitement initial des informations sensorielles [Douglas et Martin, 2004]. L'inhibition rétroactive par les cellules PV+ en panier dès qu'elles commencent à recevoir des afférences directes des neurones thalamiques est essentielle dans le traitement initial des informations car cette inhibition rétroactive permet de délimiter plus finement les champs de réception et de réguler l'intégration temporelle des informations sensorielles [Gabernet et coll., 2005; Wehr et Zador, 2003; Chittajallu et Isaac, 2010]. De façon intéressante, les interneurones SST+ de la couche V reçoivent des afférences thalamiques transitoires pendant la première semaine de développement postnatal chez le rongeur, suggérant que ces interneurones contrôlent transitoirement l'activité sensorielle [Marques-Smith et coll., 2016]. Les connexions transitoires établies par les interneurones SST+ sont également nécessaires à la maturation des cellules PV+ en panier dans les couches profondes ce qui fait de ces interneurones une population essentielle dans la maturation des circuits intracorticaux [Tuncdemir et coll., 2016].

II-5- Régulation du nombre d'interneurones corticaux

Tous les neurones y compris les interneurones GABAergiques sont générés en excès au cours du développement. Chez la souris, plus de 30% des interneurones générés dans le sous-pallium sont éliminés par apoptose entre la fin de la première et de la deuxième semaine postnatale, et concerne tous les types d'interneurones. *In vivo*, la mort des interneurones survient progressivement lorsqu'ils atteignent un certain stade de maturation, au moment de leur intégration dans les circuits corticaux naissants. Les interneurones ayant des niveaux d'activité relativement faibles ont une probabilité accrue de subir une apoptose [Wong et coll.,

2018]. Il a d'ailleurs été montré qu'une augmentation de l'excitabilité des interneurons exprimant des récepteurs dépolarisants activés par le canal sodique voltage-dépendant bactérien NaChBac améliore de manière indépendante la survie des interneurons alors que la diminution de l'excitabilité des interneurons par surexpression du canal potassique kir2.1 diminue leur survie [Priya et coll., 2018].

La maturation morphologique des interneurons dépend de leur intégration fonctionnelle dans les circuits en développement. Une réduction expérimentale de l'excitabilité des interneurons est responsable d'une réduction sévère de leurs arborisations dendritiques et axonales indiquant que les interneurons ont besoin d'être stimulés par des courants excitateurs pour devenir matures et s'intégrer dans des circuits fonctionnels [De Marco Garcia et coll., 2011]. Certains facteurs de transcription comme Dlx1 joueraient un rôle dans la maturation, et les cellules pyramidales un rôle essentiel dans la survie des interneurons corticaux [Anastasiades et coll., 2016]. La suppression par manipulation génétique des molécules proapoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bax (BCL2-associated X protein) et Bak (BCL2-antagonist/killer 1) dans les cellules pyramidales permet d'abolir la mort cellulaire programmée des interneurons corticaux [Wong et coll., 2018]. La maturation fonctionnelle de certains types d'interneurons corticaux telles que les cellules de morphologie neurogliale semble dépendre des afférences excitatrices provenant du thalamus, suggérant que des connexions afférentes autres qu'aux cellules pyramidales locales influencent la survie des interneurons corticaux pendant la période d'apoptose physiologique [De Marco Garcia et coll., 2015].

Les mécanismes moléculaires régulant la mort cellulaire programmée des interneurons corticaux commencent seulement à être élucidés. Un facteur qui semble médier le programme intrinsèque de mort cellulaire dans les interneurons corticaux est PTEN, antagoniste de la sérine-thréonine kinase AKT, un médiateur essentiel de la survie neuronale [Dudek et coll., 1997 ; Stambolic et coll., 1998]. Pendant la période d'apoptose physiologique, les niveaux de PTEN augmentent dans les interneurons corticaux de manière transitoire, d'abord dans les interneurons des couches infragranulaires puis dans les interneurons des couches superficielles selon un schéma temporel qui coïncide avec le développement normal des interneurons [Wong et coll., 2018].

II-6- Diversité phénotypique des interneurons corticaux matures

Plus de 20 types différents de neurones inhibiteurs ont été décrits dans le néocortex et l'hippocampe murins [Tremblay et coll., 2016]. Les interneurons corticaux sont divisés en plusieurs classes et sous-classes en fonction de leur morphologie, de leurs similitudes transcriptionnelles éventuelles et de l'expression de marqueurs sélectifs. Chaque classe d'interneurones possède une morphologie semblable, établit des connexions stéréotypées et exprime une combinaison spécifique de canaux ioniques qui leur confère des propriétés électrophysiologiques particulières grâce à l'existence de programmes transcriptionnels dédiés [Ascoli et coll., 2008]. Ces différents classes et sous classes sont schématiquement représentées sur la figure suivante :

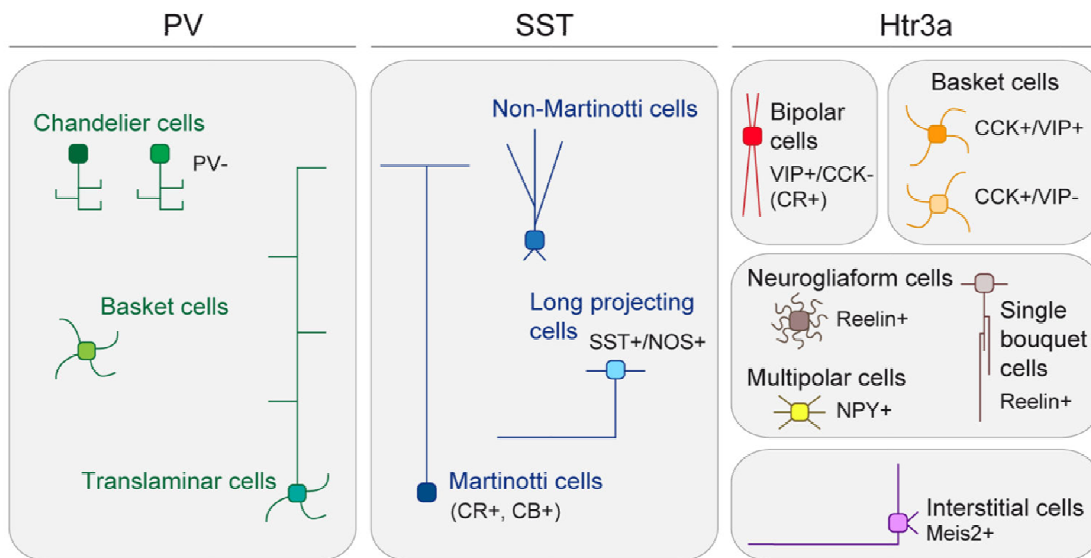


Figure 36 : Organisation des trois grandes classes d'interneurones basée sur l'expression de PV, SST et le récepteur de la sérotonine 3A (Htr3a) [d'après Lim et coll., 2018].

En vert foncé : cellules en chandelier PV+; en vert olive : cellules en panier PV+; en vert émeraude : cellules translaminaires PV+; en bleu clair : cellules non-Martinotti SST+; en bleu ciel : neurones de projection longue SST+/NOS+; en bleu foncé : cellules de Martinotti SST+; en rouge : cellules bipolaires Htr3a+/CR+; en orange foncé : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP+; en orange clair : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP-; en brun : cellules de morphologie neurogliale Htr3a+/Reelin+; en brun clair : cellules en simple bouquet Htr3a+/Reelin+; en jaune : cellules multipolaires Htr3a+/NPY+; en violet : cellules interstitielles Htr3a+/Meis2+.

II-6-1- Les interneurones parvalbuminergiques

La majorité des interneurones corticaux est caractérisée par l'expression d'une protéine liant le calcium : la parvalbumine, et l'on distingue trois sous-classes sur le plan morphologique qui émettent des pointes-ondes rapides : les cellules en chandelier, les cellules en corbeille et les interneurones translaminaires. Les cellules en chandelier ou axo-axoniques ont une morphologie très stéréotypée en raison de la forme caractéristique de leur arborescence axonale ressemblant à un luminaire. Elles font synapse sur le segment initial de l'axone des cellules pyramidales et sont localisées à la limite des couches I et II ainsi que dans la couche VI [Somogyi et coll., 1982 ; Taniguchi et coll., 2013]. En revanche, leur répartition régionale est très hétérogène. Les cellules en corbeille sont les plus abondantes dans le néocortex et sont caractérisées par leurs axones tortueux formant synapse avec le soma et les dendrites proximaux d'autres interneurones et des cellules pyramidales [Hu et coll., 2014]. Elles sont réparties au travers des couches II à VI et ce, dans toutes les régions corticales. Les interneurones translaminaires à décharge de pointes-ondes rapides sont rares et sont identifiés dans les couches V et VI. Leurs axones traversent l'épaisseur du cortex et font synapse avec les cellules pyramidales [Buchanan et coll., 2012 ; Bortone et coll., 2014].

II-6-2- Les interneurones somatostatinerigiques

Ils sont caractérisés par l'expression du neuropeptide somatostatine (SST+), leur ciblage dendritique préférentiel et comportent les cellules de Martinotti et les cellules non-Martinotti. Les cellules de Martinotti ont un axone ascendant qui forme une arborisation dense dans la couche I [Wang et coll., 2004; Xu et coll., 2006; Hilscher et coll., 2017]. Elles sont particulièrement abondantes dans la couche V mais elles sont également présentes dans les couches II et III et sont le plus souvent inhibitrices [Silberberg et Markram, 2007 ; Jiang et coll., 2015; Nigro et coll., 2018]. Les cellules non-Martinotti sont réparties dans les couches II à VI et leurs axones atteignent la couche I. Elles présentent un potentiel de membrane au repos plus bas que les cellules de Martinotti et émettent des décharges électriques à une fréquence plus élevée que les cellules de Martinotti mais plus faible que les cellules en corbeille et font synapse avec ces dernières [Xu et coll., 2013; Nigro et coll., 2018]. Le néocortex contient aussi des neurones GABAergiques à projection longue exprimant la STT. Ces cellules sont abondantes dans les couches profondes et projettent dans d'autres régions néocorticales. Elles co-expriment fréquemment l'oxyde nitrique synthase (NOS), la

chondrolectine et le NPY et sont actives pendant le sommeil [Dittrich et coll., 2012 ; He et coll., 2016].

II-6-3- Les interneurons exprimant la sous-unité 3a du récepteur à la sérotonine (HTr3aR)

Parmi ces interneurons, ceux qui expriment le VIP sont les plus abondants. Ils sont principalement désinhibiteurs car ils ciblent préférentiellement les interneurons SST+ et PV+ [Jiang et coll. 2015]. Les interneurons bipolaires VIP+ sont situées principalement dans les couches II et III, possèdent des axones orientés verticalement et sont caractérisés par des décharges continues [Pronneke et coll., 2015]. Elles co-expriment une protéine de liaison au calcium, la Calrétinine (CR). Les cellules multipolaires VIP+ sont transcriptionnellement très différentes des interneurons bipolaires. Elles ont une morphologie de cellules en corbeille et co-expriment le neuropeptide cholécystokinine (CCK), et sur le plan transcriptionnel sont similaires à d'autres cellules en corbeille CCK+ qui sont VIP-. Les cellules en corbeille CCK+/ VIP+ ont un petit soma et sont particulièrement abondantes dans les couches supragranulaires, tandis que les cellules en corbeille CCK+/VIP- sont préférentiellement situées dans les couches V et VI [He et coll., 2016; Tasic et coll., 2017]. Ces deux types d'interneurons CCK+ expriment le 5HT3aR [Rudy et coll., 2011]. Les cellules CCK+ en corbeille font synapse sur le soma des cellules pyramidales et sur celui d'autres interneurons et présentent des décharges régulières ou en bouffées (« burst ») [Kawaguchi et Kubota, 1998]. Les cellules de morphologie neurogliale sont les plus abondantes dans la couche 1. Elles ont une arborisation axonale très dense et caractéristique et émettent des pointes-ondes lentes. Elles expriment le 5HT3aR et co-expriment très souvent la reeline et le NPY [Lee et coll., 2010]. Les cellules en bouquet unique expriment 5HT3aR et la reeline et sont également abondantes dans la couche 1. Leurs arborisations axonales s'étendent jusqu'aux couches profondes du cortex [Jiang et coll., 2015]. Deux autres variétés d'interneurons expriment le 5HT3aR : les interneurons multipolaires NPY+ qui émettent des pointes-ondes irrégulières, particulièrement abondants à l'interface des couches I et II, et les interneurons interstitiels Meis2+ situés dans la substance blanche dont les axones projettent sur les couches profondes du cortex et le striatum [Gelman et coll., 2009; Miyoshi et coll., 2010 ; Von Engelhardt et coll., 2011; Frazer et coll., 2017].

La répartition définitive des interneurones dans le cortex mature est représentée sur le schéma suivant :

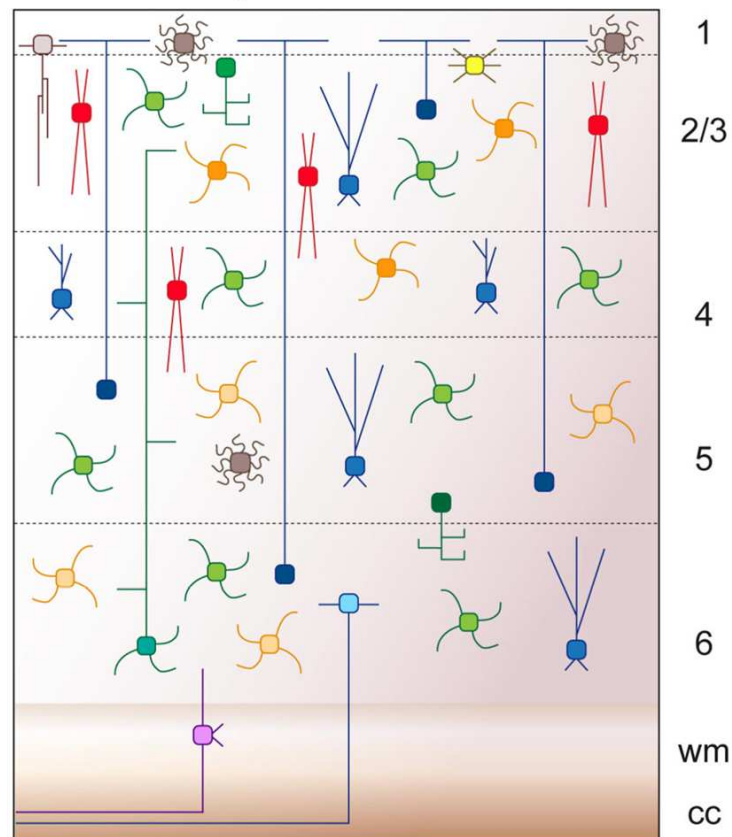


Figure 37 : Localisation définitive des interneurones dans les différentes couches du cortex :

En vert foncé : cellules en chandelier PV+; en vert olive : cellules en panier PV+; en vert émeraude : cellules translaminaires PV+; en bleu clair : cellules non-Martinotti STT+; en bleu ciel : neurones de projection longue STT+/NOS+; en bleu foncé : cellules de Martinotti STT+; en rouge : cellules bipolaires Htr3a+/CR+; en orange foncé : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP+; en orange clair : cellules en panier Htr3a+/CCK+/VIP- ; en brun : cellules de morphologie neurogliale Htr3a+/Reeline+; en brun clair : cellules en simple bouquet Htr3a+/Reeline+ ; en jaune : cellules multipolaires Htr3a+/NPY+; en violet : cellules interstitielles Htr3a+/Meis2+ [d'après Lim et coll., 2018].

II-7- Données disponibles chez l'humain

Les modes de génération, de migration et d'organisation intracorticale des interneurones sont globalement similaires chez l'humain, mais il existe des différences

importantes en ce qui concerne l'expression des gènes, la morphologie des cellules, la distribution laminaire, le nombre et les proportions de certains types d'interneurones [DeFelipe, 1997; Boldog et coll., 2018; Hodge et coll., 2018].

II-7-1- Lieux de production des interneurones

Dans le cortex cérébral humain, les interneurones constituent jusqu'à 35% du nombre de neurones selon les régions [Jones, 2009]. Leur origine a été un sujet longuement débattu, de même que la période à laquelle s'achève leur génération. Au cours des deux dernières décennies plusieurs auteurs ont proposé que les interneurones corticaux, à la différence des rongeurs, naissent non seulement à partir du télencéphale ventral, mais aussi de la SVZ du télencéphale dorsal [Letinic et coll., 2002 ; Rakic et Zecevic, 2003 ; Petanjek et coll., 2009, Jakovcevski et coll., 2011]. Depuis une dizaine d'années cependant, il a été démontré que similairement aux rongeurs, la grande majorité des interneurones corticaux naissent dans les GE. D'après Radonjic et coll., moins de 5% des cellules dans la VZ et 6 à 9% des cellules dans la SVZ du télencéphale dorsal expriment Nkx2.1 au cours de la période foetale précoce, et entre 14 et 22 semaines la moitié d'entre elles expriment le Ki67 [Radonjic et coll., 2014]. Une expression importante des gènes Dlx a été identifiée dans la VZ/SVZ à partir de 8 semaines renforce la notion que cette zone germinative est une source potentielle de production d'interneurones [Al-Jaberi et coll., 2015]. Comme chez les rongeurs, environ 30% des interneurones proviennent des CGE, mais la génération dans cette zone persiste tardivement chez l'humain.

La compartimentalisation des progéniteurs dans les GE est un phénomène précoce survenant dès 10 semaines : les progéniteurs s'organisent en clusters dans l'oSVZ des MGE, puis se dispersent dans les LGE où elles mûrissent en adoptant une morphologie bipolaire et dans la VZ/SVZ du futur cortex. L'expression de la doublecortine (DCX) dans les interneurones GABAergiques est identifiée dans les LGE, la SVZ du télencéphale dorsal, dans la zone intermédiaire et dans la sous-plaque, mais reste extrêmement faible dans les MGE. En revanche, les marqueurs de progéniteurs SOX2, DLX2 et NKX2.1 sont plus fortement exprimés dans les MGE comparativement aux LGE et à la SVZ du télencéphale dorsal [Arshad et coll., 2016].

Une étude récente réalisée au cours de la période embryon-foetale précoce portant sur l'expression d'ASCL1, facteur de transcription proneural et de DLX2, molécule clé contrôlant la différenciation des progéniteurs interneuronaux et leur migration au cours de la

première moitié de la grossesse a permis de démontrer par technique de RNAseq qu' ASCL1 était très fortement exprimé entre 7 et 17 semaines post-conceptionnelles, associée à une expression croissante de DLX2. L'étude immunohistochimique complémentaire a révélé la présence de progéniteurs ASCL1/DLX2+ dans la SVZ des éminences ganglionnaires, population qui exprime par ailleurs PAX6 et TBR2, ainsi que quelques progéniteurs ASCL1/PAX6+ dans la VZ. Il a été également identifié des cellules ASCL1 et GAD67+, correspondant à des progéniteurs intermédiaires situés dans l'iSVZ. Une densité croissante de cellules DLX2+ a été retrouvée entre 8 et 12 semaines dans le manteau cortical, une majorité d'entre elles co-exprimant LHX6, indiquant que ces cellules sont issues des MGE et de la région septale, voie importante de migration médiane à partir des MGE, contrairement aux rongeurs chez lesquels cette voie reste minoritaire. Quelques cellules expriment COUP-TFII (Chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor 2), marqueur des progéniteurs issus de la CGE. A partir de 19 semaines, une augmentation significative de cellules DLX2/ASCL1+, KI67-, est identifiée dans la VZ du télencéphale dorsal, correspondant à une vague migratoire tardive. La majorité de ces cellules expriment COUP-TFII plutôt que LHX6. Aux alentours de 26 semaines, moment de la disparition de la VZ, les cellules expriment COUP-TFII et DLX2 indiquant que la source de production des interneurones à destinée corticale devient essentiellement la CGE. Ces interneurones migrent directement dans le cortex temporal ou en passant par les EGL pour aller peupler d'autres aires corticales [Alzu'Bi et Clowry, 2019]. De façon intéressante, il avait déjà été démontré qu'ASCL1 induit la translocation des progéniteurs intermédiaires dans l'iSVZ chez l'humain afin de permettre l'expansion phylogénétique du nombre de neurones corticaux, la sortie du cycle cellulaire étant induite par NRG1/2 [Wilkinson G et coll., 2013]. ASCL1 est également présent dans les progéniteurs intermédiaires et les cellules gliales radiaires basales de l'oSVZ, et est co-exprimé avec PAX6 et TBR2 dans l'iSVZ, marqueurs du lignage glutamatergique [Camp et coll., 2015 ; Alzu'bi et Clowry, 2019]. Enfin, de nombreuses cellules DLX2/GAD67+ sont identifiées dans la couche de Brun, autre voie de migration des interneurones chez les primates, ce qui avait déjà été signalé par Rakic et Zecevic en 2003 [Rakic et Zecevic, 2003].

II-7-2- Extinction de la production des interneurones

Le moment où la génération des interneurones cesse n'est pas encore parfaitement connu. En 2016, Arshad et coll. ont démontré qu'entre 16 à 35 SA, la densité des progéniteurs interneuronaux NKX2.1+ et DLX2+ cyclés ou quiescents ainsi que les progéniteurs SOX2+

était plus importante dans les MGE comparativement aux LGE et à la VZ/SVZ. La prolifération diminuait en fonction de l'âge gestationnel, se terminant en fin de grossesse. La densité des cellules proliférantes DLX2+ était plus importante dans la CGE que dans les MGE et ces cellules étaient encore identifiées à 35 semaines. Les niveaux de protéines SOX2, NKX2.1, DLX2 et ASCL1 étaient les plus élevés dans les éminences ganglionnaires alors que la densité des interneurons GABA+ était plus élevée dans la VZ/SVZ corticale. Cependant, les cellules GABA+ exprimant NKX2.1 ou DLX2 étaient plus nombreuses dans les MGE comparativement à la VZ/SVZ corticale, suggérant fortement que les MGE et les CGE sont la principale source d'interneurones corticaux, que leur génération se poursuit presque jusqu'à la fin de la grossesse et que les interneurons GABAergiques produits dans les GE mûrissent progressivement lorsqu'ils migrent au travers des LGE et de la VZ/SVZ du télencéphale dorsal [Arshad et coll., 2016].

Dans une étude publiée la même année, Paredes et coll. [Paredes et coll., 2016] ont analysé la migration des interneurons vers le cortex préfrontal et cingulaire antérieur après la naissance, structures impliquées dans la gestion des fonctions exécutives et du comportement social dont l'expansion et la complexité sont spécifiques à l'espèce humaine, bien que les mécanismes qui les sous-tendent demeurent imparfaitement compris. Selon les observations post-mortem de Paredes et coll. entre la naissance et l'âge de trois mois, la SVZ reste densément peuplée de neurones immatures le long de la paroi des ventricules latéraux, formant une structure arciforme, l'ARC. La majorité de ces cellules qui sont Olig2-/GFAP-exprime DCX et la molécule d'adhésion neuronale polysialylée PSA-NCAM. Ces petits neurones sont répartis sur 4 niveaux dont le premier est pauci-cellulaire, le second exprime fortement DCX surtout autour des vaisseaux, le troisième est constitué par des cellules DCX+ dispersées dans la substance blanche profonde et le quatrième contient des groupes de cellules DCX+ qui s'organisent autour de structures de forme triangulaire ou de prolongements en forme de doigt. Les jeunes neurones des niveaux 2 et 3 migrent isolément ou en chaînes, parallèlement aux ventricules, ventralement et dorsalement, et ceux du niveau 4 se dirigent vers le cortex. Ces neurones expriment aussi le GABA, et les marqueurs de la MGE ou de la CGE mais n'expriment aucun des marqueurs des neurones excitateurs. Ces interneurons nés tardivement peuplent notamment le cortex cingulaire antérieur, structure dont le volume croît jusqu'à l'âge de 5 mois. Les auteurs suggèrent que ces interneurons qui contribuent à l'établissement des circuits intracorticaux inhibiteurs pourraient contribuer à la plasticité développementale.

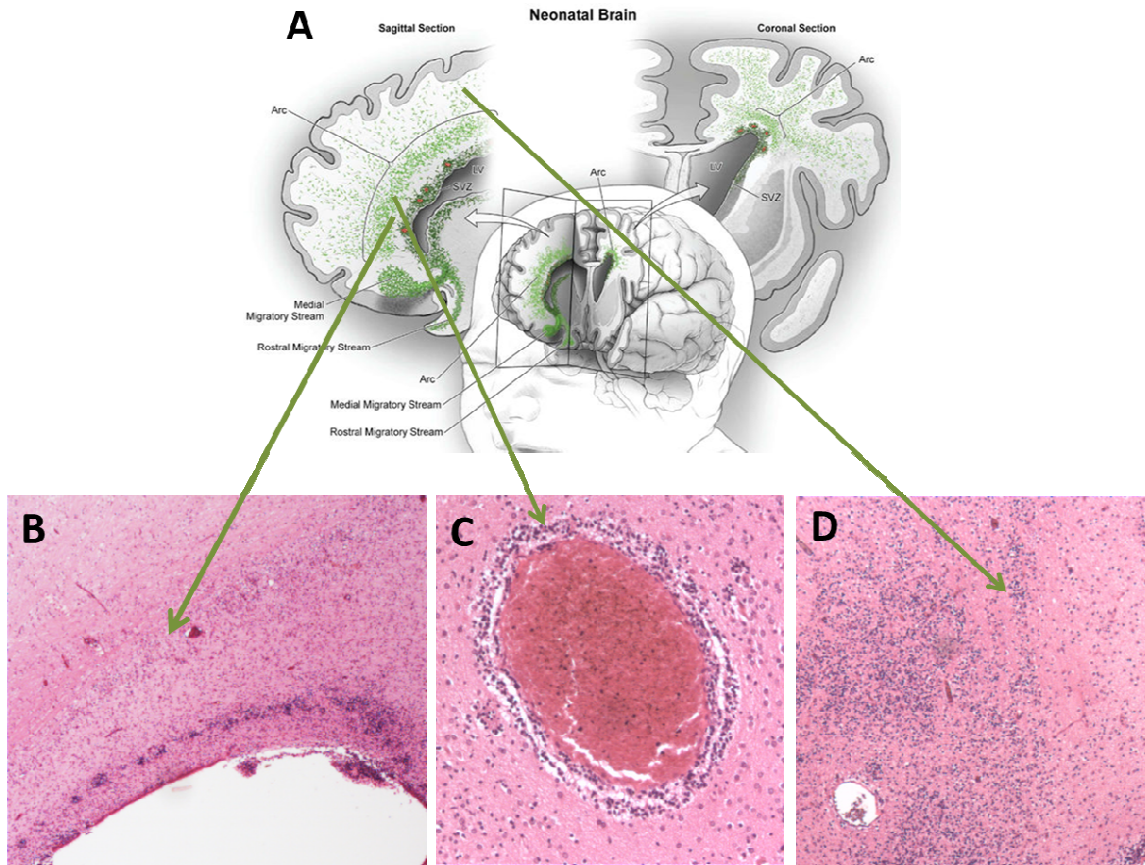


Figure 38 : Représentation schématique de l'ARC selon Paredes (A) et aspects morphologiques des interneurons immatures dans les régions périventriculaires chez l'humain au moment de la naissance : Disposition d'ensemble de l'ARC (B) ; interneurons en migration le long des vaisseaux (C) ; migration des interneurons dans la substance blanche, émettant des prolongements en forme de doigt (D).

III - L'exposition anténatale à l'alcool

III-1- Historique

Si les effets délétères de l'alcoolisation au cours de la grossesse sont connus depuis l'antiquité dans la Grèce ancienne, à Rome et à Carthage, la tératogénicité de l'alcool n'a été reconnue qu'en 1968, date à laquelle Lemoine et coll. publièrent un article princeps intitulé : « Devenir des enfants nés d'une mère alcoolique » [Lemoine et coll., 1968 ; Calhoun et Warren, 2007]. Mais la description clinique des anomalies liées à la prise maternelle d'alcool au cours de la grossesse, dont sa forme la plus sévère, le syndrome d'alcoolisation fœtale ou

FAS (Fetal Alcohol Syndrome) ne fut publiée qu'en 1973 par Jones et Smith [Jones et Smith, 1973], puis en 1974 par Jones et collaborateurs [Jones et coll., 1974]. Ces auteurs décrivirent pour la première fois les caractéristiques de la dysmorphie crânio-faciale, le défaut de croissance anté-et postnatal, le retard mental et les malformations associées à partir d'une série de 11 puis de 8 enfants nés de mère alcoolique. Depuis lors, de très nombreuses publications ont vu le jour, consacrées tant à l'affinement de la description du syndrome qu'à la relation entre intensité de l'intoxication et la sévérité clinique ou à l'influence de facteurs associés pouvant expliquer la diversité phénotypique des enfants ayant été exposés à l'alcool au cours de la vie embryo-fœtale.

III-2- Données épidémiologiques

Les affections liées à la consommation d'alcool constituent un problème de santé publique. Aux États-Unis, près de 14% de la population répond aux critères du Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) -V relatifs à la consommation d'alcool, et 8.5% des adultes ainsi que 6% des adolescents en consomment. Plus de 50% des adolescents le consomment sur un mode aigu appelé binge drinking (traduction littérale : épisode de consommation excessive d'alcool) qui se définit par la prise de plus de 5 verres pour un individu de sexe masculin et de 4 verres pour un individu de sexe féminin en moins de 2 heures, ce qui entraîne, à la différence des adultes, une altération des fonctions hippocampe-dépendantes avec diminution de volume de l'hippocampe en imagerie [Nickell et coll., 2017].

La prise d'alcool en cours de grossesse (Prenatal Alcohol Exposure, PAE), est responsable d'un syndrome d'alcoolisation fœtale appelé FADS (Fetal Alcohol Disorder Spectrum) qui regroupe l'ensemble des perturbations induites par la prise d'alcool par la mère pendant la grossesse et qui inclut la forme la plus sévère, le FAS. Vingt pour cent des femmes âgées de 18 à 34 ans consomment de l'alcool en binge, et la PAE affecte 0.77% de la population générale, et de 2 à 7% de la population aux États-Unis et en Europe [Green et coll., 2016]. Une étude épidémiologique récente menée au Canada et aux États-Unis a révélé que 10 à 20% des femmes enceintes consomment de l'alcool et que 3% d'entre elles s'adonnent au binge drinking [Popova et coll., 2017]. La prévalence du FADS estimée à partir de méta-analyses est extrêmement variable en fonction des conditions socio-économiques, des traditions culturelles et religieuses. Elle serait globalement de 1.12 à 5%, de 11% en Afrique du sud, 4% en Italie, et probablement aussi très élevée en Afrique sub-saharienne [Wozniack

et coll., 2019]. Quant à la prévalence des autres variantes cliniques, elle a été estimée à 0.78% pour le FAS, et 0.9% pour le syndrome « troubles neurodéveloppementaux liés à l'alcool». En ce qui concerne les anomalies du comportement dans les cohortes FADS : le syndrome déficit de l'attention- hyperactivité est augmenté d'un facteur 8 à 10 par rapport à la population générale, les troubles du langage d'un facteur 10, les déficits intellectuels d'une facteur 97, les psychoses d'un facteur 24, les troubles de type anxieux d'un facteur 11 et les troubles de l'audition d'un facteur 128 [Charness et coll., 2016; Popova et coll., 2017].

III-3- Le syndrome d'alcoolisation fœtale humain

III-3-1- Données cliniques

Le FADS constitue un véritable problème de santé publique de par les conséquences délétères qu'il induit à long terme, qu'il s'agisse de handicaps physiques, neurologiques, cognitifs, comportementaux, psychiatriques et de comorbidités. Socialement, les patients atteints d'un FADS ont une productivité diminuée, sont parfois sans emploi, sans domicile et sont plus fréquemment incarcérés. Bien que le FADS soit aussi fréquent que le spectre autistique (Autism Spectrum Disorder, ASD), il reste sous-diagnostiqué pour des raisons diverses. A titre d'exemple, dans une cohorte de 222 enfants FADS, seuls 2 avaient été diagnostiqués FADS avant la prise en charge de la cohorte [Chasnoff et coll., 2015]. Le diagnostic de FADS est souvent complexe, notamment dans les formes peu sévères appelées ARND (Alcohol Related Neurodevelopmental Disorder) dans lesquelles il n'y a pas de dysmorphie faciale ni de malformations, les troubles neurocognitifs pouvant être mineurs. Les diagnostics différentiels sont multiples, en particulier avec les autres troubles de l'attention-hyperactivité (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD). Ce spectre comporte dans sa forme la plus sévère, le FAS une dysmorphie crânio-faciale, un retard de croissance intra-utérin (RCIU), des malformations viscérales, une microcéphalie (périmètre crânien >-2 DS) associée à des anomalies cérébrales structurales, puis après la naissance, à des anomalies neurologiques, neurocognitives et comportementales dénommées handicaps secondaires [Chudley et coll., 2007 ; Del campo, 2017].

III-3-1-1-La dysmorphie crânio-faciale

Elle comporte un rétrécissement bitemporal, de petites fentes palpébrales avec épicanthus, un hypertélorisme, un ptosis, des sourcils en arc de cercle, une ensellure nasale plate, des narines antéversées, des oreilles en rail de chemin de fer, une hypoplasie de l'étage moyen de la face, un philtrum effacé, long et bombant ainsi qu'une lèvre supérieure mince.



Figure 39 : Dysmorphie crânio-faciale du SAF anténatal - interruption à 26 SA pour syndrome d'alcoolisation fœtale avéré et récidivant: la dysmorphie est déjà constituée et caractéristique (Données personnelles).

III-3-1-2- Le retard de croissance intra-utérin

Avant la naissance, la définition du RCIU désigne des biométries fœtales inférieures au 5ème percentile selon les courbes de référence de Guihard-Costa [Guihard-Costa et coll., 2002] alors qu'en pédiatrie, on parle de RCIU si l'insuffisance pondérale est inférieure au 10ème percentile selon les courbes de Leroy et Lefort [Leroy et Lefort, 1971]. Après la naissance, les perspectives de croissance apparaissent réduites, les mensurations pouvant demeurer en dessous de la moyenne toute la vie, mais la notion de petite ou grande taille est à rapporter à la communauté dont est issu l'enfant et à la taille de ses parents [Jones et Smith, 1973 ; Habbick et coll., 1998 ; Chudley et coll., 2005]. Outre son action directe sur la croissance fœtale, l'alcool agit indirectement en perturbant les fonctions placentaires. Il favorise l'hypoxie par vasoconstriction des vaisseaux ombilicaux jusqu'aux vaisseaux villositaires, entraîne la production de radicaux libres et augmente le risque d'hypoglycémie chez le fœtus [Chen et Sulik, 1996 ; Kay et coll., 2000]. L'altération du métabolisme

placentaire, du développement du réseau villositaire et du transfert de nutriments et de vitamines au fœtus participent à la toxicité foeto-placentaire de l'alcool [Fisher et coll., 1982; Fisher et coll., 1986 ; Rice et coll., 1986 ; Karl et coll., 1996 ; Bramley et coll., 1999].

III-3-1-3- Malformations viscérales et squelettiques

- Parmi les anomalies cardiaques fœtales, les plus fréquentes sont les anomalies septales (communications interventriculaires ou interauriculaires) [Burd et coll., 2007], les anomalies des gros vaisseaux (aorte et artère pulmonaire) [Terrapon et coll., 1977], le canal atrio-ventriculaire, le défaut de fermeture du canal artériel, la tétralogie de Fallot [Loser et coll., 1992].

- Au sein du groupe des malformations de l'appareil génito-urinaire, des hypoplasies rénales uni- ou bilatérales sont observées, de même que des reins en fer à cheval, une aplasie rénale ou des reins dysplasiques, des duplications urétrales et/ou des hydronéphroses [Chudley et coll., 2005]. Hypospades et cryptorchidies sont aussi décrits.

- Les anomalies et malformations squelettiques sont également fréquentes : articulations fixées, retard de développement du système vertébral [Habbick et coll., 1998], exostoses tibiales bilatérales [Azouz et coll., 1993], déformations de la hanche en *coxa valga* [Jaffer et coll., 1981], fusion congénitale des vertèbres cervicales ou syndrome de Klippel-Feil [Jeret et coll., 1987; De Cornulier 1991 ; Schilgen et Loeser 1994]. Les mains sont souvent concernées par les malformations : hypoplasies unguéales [Crain et coll., 1983], fusion des osselets du poignet avec les métacarpiens, camptodactylie (flessum congénital de l'interphalangienne proximale) avec altérations des dermatoglyphes secondaires à la diminution des mouvements fœtaux, clinodactylies (déviations digitales dans le plan radio-ulnaire) [Jaffer et coll., 1981] ou plus rarement polydactylies [Chiriboga, 2003]. Le thorax peut se trouver déformé en entonnoir ou en carène [Chudley et coll., 2005]. L'alcoolisation foetale est également une cause de chondrodysplasies ponctuées [Leicher-Duber et coll., 1990; Maroteaux et coll., 1984]. Le développement dentaire peut aussi être affecté [Jackson et Hussain, 1990].

- De très nombreuses autres variétés de malformations ont été rapportées comme pouvant être associées à une exposition prénatale à l'alcool, la tératogénicité de l'alcool restant incertaine dans certains cas [Chudley et coll., 2005]. L'alcoolisation foetale a été incriminée dans la survenue d'une fibrose hépatique congénitale ou d'une atrésie des voies biliaires extra-hépatiques [Habbick et coll., 1979]. De rares observations de sténose du pylore

ou d'atrésie de l'intestin grêle [Mangyanda et coll., 1998], différentes atteintes oculaires [Chan, 1999] ou vestibulo-cochléaires [Church et Abel, 1998], des hernies diaphragmatiques [Kesmodel et coll., 2002], des fentes labio-palatines [Chiriboga, 2003; Seki et coll., 2005] et des malformations adénomatoïdes kystiques pulmonaires ont été rapportées [Kulwa et coll., 2005]. L'ensemble de ces anomalies dont l'association est parfois évocatrice, n'est cependant pas spécifique de l'exposition foetale à l'alcool.

III-3-1-4- Anomalies cérébrales structurales

L'anomalie la plus constante est la microcéphalie. Certaines régions sont plus affectées, notamment le lobe pariétal et la région périsylvienne au niveau desquels il existe une réduction de volume de la substance blanche. Le corps calleux manque ou est hypoplasique, cette hypoplasie touchant le rostre et le splénium. L'hydrocéphalie est inconstante et probablement le reflet d'une diminution de volume du parenchyme cérébral (dilatation *a vacuo*). Une hypoplasie des noyaux caudés est également classiquement décrite de même qu'une hypoplasie du cervelet touchant surtout le lobe antérieur du vermis [Riley et Mcgee, 2005].

L'atteinte oculaire est variable et colobome, hypoplasie du nerf optique, microphthalmie, strabisme convergent, dysplasie rétinienne ou vaisseaux rétiniens d'aspect tortueux ainsi que faible acuité visuelle ont été décrits.

III-3-1-5- Troubles neurocognitifs et comportementaux

Après la naissance, le déficit cognitif peut être sévère et global ou sélectif : troubles de l'attention, de la mémoire ou des fonctions exécutives, déficit visuo-spatial, défauts d'intégration spatio-temporelles, pauvreté des capacités de jugement, parcours scolaire chaotique avec faibles performances académiques [Riley et McGee, 2005]. Une épilepsie est présente dans 9% des cas et peut résulter d'anomalies de la mise en place du cortex cérébral, ces enfants pouvant être porteurs de micropolygyrie ou d'hétérotopies nodulaires. La baisse de l'audition peut résulter d'une transmission ou d'une conduction altérée et impacte le langage, la parole, la lecture et l'écriture. Une étude récente par imagerie portant sur des enfants adoptés d'origine russe [Boronat et coll., 2017] a permis de mettre en évidence un certain nombre d'anomalies ou de malformations cérébrales : hypoplasie ou agénésie du corps calleux, hypoplasie cérébelleuse, ventriculomégalie, anomalies vasculaires, gyration

simplifiée avec épaissement ou amincissement de la plaque corticale. De façon intéressante, des études de tractographie en imagerie en DTI (Diffusion Tensor Imaging) ont permis de révéler des anomalies de la microstructure de la substance blanche et de les relier aux troubles comportementaux [Riley, 2011 ; Wozniak et coll., 2019]. Enfin, les troubles du comportement incluent impulsivité, agressivité, hyperactivité, conduites addictives, comportements sexuels inappropriés, faible aptitude à s'insérer socialement avec comportements délictueux voire criminels [Chudley et coll., 2007].

III-3-2- Etudes neuropathologiques

De très rares études neuropathologiques exhaustives ont été publiées à partir de grandes séries de patients ayant présenté un FADS. La première description autopsique des lésions cérébrales est celle de Jones et Smith [Jones et Smith, 1973] qui identifièrent chez un fœtus décédé à 32 SA une micrencéphalie sévère (encéphale pesant 140g pour une norme de 235 +/- 24 g selon les abaques de Guihard Costa et Larroche) [Guihard Costa et Larroche, 1990], une gyration simplifiée par fusion des circonvolutions, des hétérotopies neuro-gliales méningées, une dilatation ventriculaire et une agénésie du corps calleux. Entre 1973 et 2017, 33 cas ont été documentés sur le plan neuropathologique et les anomalies décrites permirent d'identifier les malformations très sévères à type d'holoprosencéphalie et d'anomalies de fermeture du tube neural (NTD), et de confirmer l'existence d'une micrencéphalie constante avec dilatation ventriculaire, d'une agénésie/hypoplasie du corps calleux, d'une dysgénèse du tronc cérébral et du cervelet avec sur le plan histologique des anomalies de migration neuronale [Clarren, 1977 ; Clarren et coll., 1978 ; Wisniewski K et coll., 1983 ; Roebuck et coll., 1998].

Ce n'est qu'en 2017 que Jarmasz et coll. rapportèrent de façon exhaustive les lésions viscérales et cérébrales à partir d'une grande série autopsique incluant 174 patients répartis en 5 groupes comportant 52 morts fœtales *in utero*, 65 nourrissons (1 jour à 1 an), 32 enfants (13 mois-12 ans), 14 adolescents (13-20 ans) et 11 adultes [Jarmasz et coll., 2017]. Dans le 1^{er} groupe, 42% avaient un très faible poids de naissance, dans plus de 25% des cas, il y avait eu une exposition à l'alcool au cours du 1^{er} trimestre, et dans plus de 75% des cas aucun suivi de grossesse n'avait été réalisé. La dysmorphie était retrouvée dans 25% des cas. Les lésions encéphaliques étaient de nature malformative (NTD, holoprosencéphalie, hydrocéphalie), et/ou de nature acquise (ischémo-hémorragique). Dans le second groupe, 29% des mères avaient consommé de l'alcool tout au long de la grossesse. Sept nourrissons avaient présenté

une épilepsie avec des lésions de sclérose hippocampique en histologie. La dysmorphie n'était pas renseignée. Les causes de décès étaient mort subite inopinée, sepsis et complications liées aux malformations. Treize pour cent des nourrissons avaient une micrencéphalie, les autres malformations étant NTD, agénésie partielle du corps calleux, hétérotopies méningées. Comme dans le 1^{er} groupe, des lésions de nature ischémo-hémorragique étaient identifiées. Les causes de décès étaient le plus souvent de nature infectieuse. Dans la cohorte des 32 enfants, 20 avaient été diagnostiqués ou suspectés de FADS. La moitié d'entre eux étaient porteurs de malformations (cœur, rein, squelette) et 20% d'entre eux étaient microcéphales. Les lésions cérébrales étaient de nature traumatique ou ischémique séquellaires. Dans le groupe des adolescents, tous avaient été suspectés de FADS et le diagnostic de FAS avait été retenu a posteriori chez 8 d'entre eux. Les causes de décès étaient suicide, accident ou homicide. Six étaient microcéphales, mais ni lésions viscérales ni lésions cérébrales n'étaient retrouvées. Les 3 sujets épileptiques n'avaient pas de lésions hippocampiques. Enfin dans le dernier groupe, tous avaient été suspectés ou diagnostiqués FADS, aucun ne présentait de malformations viscérales ou cérébrales.

Même si cette étude a des limites en raison de l'insuffisance de renseignements, en particulier la dysmorphie, on peut remarquer que les causes de décès précoces sont essentiellement liés aux malformations viscérales et cérébrales associées aux lésions acquises engendrées par l'alcoolisation anténatale notamment par le biais de l'insuffisance placentaire, les causes de décès chez les individus plus âgés étant souvent en rapport avec les troubles comportementaux. Enfin, d'après ces constatations, la survenue d'une microcéphalie est inférieure à celle rapportée dans d'autres études cliniques ou par imagerie, tout comme la survenue de malformations cérébrales, les lésions encéphaliques étant plus souvent de nature acquise, ischémique et/ou hémorragique récentes ou séquellaires.

III-4- Critères diagnostiques

III-4-1- Critères diagnostiques du FADS

Plusieurs systèmes de classification existent au Canada et aux Etats-Unis sur la base générale de 4 signes : niveau de la consommation d'alcool pendant la grossesse, retard de croissance, dysmorphie faciale et anomalies neurodéveloppementales. Les systèmes plus utilisés sont : le « FADS 4-digit Diagnostic Code », the « Hoymes-revised Institute of Medicine criteria » (IOM), les « Canadian guidelines » et les « Centers for Disease Control »

guidelines (CDC) [pour revue, Riley et coll., 2011]. Ces systèmes ne prennent malheureusement pas en compte les mêmes critères et ne permettent pas d'avoir un diagnostic de certitude en cas d'anomalies plus modérées ou partielles, décrites d'abord sous le terme de FAE (suspected Fetal Alcohol Effects) en 1978 par Clarren et Smith [Clarren et Smith, 1978], puis sous la dénomination de pFAS en 1996 (partial FAS).

La dysmorphie faciale constitue un point d'appel capital pour identifier un SAF. L'étroitesse des fentes palpébrales, très caractéristique [Moore et coll., 2001 ; Moore et coll., 2007], peut être évaluée en pédiatrie par comparaison à des courbes de référence établies pour des foetus blancs nord-américains au-delà de 27-29 SA [Chiriboga, 2003; Chudley et coll., 2005]. De tels critères diagnostiques ne sont pas disponibles actuellement avant ce terme, l'appréciation du caractère étroit des fentes chez le foetus âgé de moins de 27 SA ne pouvant être formellement établie. Une échelle pédiatrique visuelle permet d'évaluer l'amincissement du vermillon de la lèvre supérieure et du lissage du sillon naso-labial, cette échelle étant adaptée aux deux sexes et à différents groupes de populations [Astley et Clarren, 1996; Chudley et coll., 2005]. Selon ces critères, le philtrum n'a pas nécessairement besoin d'être long pour évoquer un SAF : un petit philtrum bombant associé à une lèvre supérieure fine et un effacement du sillon naso-labial peut tout à fait correspondre à un SAF. Outre le trépied diagnostique fentes palpébrales-philtrum-lèvre supérieure), la dysmorphie faciale est d'autant plus évocatrice que des anomalies supplémentaires sont constatées : hypo- ou hypertélorisme, front allongé et étroit, ensellure nasale large, narines antéversées, malformation de l'articulation temporo-mandibulaire, hypoplasie de l'étage moyen de la face (sphénoïde et ethmoïde hypoplasiques), micrognathie ou encore épicanthus [Chaudhuri, 2000; Jaffer et coll., 1981; Jeret et coll., 1987].

	Four digit code	Hoyme–Revised IOM	Chudley–Canadian	National Task Force/CDC
FAS				
Facial Characteristics	Simultaneous presentation of short palpebral fissures (≤ 2 SD), thin vermilion border, smooth philtrum (rank 4 or 5) ²	≥ 2 of the following: short palpebral fissures (≤ 10 th percentile), thin vermilion border (rank 4 or 5), smooth philtrum (rank 4 or 5)	Simultaneous presentation of short palpebral fissures (≤ 2 SD), thin vermilion border, smooth philtrum (ranks 4 and 5)	Simultaneous presentation of short palpebral fissures (≤ 10 th percentile), thin vermilion border, smooth philtrum (ranks 4 and 5)
Growth Retardation	Height or weight ≤ 10 th percentile	Height or weight ≤ 10 th percentile	Height or weight or disproportionately low weight-to-height ratio (≤ 10 th percentile)	Height or weight ≤ 10 th percentile at any point in time.
CNS involvement	Head circumference (OFC) ≥ 2 SD below norm or significant abnormalities in brain structure or evidence of hard neurological findings or significant impairment in ≥ 3 domains of brain function (≥ 2 SD below the mean) as assessed by validated and standardized tools	Head circumference (OFC) ≤ 10 th percentile or structural brain abnormality	Evidence of ≥ 3 impairments in the following CNS domains: hard and soft neurologic signs; brain structure; cognition; communication; academic achievement; memory; executive functioning and abstract reasoning; attention deficit/hyperactivity; adaptive behavior, social skills, social communication	Head circumference (OFC) ≤ 10 th percentile or structural brain abnormality or neurological problems or other soft neurological signs outside normal limits or functional impairment as evidenced by global cognitive or intellectual deficits, below the 3rd percentile (2 SD) below the mean or functional deficits below the 16th percentile (1 SD) below the mean in at least 3 domains:
Alcohol Exposure	Confirmed or Not confirmed	Confirmed or Not confirmed	Confirmed or Not confirmed	Confirmed or Not confirmed
Partial FAS				
Facial Characteristics	Short palpebral fissures (≤ -2 SD) and either a smooth philtrum (rank 4 or 5) or thin vermilion border (rank 4 or 5), with the other being normal (rank 3) OR palpebral fissure (≤ 1 SD) and both a smooth philtrum and thin vermilion (rank 4 or 5)	≥ 2 —short palpebral fissures (≤ 10 th percentile), thin vermilion border, smooth philtrum (rank 4 or 5)	≥ 2 —short palpebral fissures, thin vermilion border, smooth philtrum	Not applicable
Growth Retardation	Not required	Either height or weight ≤ 10 th percentile OR (see CNS involvement)	Not required	Not applicable
CNS involvement	Same as for FAS	Head circumference ≤ 10 th percentile or structural brain abnormality or behavioral and cognitive abnormalities inconsistent with developmental level	Same as for FAS	Not applicable
Alcohol Exposure	Confirmed	Confirmed or Not confirmed	Confirmed	Not applicable
ARND				
	Does not propose this diagnostic category, but rather has several categories assessing functional deficits			Felt that there was insufficient data to provide guidance for this diagnosis. Formed group to discuss
CNS involvement	Same as for FAS	Either 1) structural brain anomaly or OFC ≤ 10 th percentile or 2) Evidence of	Same as for FAS	Not applicable

	Four digit code	Hoyme–Revised IOM	Chudley–Canadian	National Task Force/CDC
		a complex pattern of behavioral or cognitive abnormalities inconsistent with developmental level that cannot be explained by genetics, family background or environment alone		
Alcohol Exposure	Confirmed	Confirmed	Confirmed	Not applicable
Notes	The 4-digit code provides an assessment of effects in 4 areas (growth, face, CNS, and alcohol exposure) that results in 256 different codes and 22 diagnostic categories	Alcohol exposure is defined as a pattern of excessive intake or heavy episodic drinking	Alcohol exposure is defined as a pattern of excessive intake or heavy episodic drinking	Alcohol exposure levels are not defined, but the authors cite evidence of alcohol exposure based upon clinical observation; self-report; reports of heavy alcohol use during pregnancy by a reliable informant; medical records documenting positive blood alcohol levels, or alcohol treatment; or other social, legal, or medical problems related to drinking during the index pregnancy
	A specific pattern or level of alcohol exposure is not required, just that alcohol exposure is confirmed or not	Other behavioral characteristics are assessed, but it is unclear how they fit into the diagnosis for FAS	A domain is considered “impaired” when on a standardized measure: Scores are ≥ 2 SD below the mean, or there is a discrepancy of at least 1 SD between subdomains or there is a discrepancy of at least 1.5–2 SD among subtests on a measure	

Tableau 2 : Comparaison des différents algorithmes diagnostiques du spectre lésionnel liés à l’exposition prénatale à l’alcool [d’après Riley et coll., 2011].

L'individualisation de ces signes moins spécifiques est parfois importante dans le rattachement d'une dysmorphie incomplète à une exposition prénatale à l'alcool. A partir de mesures anthropométriques utilisant 6 critères (périmètre crânien, profondeur de l'étage moyen de la face, mesure de l'arc mandibulaire, des fentes palpébrales, de la distance entre les 2 angles temporo-mandibulaires et zygomatiques droits et gauches) il a été rapporté qu'il était possible de distinguer les enfants FAS, FADS des enfants non exposés à l'alcool en période anténatale [Moore et coll., 2001].

En ce qui concerne les troubles neurocomportementaux associés à la PAE, ce diagnostic est proposé dans la version révisée du DMS-V s'il existe un dysfonctionnement dans les trois domaines suivants : neurocognition, fonctions d'adaptation et « self-regulation » [pour revue, Wozniak et coll., 2019].

III-4-2- Diagnostic et dépistage de l'alcoolisation maternelle

Outre les critères cliniques, le diagnostic de FADS s'appuie sur le dosage de marqueurs biologiques. Certains biomarqueurs sont dits directs, correspondant au dosage des métabolites de l'éthanol, les autres sont des marqueurs indirects, reflétant l'intensité des lésions cellulaires et tissulaires engendrées par l'alcool. Les marqueurs indirects classiques sont le Volume Globulaire Moyen (VGM), le taux sérique de Gamma-Glutamyl Transférase (γ GT), les transaminases et le taux sérique de transferrine désialylée (CDT), mais ils manquent de sensibilité et de spécificité en particulier en situation de grossesse. Les marqueurs directs sont : l'éthanol (dosé dans le sang et les urines), les esters éthyliques d'acides gras (méconium, cheveux, plasma, urines et placenta), l'éthyle glucuronide (méconium, cheveux et ongles, plasma, urines et placenta), l'éthyle sulfate (méconium, urine, plasma), et le phosphatidylethanol dosé dans le sang et détecté jusqu'à trois semaines après la prise d'alcool [Bakhireva et coll., 2011 ; Niemela, 2016]. Mais bien que nécessaires, les biomarqueurs d'exposition actuellement connus ne permettent souvent pas d'établir un diagnostic de certitude à court terme chez la plupart des enfants.

Un critère indispensable permettant de relier l'un des tableaux cliniques présentés par les fœtus et les enfants à l'alcoolisation fœto-maternelle reste à ce jour la reconnaissance par les cliniciens de la consommation d'alcool maternelle au cours de la grossesse. Il n'existe donc pas de meilleure méthode qu'un interrogatoire clinique minutieux de la femme enceinte et de son entourage pour dépister une éventuelle consommation d'alcool. L'interrogatoire maternel et peut s'appuyer sur l'utilisation d'auto-questionnaires standardisés tels que

l'AUDIT (Alcohol Use Disorder Identification Test) [Saunders et coll., 1993]. La consommation d'alcool chez les femmes enceintes n'est ni rare, ni facile à mettre en évidence. Une enquête réalisée chez 837 femmes enceintes révèle qu'une consommation est affirmée chez 52,2% des femmes, l'utilisation du questionnaire AUDIT permettant de retrouver une consommation occultée chez 54,3% des prétendues abstinences, une consommation considérée à risques chez 28,9% des femmes, et excessive chez 13,9% d'entre elles [De Chazeron et coll., 2008]. S'il est admis qu'un SAF peut survenir pour une consommation d'alcool maternelle de 3 verres par jour, il faut garder à l'esprit qu'aucune dose minimale d'alcool ingérée par la mère n'est douée d'innocuité vis-à-vis du fœtus. Au-delà de la reconnaissance de la prise d'alcool se pose le problème de la quantification de cette consommation et de son mode (chronique ou binge) ainsi que du moment l'alcool est consommé (1^{er}, 2^{ème} et/ou 3^{ème} trimestre), autant de variables difficiles à appréhender et sources potentielles de grandes variations cliniques. A ces difficultés de mise en évidence d'une prise d'alcool et la variabilité des modes de consommation s'ajoutent les effets de co-addictions et/ou de comédications très fréquentes, les patientes consommant souvent des psychotropes, des antiépileptiques comme le Valproate de sodium, du cannabis, du LSD ou encore de l'héroïne. Cette étape capitale de dépistage clinique des patientes à risque ne peut se faire sans une sensibilisation et une prise de conscience de la part des professionnels de santé de la nécessité d'une recherche systématique d'alcoolisation chez les femmes enceintes. Le rattachement de tout tableau foetopathologique ou pédiatrique à sa cause toxique alcoolique et toute prévention de récurrence de cette pathologie ne peut se faire sans cette étape clinique.

III-5- Mécanismes physiopathologiques du FADS

Malgré la multiplicité des travaux effectués au cours des trois dernières décennies, la physiopathologie du syndrome d'alcoolisation foetale demeure encore imparfaitement connue. Les effets tératogènes de l'éthanol peuvent être observés au niveau de la plupart des organes comme en témoigne le très vaste spectre malformatif. Cependant, les conséquences les plus dramatiques sont liées à sa toxicité au cours du développement cérébral car elles auront des répercussions neurocognitives et comportementales tout au long de la vie. Les mécanismes d'action de l'éthanol sont variés, car celui-ci interagit avec de nombreuses voies moléculaires, biochimiques et cellulaires.

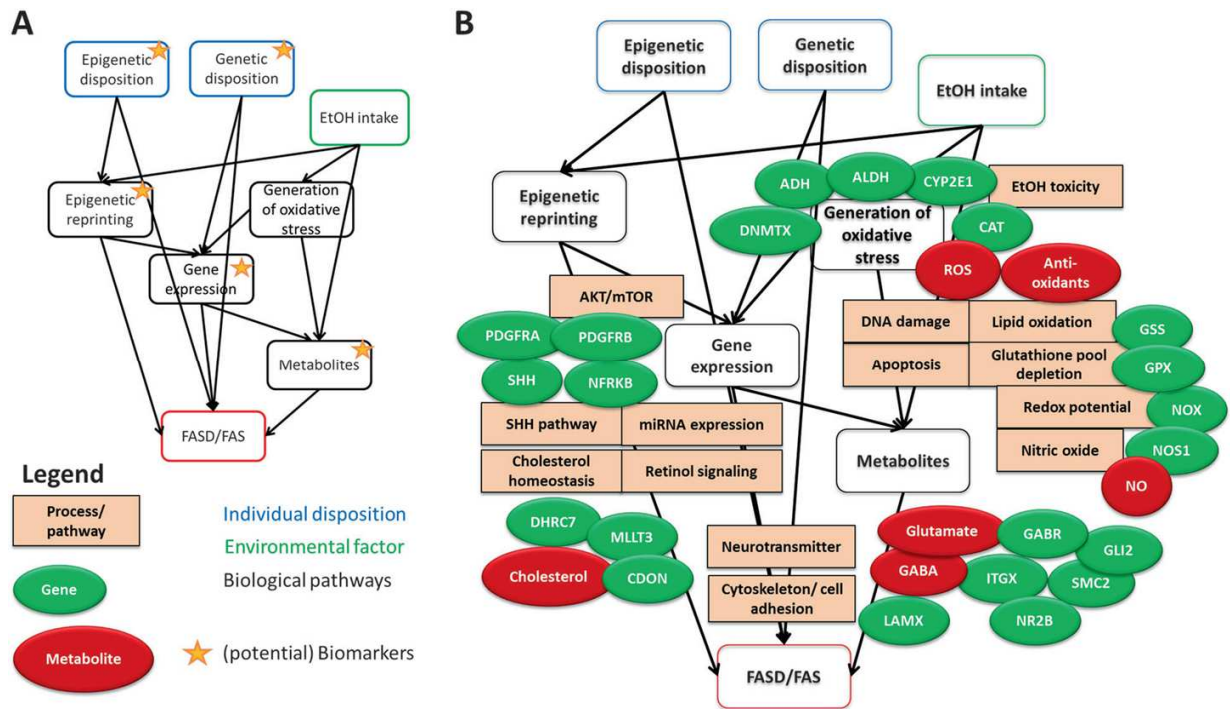


Figure 40 : Représentation schématique des divers processus moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue du FASD après exposition à l'éthanol au cours de la vie embryofœtale [D'après Ehrhart et coll., 2019].

III-5-1- Mécanisme d'action direct

Le mécanisme d'action direct de l'éthanol est lié à son métabolisme qui produit l'acétaldéhyde, un composé toxique provoquant un stress oxydatif, mécanisme majeur de constitution des lésions. L'éthanol est métabolisé de façon majoritaire par l'alcool deshydrogénase (ADH) et le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) qui est présent dans le foie et le cerveau. Une troisième voie, accessoire, est représentée par la catalase (CAT). L'ADH n'est active qu'à partir de 26 SA et demeure à un taux d'activité réduit chez le fœtus, ce qui a pour conséquence une alcoolémie foetale souvent supérieure à l'alcoolémie maternelle et explique en grande partie les effets délétères extrêmement sévères liés à la prise d'alcool pendant la période embryonnaire et fœtale précoce [Nava-Ocampo et coll., 2004]. Le CYP2E1 est actif dès 16 SA, mais son niveau reste bas tout au long de la grossesse. Cette enzyme produit des radicaux libres (ROS, Reactive Oxygen Species) qui oxydent de façon incontrôlée les lipides, les protéines et autres métabolites, provoquant des altérations de l'ADN dont l'augmentation progressive déclenche les voies de l'apoptose responsables d'une diminution du volume cérébral et de lésions corticales à l'origine du déficit neurocognitif et

comportemental. Le cerveau en développement est particulièrement sensible à la génération de ROS en raison de son métabolisme oxydatif élevé, de sa richesse en lipides insaturés et en neurotransmetteurs qui sont autant de substrats pour les ROS. La réaction avec les ROS produit des ions superoxyde, des quinones et semi-quinones qui sont eux-mêmes des radicaux extrêmement réactifs, ce d'autant que les enzymes anti-oxydantes sont à des taux bas dans le cerveau fœtal [Ehrhart et coll., 2019].

III-5-2- Effets de l'éthanol sur l'expression génique

Les perturbations de l'expression des gènes après exposition anténatale à l'alcool sont de deux ordres : effets à court terme sur le métabolisme énergétique et la survie cellulaire, et effets à long terme sur le niveau d'expression de certains facteurs de croissance, molécules d'adhésion et neurotransmetteurs. Ces perturbations de l'expression génique dans le cerveau perdurent jusqu'à l'âge adulte.

III-5-2-1- Effets à court terme

Sous l'effet du stress oxydatif, la bioénergétique mitochondriale intraneuronale est altérée, induisant une dérégulation de la prolifération et de la différenciation des mitochondries, une réduction de leur volume et de l'activité de la chaîne respiratoire et donc de la production d'ATP. L'éthanol active la voie apoptotique mitochondriale ou voie intrinsèque qui est régulée par Bax et Bcl-xL. La perturbation de l'intégrité mitochondriale provoque la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3. Cette mort neuronale apoptotique est observée dans diverses régions comme le cortex cérébral et cérébelleux, l'amygdale ou les neurones du système visuel [Pierce et coll., 1999 ; Ikonomidou et coll., 2000 ; Tenkova et coll., 2003 ; Balaszczuk et coll., 2011]. En perturbant la voie de signalisation AMPc/CREB, l'éthanol diminue l'expression d'un co-activateur transcriptionnel jouant un rôle important dans la fonction mitochondriale et dans les systèmes cellulaires antioxydants, le PGC-1 α (Proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha) [Lamarche et coll., 2013].

Lorsque le cerveau est encore très immature, les gènes proapoptotiques sont plus fortement exprimés et peuvent exercer un effet néfaste à une période où le cerveau exposé à une alcoolisation est particulièrement vulnérable [Alimov et coll., 2013]. A partir de la 5^{ème} semaine, le pool de progéniteurs qui prolifèrent dans les zones germinatives et qui migrent

pour former la plaque corticale et les noyaux gris sous-corticaux est diminué, expliquant en partie la constitution précoce d'une micrencéphalie [Rubert et coll., 2006]. La diminution du pool de progéniteurs est à l'origine d'une diminution de la glie radiaire, d'un retard de migration des neurones effecteurs et d'une différenciation précoce des cellules gliales radiaires en cellules gliales de type adulte [Gressens et coll., 1992 ; Aronne et coll., 2011]. Par ailleurs, l'extension de la plaque prochordale et la voie de signalisation Shh au cours de la 5^{ème} semaine sont perturbées avec pour conséquences potentielles une holoprosencéphalie et/ou une agénésie du corps calleux par absence de clivage du prosencéphale en deux hémisphères cérébraux et de mise en place des structures de la ligne médiane.

Au cours des stades précoces de l'embryogénèse, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des vitamines et en particulier de l'acide rétinoïque est diminuée sous l'effet de l'éthanol. Les enzymes qui catabolisent l'éthanol en acétaldéhyde puis en acide acétique utilisent les groupes enzymatiques destinés au métabolisme de l'acide rétinoïque. Ce dérivé de la vitamine A est un morphogène capital modulateur des gènes *HOX* au moment de la segmentation du cerveau primitif en prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale au cours de la 3^{ème} semaine de développement [Maden, 2001]. A partir de J21, les cellules des crêtes neurales s'isolent du prosencéphale, du mésencéphale et du rhombencéphale sous l'influence de l'acide rétinoïque et migrent vers la face ventrale de l'embryon pour former les différents bourgeons constitutifs de la face [Sant'Anna et Tosello, 2006]. Une exposition à l'alcool pendant cette période (J17 chez l'humain) permet de reproduire chez le rongeur les caractéristiques de la dysmorphie du FAS par apoptose et/ou anomalies de migration des cellules de la crête neurale [Sulik, 2005] alors qu'au cours de la neurulation (4^{ème} semaine chez l'humain) l'exposition à l'alcool reproduit la dysmorphie du syndrome de DiGeorge ou syndrome vélo-cardio-facial, en rapport avec une microdélétion en 22q.11.13, différente de celle du FAS et associant petites fentes palpébrales, implantation basse des oreilles et nez bulbeux. Une PAE survenant après la période d'organogénèse (entre 4 et 8 semaines post-conceptionnelles) a moins d'impact sur la constitution de la dysmorphie mais est responsable d'ARND. L'éthanol perturbe aussi l'expression de gènes codant la niacine (vitamine B3), la vitamine D et l'acide folique (vitamine B9) impliquées dans la différenciation cellulaire, la maturation des crêtes neurales et l'inflammation [Felts et coll., 2014].

La modulation de l'expression de certains gènes par l'éthanol est par ailleurs susceptible d'augmenter ou de diminuer la susceptibilité individuelle à la neurotoxicité de l'éthanol et donc la propension à développer des anomalies crânio-faciales plus ou moins

marquées. Ces gènes codent pour des protéines ribosomales, les éléments du protéasome, l'épissage d'ARN et pour des molécules d'adhésion [Smith et coll., 2014].

III-5-2-2- Effets à long terme

L'éthanol induit à long terme une dérégulation de l'expression d'autres gènes impliqués dans la production de facteurs neurotrophiques, les interactions cellule-cellule et cellule matrice extracellulaire, la synaptogénèse et la plasticité synaptique ainsi que dans la différenciation neuronale [Feltus et coll., 2014].

Le Nerve Growth Factor (NGF), le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et le VEGF jouent un rôle clé dans la survie, la différenciation et la maturation cellulaires ainsi que le maintien de la connectivité entre cellules cérébrales. Leur niveau d'expression et celui de leurs récepteurs ainsi que le niveau d'expression du BDNF est altéré par l'alcoolisation prénatale par perturbation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT, déclenchant une neuroapoptose [Climent et coll., 2002]. Il a également été démontré depuis longtemps que l'alcool module le niveau des facteurs de croissance impliqués dans le cycle cellulaire et provoque l'inhibition des cyclines et des kinases cycline-dépendante (Cdk) responsable d'une diminution du nombre de cellules en prolifération [Luo et Miller, 1998].

L'effet délétère de l'alcoolisation prénatale sur la migration neuronale est non seulement lié à une apoptose précoce des progéniteurs dans les zones germinatives et à un défaut d'établissement de la glie radiaire mais aussi à la dérégulation de molécules de signalisation qui contrôlent les interactions entre neuroblastes et glie radiaire. Parmi les molécules d'adhésion cellulaire, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et L1CAM (L1 cell adhesion Molecule) ont un rôle majeur au cours du développement. Des anomalies du profil d'expression de NCAM qui est normalement exprimée à la surface des neurones et des cellules gliales et qui contribue à la formation et à la plasticité des synapses induisent des anomalies de la migration neuronale et de la synaptogénèse [Muller et coll., 2010]. L'éthanol inhibe les fonctions de L1 en se fixant sur son site de liaison situé dans le domaine extracellulaire et par déphosphorylation de plusieurs sites situés dans le domaine intracellulaire de L1, molécule impliquée dans la croissance, le guidage et la fasciculation des axones ainsi que dans la reconnaissance de la ligne médiane par ceux-ci, responsable d'un défaut de développement du corps calleux et de la voie corticospinale [Dou et coll., 2018].

La sécrétion des neurotransmetteurs et l'expression de leurs récepteurs sont affectées par l'éthanol. Les récepteurs au glutamate NMDA sont des canaux ionotropes qui

interviennent dans la migration, la différenciation et la survie neuronales ainsi que dans la synaptogénèse et les phénomènes de plasticité synaptique à long terme. L'éthanol induit un blocage de la liaison du récepteur NMDA à son ligand, de l'expression de ses sous-unités, ainsi que de sa fonction. Ces anomalies sont à l'origine d'une dérégulation des influx calciques, ce qui provoque un stress oxydatif, entraînant une mort neuronale ce d'autant que les récepteurs GABA_A sont suractivés [Ikonomidou et coll., 2000 ; Olney et coll., 2000].

Il a été montré récemment chez le rongeur qu'une alcoolisation prénatale entraîne une migration aberrante des neurones GABAergiques, et par technique de patch-clamp que la transmission GABAergique spontanée et évoquée était stimulée, induisant une dérégulation de la balance excitation/inhibition en faveur de l'inhibition alors que le rôle excitateur du GABA est nécessaire lors de la maturation cérébrale [Skorput et coll., 2015]. Au cours de la formation de la plaque corticale, le réseau vasculaire sert de support à la migration des neurones GABAergiques et la mise en place du réseau vasculaire cérébral est perturbée par l'éthanol [Jégou et coll., 2012]. Ces données suggèrent qu'outre un effet direct sur les récepteurs au glutamate et au GABA, l'éthanol agit indirectement sur la migration des cellules qui synthétisent ces deux neurotransmetteurs.

III-5-3- Ethanol et modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont définies comme des altérations stables, potentiellement réversibles mais pouvant être transmises sur plusieurs générations sans que les séquences d'ADN ne soient modifiées. Elles sont la résultante d'altérations de la structure tridimensionnelle de la chromatine qui modifie l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. La régulation de l'expression génique est contrôlée d'une part par les processus de méthylation de l'ADN, d'autre part par l'acétylation, la méthylation-acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation des histones H2 H3 et H4 [Minarovits et coll., 2016 ; Ehrhart et coll., 2019]. Un troisième mécanisme de régulation est médié par les ARNs non codants (ncARN) qui sont exprimés à des taux élevés dans le SNC. Rappelons que ces modifications épigénétiques peuvent être influencées par des facteurs environnementaux, notamment par l'éthanol et que ces trois mécanismes interviennent selon un gradient temporo-spatial défini au cours de la spécification neuronale des cellules souches neurales, de leur différenciation puis de leur maturation, comme représenté sur le schéma ci-dessous :

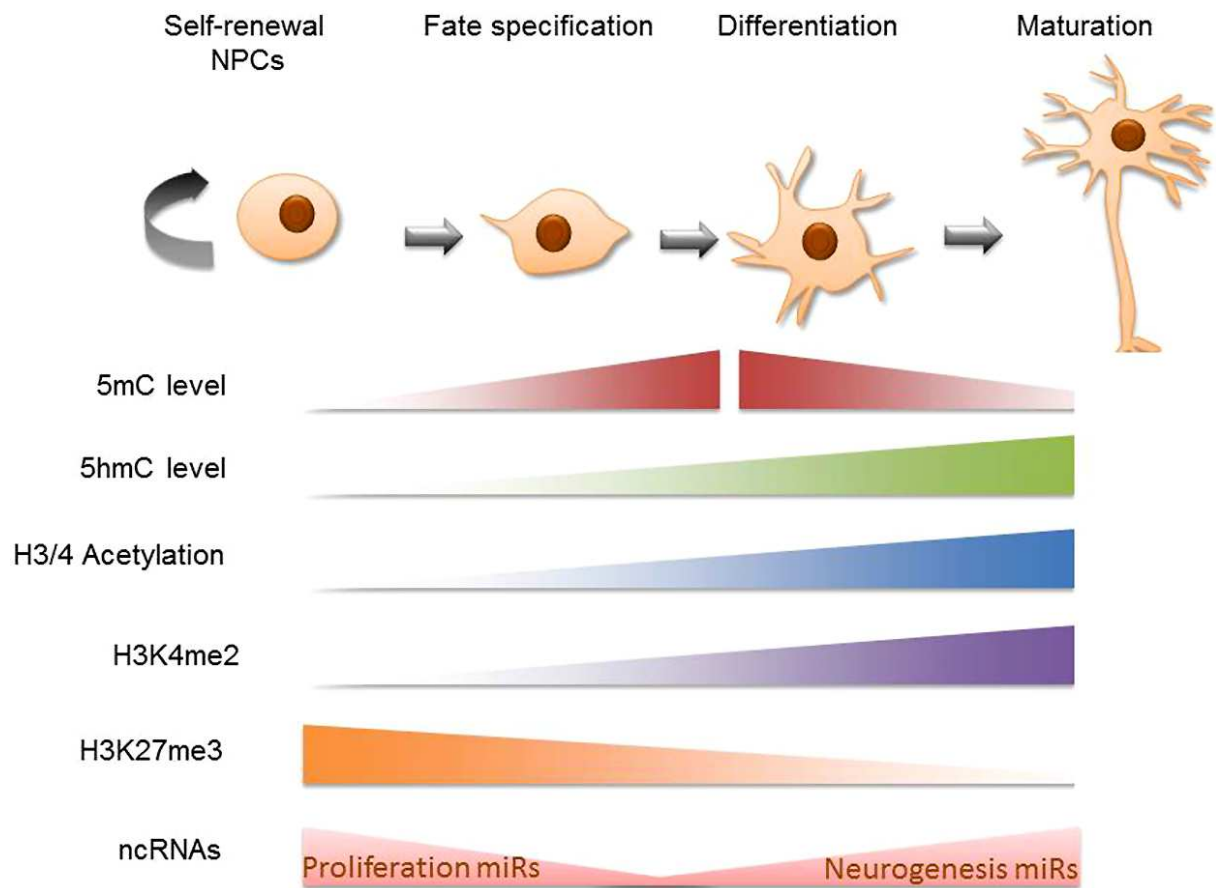


Figure 41 : Diagramme schématisique du programme épigénétique au cours de la neurogénèse [d'après Resendiz et coll., 2014].

Les cellules souches s'enrichissent en 5-méthyle-cytosine, puis en 5-hydroxyméthylcytosine au cours de la différenciation et la maturation neuronale, conjointement à l'acétylation des histones H3 et H4. Les ncARNs sont élevés dans les cellules souches, diminuent lors de la spécification neuronale et réaugmentent lors de l'acquisition du phénotype de neurones matures [Resendiz et coll., 2014].

III-5-3-1- Ethanol et méthylation de L'ADN

Les premières études réalisées sur des embryons de souris exposés à l'alcool entre E9 et E11 permirent de démontrer que l'alcool induisait une baisse des niveaux de méthylation de l'ADN et qu'une exposition tout au long de la gestation entraînait un retard de méthylation dans les progéniteurs neuronaux du cortex préfrontal et de l'hippocampe, retard partiellement corrigé par l'administration un donneur de méthyle, la choline [Otero et coll., 2012 ; Perkins

et coll., 2013]. Sur des cellules en culture, il a été démontré que, plutôt qu'une déméthylation globale, certaines régions spécifiques sont plus méthylées et d'autres moins, suggérant que certaines régions ont une sensibilité différente vis-à-vis de l'alcool. Dans une étude récente, Portales Casamar et coll. ont identifié plus de 650 gènes différentiellement méthylés dans les cellules de l'épithélium buccal chez 110 enfants porteurs d'un FADS, dont 95 gènes contenant des régions comportant plus de 2 îlots CpG, gènes dont l'ARNm est normalement fortement exprimé dans le cerveau, dont certains sont soumis à empreinte et d'autres appartiennent à la famille des protocadhérines [Portales Casamar et coll., 2016]. Chez le rat, l'éthanol altère l'expression de gènes impliqués dans la transmission glutamatergique au niveau l'hippocampe, à l'origine de déficits d'apprentissage et de reconnaissance spatiale [Zink et coll., 2011]. Une déméthylation du gène *GFAP* provoque un retard de l'expression de la GFAP astrocytaire au cours du développement [Vallés et coll., 1996]. L'alcool interagit également avec le PDGFR- α et ses effecteurs (voie PI3K- mTOR), et l'on sait aussi que les polymorphismes du gène *PDGFRA* régulent la sensibilité de L1 à l'alcool [Dou et coll., 2018].

III-5-3-2- Ethanol et histones

La modulation de l'expression des gènes induite par les changements conformationnels de la chromatine consécutifs aux modifications des histones ont été moins étudiées. Des études pan-génomiques chez le rongeur exposé à l'alcool ont permis d'identifier des différences notables de l'expression des histones et d'enzymes modulatrices de l'expression de ceux-ci par rapport à des animaux témoins. Plusieurs études réalisées chez le rongeur exposé à l'alcool pendant une période équivalente aux deux derniers trimestres de la grossesse chez l'humain font état d'une diminution des niveaux de méthylation et d'acétylation des histones H3 et H4, avec une répression chromatiniennne persistante dans le cerveau adulte en cas d'exposition tout au long de la gestation. D'autres études ont permis de corréler les modifications des histones à une augmentation des phénomènes de neuroapoptose et de neurodégénération [Goldowitz et coll., 2014 ; Subbanna et coll., 2015], et de montrer que les perturbations des niveaux de méthylation et d'acétylation engendraient une altération des promoteurs de gènes impliqués dans le « patterning » neuronal [Veazay et coll., 2015].

III-5-3-3- Ethanol et ncARNs

Que ce soit in vitro ou à partir de modèles murins, il a été démontré que l'exposition à l'éthanol induisait une neuroapoptose par altération de l'expression des ncARNs, notamment par suppression du miR9, un régulateur clé de la neurogénèse et des miR-29a et b [Sathyan et coll., 2007]. Une exposition à l'alcool chez l'embryon de souris induit une up-régulation du miR-10, qui régule *Hoxa1*, un gène essentiel au cours du développement embryonnaire [Balaraman et coll., 2016]. Des altérations du niveau d'expression de multiples autres miRs ont été identifiées et sont représentées sur le tableau suivant :

Level	Exposure paradigm			Model			Effects			Ref.	
	Treatment	Time	Time	Species	Tissue	Culture	Age	Sex	Dir.		Target (miR-)
A	320 mg/dl	5 days	GD 12.5	Mouse	Cerebral cortical NPC	Y	NA	ND	↓	9, 21, 153, 335	[117]
L to A	2.0, 4.0 or 6.0 g/kg (2x at 0 and 2 h)	Gavage	GD 6–15	Mouse	Fetal brain	N	GD 17.5	ND	↑ ↓	9, 10a, 10b, 30a-3p, 145, 152 29c, 30e-5p, 154, 200a, 296, 339, 362, 496	[118]
A	1 or 1.5% ethanol	NA	4–24 hpf	Zebrafish	Embryo	N	24 hpf	ND	↑ ↓	30d, 153a, 183, 736 23a	[119]
A	320 mg/dl	5 days	GD 12.5	Mouse	Cerebral cortical NPC	Y	NA	ND	↓	9, 21, 153, 335, 140–3p	[22]
A	2.5 g/kg (2x at 0 and 2 h)	Subcut. injection	PN 4, 7	Mouse	Whole brain	N	PN 60	Male	↑	26b	[120]
A	430 mM	NA	3.5–7.5 hpf	Zebrafish	Embryo	N	24, 48, 72 hpf	Male/ female	↑ ↓	pre-9–3 (precursor to 9) g	[121]
M	10% v/v ethanol	Free drinking	GD 1 PN 10	Mouse	Whole brain	N	PN 70	Male	↑	679–5p	[73]
A	400 mg/dl	24 or 48 h	PN 7	Mouse	Cerebellar granule neurons	Y	PN 7	ND	↑ ↓	34a, 181a 9, 29a, 29b, 133	[125]
A	2.5 g/kg (2x at 0 and 2 h)	Subcut injection	GD 14, 16	Mouse	Whole brain	N	PN 70	Male	↑	302c	[122]
A	2.9 g/kg at 0 h 1.45 g/kg at 2 h	IP injection	GD 12	Rat	Amygdala and ventral striatum	N	PN 42	Male/ female	↑ ↓	34c, 155, 542–1, let-7c-1, let7c-2–3p 9a-2, 29c-3p, 191–1, 138–2, 221–5p, 322–2, 384–5p, 412–3p, 496, 874–5p 1843a-3p	[123]
A	1.75 g/kg (1 h/day x 3 days/week)	Intravenous catheter	GD 4–132	Sheep	Plasma	N	GD 147	Male/ female	↑ ↓	34b 9, 15b, 17–92, 572, 720	[124]
M	10% v/v ethanol	Free drinking	GD 0.5–8.5	Mouse	Hippocampus	N	PN 87	Male	↑	135a, 135b, 467b-5p, 487b	[69]
Heavily prenatally exposed and affected children				Human	Maternal plasma	N	NA	Female	↑	187–5p, 204–5p, 222–5p, 299–3p, 449, 491–3p, 518f-3p, 519a-3p, 671–5-. 760, 885–3p	[129]

A: Acute; GD: Gestational day; L: Low; Hpf: hours past fertilization; IP: Intraperitoneal; M: Moderate; NA: Not applicable; ND: Not disclosed; NPC: Neural progenitor cell; PN: Postnatal day.

Tableau 3 : Altérations de l'expression de divers miRs en fonction du modèle animal, du mode et de la durée d'exposition à l'éthanol, et du tissu analysé [d'après Lussier et coll., 2017].

D'après ce tableau, on remarque que certaines altérations des miRs sont identifiées dans le plasma maternel, et pourraient être utilisées seules ou conjointement à d'autres critères, comme biomarqueurs en cas de FADS de diagnostic incertain, et comme facteurs prédictifs de sévérité chez les enfants porteurs d'un FADS [Balaraman et coll., 2016].

SITUATION DU SUJET

Une thématique majeure du laboratoire Inserm U1245 – Equipe 4 – « Team Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental disorders » coordonnée par le Dr Bruno Gonzales concerne l'étude des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les handicaps souvent sévères, à court et long terme présentés par les enfants ayant été exposés à une alcoolisation maternelle au cours de la grossesse. La consommation d'alcool au cours de la grossesse constitue la première cause de handicap et notamment de retard mental d'origine non génétique, avec une prévalence estimée à 1-3/1000 naissances vivantes d'après le rapport national Inserm 2014. S'il est possible pour le clinicien d'établir un diagnostic périnatal d'un enfant atteint de la forme la plus sévère, le SAF, la majorité des enfants atteints de troubles cognitifs et comportementaux liés à l'alcoolisation fœtale (TCAF) échappe à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes. Ce programme de recherche appelé AlcoBrain a vu le jour en 2007, en émettant l'hypothèse initiale que la dissection des mécanismes physiopathologiques permettrait d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'alcoolisation fœtale afin de dépister précocement les enfants et de démontrer que ces biomarqueurs pourraient être le reflet d'une atteinte cérébrale. Ainsi, un dépistage néonatal des TCAF devrait permettre une prise en charge adaptée, à une période où l'établissement de la plasticité cérébrale est maximal. Le programme AlcoBrain est basé sur la démonstration d'un axe fonctionnel « Placenta-Cerveau » et, en particulier sur une corrélation entre la dérégulation de facteurs angiogéniques placentaires et une dysfonction neurovasculaire cérébrale. Dans un premier temps, les études réalisées chez l'animal puis chez l'homme ont permis de démontrer qu'une alcoolisation prénatale induit une désorganisation du réseau vasculaire intra-cortical, avec une diminution significative du nombre de vaisseaux d'orientation radiaire au profit du nombre de microvaisseaux possédant une orientation aléatoire [Jégou et coll., 2012].

Au cours de la vie fœtale, les facteurs capables de stimuler l'angiogenèse cérébrale sont faiblement exprimés par le cerveau, laissant supposer que les sources de facteurs pro-angiogéniques de la famille du VEGF/PLGF pourraient être d'origine placentaire, ce d'autant que le PlGF (Placental Growth Factor) est exclusivement exprimé par cet organe. Cette seconde étude, également menée chez l'animal et chez l'homme, a permis de démontrer que l'alcoolisation fœtale induit une stagnation voire une baisse de la densité vasculaire placentaire et qu'il existe dans le placenta humain comme dans le cortex cérébral, des anomalies vasculaires chez les sujets ayant été exposés à l'alcool, avec une corrélation très

significative entre l'intensité des altérations vasculaires placentaires et cérébrales [Lecuyer et coll., 2017].

Au cours du développement, l'angiogénèse cérébrale est concomitante de la neurogénèse, et des études récentes ont révélé qu'il existe une interaction spécifique entre endothélium et migration des interneurons GABAergiques d'une part et migration des précurseurs d'oligodendrocytes d'autre part. Par ailleurs, des interactions étroites entre cellules pyramidales glutamatergiques et interneurons GABAergiques en migration sont nécessaires pour permettre le positionnement correct des interneurons dans le cortex, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ne sont pas encore parfaitement connus. En utilisant des approches fonctionnelles et de perte de fonction sur des modèles murins, un travail récent de l'Equipe a permis de démontrer que le glutamate stimule l'activité des protéases endothéliales MMP-9 (métalloprotéinase-9 matricielle) et t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) pour permettre aux néovaisseaux issus du plexus vasculaire méningé superficiel de pénétrer la plaque corticale [Léger et coll., 2020a]. Dans ce travail, il a été montré également que l'activation de la MMP-9 est récepteur NMDA-dépendante et que le glutamate stimule la migration des interneurons GABAergiques le long des vaisseaux après liaison à son récepteur. L'administration *in vivo* d'un inhibiteur des MMPs chez la souris altère le positionnement des interneurons GABAergiques dans les couches corticales superficielles. Ces résultats laissent à penser que le glutamate contrôle la migration des interneurons GABAergiques en régulant l'activité des protéases endothéliales.

A la lumière des résultats précédents, et en partant de l'hypothèse qu'un dysfonctionnement vasculaire induit par l'alcool peut contribuer aux anomalies neurodéveloppementales du FAS, Léger et coll. ont étudié les effets de l'alcool sur l'activité endothéliale des microvaisseaux méningés et intracorticaux [Léger et coll., 2020b]. D'après les résultats obtenus, l'alcool interagit via la voie vasculaire endothéliale NMDA/tPA/ MMP-9 et provoque une anomalie de positionnement des interneurons dans le cortex murin par un mécanisme faisant intervenir le récepteur NMDA. Cette étude apporte la première preuve mécanistique et fonctionnelle que l'alcool altère l'activité endothéliale régulée par le glutamate. En comparant plusieurs cerveaux fœtaux humains témoins avec un cerveau humain fœtal exposé de façon chronique à l'alcool, on constate un défaut de positionnement laminaire des interneurons calrétinergiques dans le cerveau alcoolisé, leur densité étant diminuée dans les couches corticales superficielles II-III et augmentée dans les couches profondes.

La très grande majorité des études scientifiques portant sur l'alcoolisation fœtale s'appuie sur des modèles murins et des études in vitro. Au vu des travaux antérieurement effectués au sein de l'Equipe sur l'alcoolisation fœtale et le système GABAergique ciblant les anomalies de la migration vasculaire des interneurons, il nous est apparu nécessaire de confirmer les données obtenues chez la souris par une étude rétrospective à partir d'une cohorte de fœtus et enfants. Le premier axe de travail a donc été d'étudier l'ontogenèse des interneurons GABAergiques au cours du développement normal et chez des sujets exposés à une alcoolisation anténatale, ce d'autant qu'aucune publication n'existe à ce jour. Nous avons étudié la production des interneurons GABAergiques dans les zones germinatives, leur densité ainsi que leur répartition dans le cortex cérébral. Nous avons tenté de préciser si les éventuelles anomalies de positionnement des interneurons GABAergiques dans le cortex sont liées à leur incapacité à migrer le long des vaisseaux intra-corticaux.

Sachant que les enfants atteints d'un FADS présentent non seulement des troubles cognitifs et comportementaux, mais aussi des anomalies structurales cérébrales, il nous est apparu intéressant d'étudier le développement de la lignée oligodendrogliale. En effet, les conséquences de l'exposition prénatale à l'alcool sur les cellules gliales n'ont fait l'objet que de quelques publications, et seraient liées à une baisse de la survie neuronale responsable d'anomalies de la cytoarchitecture cérébrale et de connectivité [Wilhelm et Guizzetti, 2016]. Chez l'humain, les seules données disponibles sur la myélinisation sont des données d'imagerie et concernent l'enfant. Quelques études de tractographie en IRM ont permis de détecter des anomalies microstructurales de la substance blanche pouvant être à l'origine de défauts de connexion entre faisceaux et structures de relais comme les noyaux gris centraux par exemple. Il a été mis en évidence des différences significatives par rapport à des sujets contrôles dans plusieurs zones du cerveau : genou et splénium du corps calleux, cortex limbique, faisceau corticospinal, faisceau fronto-occipital inférieur, faisceaux longitudinaux inférieurs (reliant le lobe occipital au lobe temporal antérieur) et supérieurs (reliant le lobe frontal au lobe pariétal), globus pallidus, putamen et thalamus. Une réduction de volume de la substance blanche a également été constatée dans le groupe FADS [Lebel et coll., 2008]. Le deuxième axe d'étude a donc porté sur le développement de la lignée oligodendrogliale afin de savoir si les anomalies constatées après la naissance résultent d'une anomalie de génération et/ou maturation des oligodendrocytes, ou si les anomalies microstructurales de la substance

blanche constatées chez l'enfant sont dues à d'autres mécanismes. Nous avons réalisé cette seconde étude en comparant la même série de cerveaux FAS humains avec les mêmes cerveaux normaux appariés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I- Patients

Les cerveaux utilisés dans nos deux études proviennent de la collection déclarée au ministère de la Santé Publique et des Solidarités (collection n°DC-2015-2468, cession n°AC-2015-2467) située dans le Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Rouen. Dans tous les cas, les parents avaient donné leur consentement pour réaliser des études neuropathologiques après la vérification anatomique effectuée avec l'accord du comité d'Ethique local conformément aux dispositions réglementaires françaises.

I-1- Groupe contrôle

Dix-sept cerveaux fœtaux et post-nataux contrôles appariés selon l'âge aux cerveaux de fœtus /enfants exposés à l'alcool pendant la grossesse et s'échelonnant sur une période de 14 SA à 3 ans ont été sélectionnés. Leurs principales caractéristiques cliniques et morphologiques sont présentées dans le tableau 4. Dans sept cas, une interruption médicale de grossesse avait été effectuée en raison de la découverte de pathologies ou de malformations autres que cérébrales. Dans deux cas, il s'agissait d'une mort fœtale in utero (MFIU) et dans six cas d'un décès *per-partum* pour lesquels aucune cause n'avait pu être identifiée malgré un examen autopsique exhaustif. De même, chez les deux enfants âgés de 6 mois et 3 ans décédés subitement, aucune pathologie n'avait été retrouvée et il n'avait été retenu qu'un facteur de risque, un couchage en décubitus ventral dans le premier cas et un choc anaphylactique dans le second. Dans tous les cas sélectionnés, le cerveau était macroscopiquement et histologiquement indemne de toute anomalie, en dépit de la multiplicité des prélèvements. Les fœtus interrompus chez lesquels une anomalie du système nerveux central avait été suspectée en imagerie au cours de la grossesse, ou les enfants chez lesquels avait été suspecté un décès de cause neurologique par les cliniciens ont été systématiquement exclus de l'étude.

I-2- Groupe FADS

Dix-sept cerveaux fœtaux et post-nataux s'échelonnant de 15 SA à 2 ans et chez lesquels un FASD avait été diagnostiqué ou suspecté ont été également inclus dans l'étude. Les caractéristiques cliniques et morphologiques de ces cas sont résumées dans le tableau 5.

Parmi les causes de décès, une MFIU concernait cinq fœtus, une IMG pour malformations fœtales avait été réalisée dans huit cas. Deux fœtus étaient décédés en *per -partum* et les deux cas post-nataux étaient décédés d'une MSIN. Parmi ces dix-sept cas, un RCIU a été objectivé chez trois d'entre eux (18%). Dans quinze cas (88%) une dysmorphie crânio-faciale a été retrouvée, qu'elle soit évocatrice ou caractéristique d'un FAS (47%). Les lésions neuropathologiques consistaient en une microcéphalie dans 29% des cas, définie par un poids du cerveau <3^{ème} percentile. Des anomalies du SNC autres ou associées à la microcéphalie ont été identifiées dans la moitié des cas : myéломéningocèle avec malformation d'Arnold-Chiari de type II, arhinencéphalie, anomalies migratoires consistant soit en des hétérotopies neuronales soit en une micropolygyrie en foyers. Des lésions de type clastique étaient identifiées dans cinq cas : hémorragie cérébelleuse massive, nécrose hémisphérique cérébelleuse, hémorragie intraventriculaire bilatérale, agénésie septale et gliose diffuse de la substance blanche. Dans 41% des cas, des anomalies viscérales associées ont été confirmées: coelosomie antérieure, hydronéphrose, dilation pyélique ou pyélocalicielle unilatérale, tétralogie de Fallot et brides amniotiques. Enfin, dans 59% des cas, une alcoolisation au cours de la grossesse avait été reconnue par la mère. Il s'agissait d'un alcoolisme chronique quotidien associé à un binge drinking dans trois cas (18%), à une consommation de drogues illicites dans 59% des cas et de médicaments dans 18% des cas.

II- Méthodes

II-1- Caractéristiques morphologiques de la cohorte

Dans les deux groupes de patients, une autopsie complète a été réalisée avec le consentement écrit des deux parents selon des protocoles standardisés incluant des radiographies, des photographies, un examen macroscopique et microscopique de l'ensemble de viscères et de l'encéphale. L'âge réel a été évalué en fonction du poids des organes selon les abaques de Guihard-Costa et coll. [Guihard-Costa et coll., 2002], des données biométriques squelettiques et du stade de maturation histologique des différents viscères. La croissance cérébrale a été évaluée selon les abaques de Guihard-Costa et Larroche [Guihard-Costa et Larroche, 1990] et l'évaluation macroscopique de la maturation cérébrale notamment la gyration a été réalisée selon les données de l'atlas Feess-Higgins and Larroche [Feess-Higgins et Larroche, 1987]. Après fixation dans une solution de formol-zinc à 10% pendant

un à deux mois, de multiples prélèvements cérébraux ont été réalisés sur les lobes frontaux, temporaux, pariétaux, et occipitaux, les structures limbiques, le thalamus, le striatum, le pallidum et ses structures associées (noyaux magnocellulaires de la base). Des coupes à 7µm ont été réalisées à partir de blocs paraffinés et colorées par l'hématoxyline-éosine et le Crésyl Violet, ce qui a permis de confirmer l'absence de lésions cérébrales dans le groupe contrôle. La morphologie des différentes structures cérébrales étudiées était en accord avec l'âge des patients.

II-2- Etudes immunohistochimiques

Les études immunohistochimiques du système GABAergique ont été réalisées sur des coupes paraffinées de 6µm d'épaisseur selon des protocoles standardisés. Les anticorps utilisés ont été : un anticorps anti-GABA (polyclonal de lapin, dilué au 1/100; Thermofisher Scientific, F67403 Illkirch Cedex, France), anti-calrétinine (monoclonal de lapin, 1/100; Life Technology Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), Glut1 (polyclonal de lapin, 1/100; Dakopatts, Trappes, France), anti-PDGFR- α (polyclonal de lapin, 1/100 ; Thermofisher Scientific); anti-Olig2 (polyclonal de lapin, 1/200 ; Clinisciences, Nanterre, France) et Ki67 (monoclonal de souris, 1/100; Agilent, les Ulis, France). Afin d'exposer les sites antigéniques, un prétraitement au micro-ondes a été effectué à l'aide du kit CC1 (Ventana Medical Systems Inc, Tucson AZ). Les incubations avec le 1^{er} anticorps ont été effectuées pendant 32 min à température ambiante à l'aide de l'incubateur Ventana Benchmark XT. Les immunomarquages ont été révélés à l'aide du kit de détection Ultraview Universal DAB (Ventana). Une évaluation semi-quantitative du pourcentage de cellules immunoréactives vis-à-vis de l'anticorps anti-GABA et anti-calrétinine d'une part, PDGFR- α et Olig2 d' autre part, a été effectuée au niveau de la VZ, la SVZ du télencéphale dorsal et des GE et dans les différentes couches du cortex frontal. Cette densité a été évaluée comme suit :

- 0 : absence d'immunomarquage ;
- + : <10% de cellules marquées ;
- ++ : 10 à 25% de cellules marquées ;
- +++ : 25 à 50% de cellules marquées ;
- ++++ : plus de 50% de cellules marquées.

II-3- Analyse quantitative du nombre et de la densité d'interneurones GABAergiques dans le cortex frontal

Les images ont été acquises et enregistrées en format Tiff à l'aide d'un microscope Leica DMI 6000B. Elles ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Mercator et les régions d'intérêt (ROIs) ont été dessinées. Dans chaque ROI, une trame de comptage a été utilisée et un seuil a été établi afin de différencier les cellules immunoréactives du bruit de fond. En utilisant un outil de segmentation, le nombre et l'aire cumulée des objets ont été calculés, permettant d'obtenir le nombre de cellules et leur densité.

II-4- Analyse de la migration vasculaire dans la plaque corticale par microscopie confocale

Des doubles immunomarquages ont été réalisés à l'aide de l'anticorps anti-GABA ou anti-calrétinine et d'un anticorps anti-GLUT1. Des anticorps fluorescents conjugués Alexafluor-488 et -592 ont été utilisés (Molecular Probes, Eurogene, Or, USA). Après trois rinçages en PBS, les lamelles ont été montées dans un milieu contenant du DAPI (Vectashield ; Vector laboratories, Cambridgeshire, UK). Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal laser TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Tableau 4 : Age gestationnel ou âge post-natal et causes du décès des cas contrôles

Cas	Terme	Maturation cérébrale*	IMG	Cause du décès
1	15 SA	14 SA	Oui	Canal atrio-ventriculaire
2	16 SA	16 SA	Oui	Myéломéningocèle isolée
3	22 SA	20 SA	Non	MFIU
4	22 SA	22 SA	Oui	Uropathie obstructive
5	24 SA	24 SA	Non	MFIU
6	26 SA	26 SA	Oui	Microphthalmie bilatérale héréditaire
7	28 SA	28 SA	Oui	Arthrogrypose distale sévère
8	30 SA	30 SA	Non	Décès par procidence du cordon
9	32 SA	32 SA	Oui	Malformation cardiaque complexe
10	34 SA	34 SA	Oui	Suspicion d 'hypoplasie vermienne non confirmée
11	35 SA	35 SA	Non	Anasarque non immune Décès en <i>per-partum</i>
12	36 SA	36 WG	Non	Agénésie rénale bilatérale Tétralogie de Fallot Décès en <i>post-partum</i> immédiat
13	36 SA	36 SA	Non	Cardiomyopathie dilatée Décès à J2
14	37 SA	37 SA	Non	Grossesse normale Décès en <i>post-partum</i> malgré la réanimation Absence de lésions foeto-placentaires
15	39 SA	39 SA	Non	Mort en <i>per-partum</i>
16	A terme	3 mois	Non	Rupture d'un vaisseau placentaire <i>praevia</i> Pas de lésions à l'autopsie
17	A terme	3 ans	Non	Choc anaphylactique

IMG: Interruption médicale de grossesse; MFIU: Mort foetale *in utero*; SA: Semaines d'aménorrhée

* selon les critères morphométriques de Guihard-Costa and Larroche

Tableau 5 : Principales caractéristiques cliniques et morphologiques des foetus et enfants exposés à une alcoolisation maternelle au cours de la grossesse

Cas	Age (SA)	Cause du décès	Poids du corps	Dysmorphie crânio-faciale	Poids du cerveau	Anomalies viscérales	Anomalies cérébrales	Consommation maternelle	Co-morbidités maternelles
1	16	IMG	25 ^{ème} percentile	Philtrum peu visible Oreilles bas implantées Microrétrognathisme	50 ^{ème} percentile 15.8 g	Coelosomie antérieure	Non	Chronique*	Héroïne Méthadone
2	20	IMG Déresse maternelle	10 ^{ème} percentile	Hypoplasie malaire Nez court Faciès plat	25 ^{ème} percentile 39.34 g	Non	Non	Chronique et Binge drinking*	HIV, Hépatite C Multi-drug addiction
3	22	IMG Malformation De Chiari	<3 ^{ème} percentile RCIU	DFC FAS	<<3 ^{ème} percentile 45.65g	Hydro-néphrose	Microcéphalie Arnold Chiari II Myéломéningocèle	Chronique **	Psychose Valproate
4	22	IMG Déresse maternelle	3 ^{ème} percentile RCIU	Philtrum peu visible Oreilles bas implantées Microrétrognathisme	50 ^{ème} percentile 63.5 g	Non	Non	Chronique (262 g/j) **	Psychose Valproate psychotropes Augmentation VGM
5	22	IMG Déresse maternelle	50 ^{ème} percentile	Philtrum peu visible Microrétrognathisme	50 ^{ème} percentile 63.21 g	Dilatation pyélo-calicielle unilatérale	Non	Chronique quotidien*	Multi-drug addiction Valproate
6	24	IMG Brides amniotiques	NC	DFC FAS	50 ^{ème} percentile 75g	NC	Micropolygyrie Anomalies migratoires Hypoplasie vermis Nécrose hémisphère cérébelleux	Chronique **	Cocaine
7	24	IMG Agénésie septale	50 th percentile	DFC FAS	50 ^{ème} percentile 100.3g	NC	Arhinencéphalie	Chronique **	Addiction au cannabis

8	26	Fausse couche spontanée	50 ^{ème} percentile	Philtrum peu visible Oreilles bas implantées Microrétrognathisme	50 ^{ème} percentile 133.6 g	Dilatation Pyélique unilatérale	Non		Chronique **	NC
9	27	Prééclampsie Décès à J10	10 ^{ème} percentile	DFC FAS	3 ^{ème} percentile 109 g	Non		Microcéphalie Hémorragie cérébelleuse massive	Chronique **	NC
10	30	MFIU <i>Abruptio placentae</i>	10 ^{ème} percentile	Non	50 ^{ème} percentile 211 g	Non		Hémorragie intra ventriculaire bilatérale	Chronique quotidien*	Addiction au cannabis Hypothyroïdie
11	29	MFIU Cardiopathie	5 ^{ème} percentile	Narines antéversées Nez pointu Anomalies des oreilles Philtrum peu visible Microrétrognathisme	5 ^{ème} percentile 178 g	Tétralogie de Fallot	Non		Chronique quotidien**	Augmentation VGM et GGT
12	31	MFIU Prééclampsie	3 ^{ème} percentile RCIU	Anomalies des oreilles Rétrognathisme	3 ^{ème} percentile 197.05 g	Non	Non		Chronique quotidien*	Augmentation VGM et GGT
13	31	IMG Agénésie septale	50 ^{ème} percentile	DFC FAS	50 ^{ème} percentile 234 g	Non		Agénésie septale	Chronique et Binge drinking*	Cannabis
14	33	MFIU Intoxication alcoolique aiguë (Déresse maternelle)	50 ^{ème} percentile	Non	50 ^{ème} percentile 348.15 g	Inhalation amniotique		Astroglïose diffuse	Chronique et Binge drinking* (4.98 g/L)	Multi-drug addiction Augmentation VGM et GGT Un enfant vivant FAS
15	37	MFIU	25 ^{ème} percentile	Philtrum peu visible Microrétrognathisme	<3 ^{ème} percentile 248 g	Non		Hétérotopies neuronales Microcéphalie	Chronique et Binge drinking**	Addiction à l'héroïne

16	3 MPN	MSIN	5 ^{ème} percentile	DFC FAS	50 ^{ème} percentile 633g	Inhalation lactée	oedème cérébral	chronique *	Addiction cannabis	au
17	22 MPN	MSIN	50 ^{ème} percentile	DFC FAS	NC	Œdème pulmonaire	Non	Chronique quotidien*	NC	

DFC FAS: Dysmorphie crânio-faciale de la séquence d'exposition à l'alcool ; GGT : γ -glutamyl transférase ; IMG : Interruption médicale de grossesse ; MFIU : Mort fœtale *in utero* ; MPN : Mois post-natal ; NC : Non communiqué ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; SA : semaines d'aménorrhée ; VGM : Volume globulaire moyen ; * : consommation d'alcool affirmée par la mère ; ** : consommation d'alcool suspectée cliniquement ou rapportée par l'entourage.

RÉSULTATS

Article 1

Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans

Soumis à *Acta Neuropathologica Communications*, IF : 6.2.

Florent Marguet⁽¹⁾, Mélanie Brosolo⁽²⁾, Fanny Sauvestre⁽³⁾, Pascale Marcorelles⁽⁴⁾, Céline Lesueur⁽²⁾, Stéphane Marret⁽⁵⁾, Bruno J Gonzalez⁽²⁾ and Annie Laquerrière⁽¹⁾.

Affiliations

⁽¹⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Pathology, F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

⁽²⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

⁽³⁾ Department of Pathology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.

⁽⁴⁾ Pathology Laboratory, Pole Pathologie-Biologie, Centre Hospitalier Universitaire Brest, Brest, France; Laboratory of Neurosciences of Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Brest University, Brest, France.

⁽⁵⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

Key words: Gabaergic system defects; human foetal/neonatal brain; foetal alcohol syndrome; immunohistochemistry; vascular interneuron migration

Running title: Foetal Alcohol Syndrome and interneuronopathy

Abstract

Alcohol affects multiple neurotransmitter systems, notably the GABAergic system and has been recognised for a long time as particularly damaging during critical stages of brain development. Nevertheless, data from the literature are most often derived from animal or *in vitro* models. In order to study the production, migration and cortical density disturbances of GABAergic interneurons upon prenatal alcohol exposure, we performed immunohistochemical studies by means of the proliferation marker Ki67, GABA and calretinin antibodies in the frontal cortical plate of 17 foetal and infant brains antenatally exposed to alcohol, aged 15 weeks of gestation to 22 postnatal months and in the ganglionic eminences and the subventricular zone of the dorsal telencephalon until their regression, i.e., 34 weeks' gestation. Results were compared with those obtained in 17 control brains aged 14 weeks of gestation to 35 postnatal months. We also focused on interneuron vascular migration along the cortical microvessels by confocal microscopy with double immunolabellings using Glut1, GABA and calretinin. Semi-quantitative and quantitative analyses of GABAergic and calretininergic interneuron density allowed us to identify an insufficient and delayed production of GABAergic interneurons in the ganglionic eminences during the two first trimesters of the pregnancy and a delayed incorporation into the laminar structures of the frontal cortex. Moreover, a mispositioning of GABAergic and calretininergic interneurons persisted throughout the foetal life, these cells being located in the deep layers instead of the superficial layers II and III. Moreover, vascular migration of calretininergic interneurons within the cortical plate was impaired, as reflected by low numbers of interneurons observed close to the cortical perforating vessel walls that may in part explain their abnormal intracortical distribution. Our results are globally concordant with those previously obtained

in mouse models, in which alcohol has been shown to induce an interneuronopathy by affecting interneuron density and positioning within the cortical plate, and which could account for the neurological disabilities observed in children with foetal alcohol disorder spectrum.

Introduction

The mammalian neocortex contains two major classes of neurons, projection and local circuit neurons: projection neurons which contain the excitatory neurotransmitter glutamate, and local circuit neurons which are mainly inhibitory and contain the neurotransmitter GABA (γ -aminobutyric acid). GABAergic interneurons (INs) which represent between 25 and 30% of cortical neurons [24, 64] derive from progenitor cells located in the ventricular (VZ) and subventricular zones (SVZ) of the ventral telencephalon including median, lateral and caudal ganglionic eminences (MGE, LGE and CGE), as well as from the preoptic, preoptic-hypothalamic and septal areas. In humans, their origin has been a matter of debate for a long time, and over the last 20 years some authors have reported that contrary to rodents, a proportion of INs in humans could arise from the dorsal telencephalon [22, 30, 42, 67]. But it is now well admitted that the majority of INs in primates including humans originate in the ganglionic eminences (GE) [1, 20, 34]. GABAergic IN specification within the GE is linked to the expression of transcription factors encoded by a set of regulatory genes such as *Dlx1* (Distal less homeobox gene), *Dlx2*, *Ascl1* (Achaete-scute family bHLH transcription factor 1) formerly known as *Mash1*, *Gsx1* and *Gsx2* (Genetic-Screened Homeobox 1 and 2) [32, 59]. The emergence of morphological and functional IN diversity is related to the spatial and temporal specification of progenitor cells according to additional transcriptional programs that are either intrinsically encoded or activated by interactions with the local microenvironment [31]. Two lineages of neocortical GABAergic INs exist. The first expresses *Dlx1/2* transcription factors, and represents 65% of neocortical GABAergic neurons, originating from

Ascl1 expressing progenitors. The second lineage, which expresses *Dlx1/2* but not *Ascl1*, forms around 35% of GABAergic INs [2, 43]. In rodents, *Dlx1/2*, *Nkx2.1*, *Lhx6*, *Lhx7* and *ARX* participate in the control of GABAergic IN production and migration [15].

GABAergic INs arising from the MGE and CGE migrate following tangential migratory routes parallel to the brain surface, then through the marginal zone to enter the cortex at early stages, through the intermediate/subventricular zone and subplate at later stages, and finally migrate radially to their final position in the appropriate cortical layers. Migration has been shown to be regulated by motogenic factors [38], by non-classical microtubule associated proteins [4] and by either chemoattractive or repulsive molecules [35, 36, 37, 61]. During the migration process, INs progressively acquire their characteristic morphology as well as their molecular, biochemical and synaptic properties. IN incorporation into the laminar structures of the cortical plate has been shown to be controlled, at least partly, by pyramidal neurons [66].

More than 20 different types of inhibitory INs have been described in the murine neocortex and hippocampus [56] and are divided into several classes and subclasses according to their morphology, their potential transcriptional similarities and to selective marker expression. Three major classes are recognized depending on parvalbumin, somatostatin and serotonin receptor 3a (*Htr3a*) expression [31]. INs expressing *Htr3a* comprise bipolar INs co-expressing calretinin (CR), as well as single bouquet cells, interstitial or multipolar neurons and basket cells which co-express cholecystikinin, vasointestinal peptide, reelin, or neuropeptide Y [reviewed by 31].

The main functions of GABA-mediated neurotransmission consist in synchronizing neuronal networks by modulating cortical output, controlling neuronal excitability and information processing as well as neuronal plasticity [9]. In the developing rodent brain, this neurotransmitter is excitatory which could be explained by a higher intracellular concentration

in chloride ions at early developmental stages [8]. The switch from excitatory to inhibitory function occurs between the second and seventh postnatal day, equivalent to the 3rd trimester of gestation in humans [7]. In the perinatal human neocortex and hippocampus, this excitatory action could play an important role in controlling several processes including cell proliferation in the germinative zones, post-mitotic neuroblast migration and cell differentiation, and may transiently regulate neuronal growth and dendritic maturation before synaptogenesis [9, 33, 65].

Aberrant development and function of GABAergic systems in humans have been implicated in various pathologies. In the most severe cases, an almost absent development of the GABAergic system causes a particular form of lissencephaly, the XLAG [10]. A failure of GABAergic system inhibitory functions has been implicated in the genesis of epilepsy in focal cortical dysgeneses, GABAergic synapses remaining operative but with a shift from inhibitory to excitatory actions [17]. In preterm infants with white matter injury, in addition to oligodendrocyte loss, axonal disruption and excessive apoptosis, Robinson et al. found a significant decrease of GABAergic neuronal expression, with a loss of GABAergic subplate neurons responsible for cortical deficits [49]. GABA disturbances have also been implicated in a number of autism spectrum disorders of known origin such as Fragile X and Rett syndromes [11], and in the human adult brain, GABAergic containing INs have been shown to be deficient in the frontal and cingular cortices of schizophrenic patients [44].

Recently, Smiley et al. also identified a selective reduction in GABA INs using a murine model of Foetal Alcohol Spectrum disorder (FASD) [55]. *In utero* alcohol exposure has damaging effects on brain development and is responsible for severe neurodevelopmental disabilities leading to long-term behavioural deficits [3, 6]. The most severe end of the spectrum is Foetal Alcohol Syndrome (FAS) which is characterized by intra-uterine and postnatal growth retardation, typical craniofacial dysmorphism, central nervous system (CNS)

structural anomalies as well as behavioural and neurocognitive deficits [25, 48]. For these reasons, most studies have focused on neurons and glial cells to study the mechanisms involved in the deleterious effects of alcohol on brain development [26, 62]. Other studies have reported that *in utero* alcohol exposure affects brain angiogenesis in particular cortical microvessel organization in both mouse and human foetuses [16, 23, 27, 60]. It has also been reported that some nerve cell types, notably GABAergic INs require brain microvessels to properly migrate toward the cortical plate [33, 63].

GABAergic IN production, migration as well as topographical distribution in the brain can be studied using immunohistochemical techniques based on the fact that a substantial proportion of GABAergic INs co-express calcium binding proteins, in particular CR which acts as a buffer for modulating intracellular calcium transients [13]. Thus, the recent advances in understanding the physiopathology of FASD led us to perform a detailed immunohistochemical study using GABA and CR antibodies in the foetal and postnatal human forebrain of FASD and controls, from 14 WG to three years of age, in order to compare the spatio-temporal distribution of GABAergic systems and to confirm vascular migration anomalies previously identified in FASD rodent models.

Patients and methods

Patients

The brains used in this study belong to the collection which has been declared to the French Ministry of Health (collection number DC-2015-2468, cession number AC-2015-2467, located in A. Laquerrière's Pathology Laboratory, Rouen University hospital, France). For all selected cases, the parents gave their consent for neuropathological studies of the foetuses or infants following autopsy performed in agreement with the local ethic committee and in accordance with the French law.

Seventeen foetal and postnatal age-matched control brains ranging from 14 WG to 35 postnatal months were selected for the present study, and whose main clinical and morphological characteristics are presented in Table 1. In 7 out of the 17 cases, a medical termination of the pregnancy (TOP) was achieved for pathologies/malformations other than cerebral. Two out of the 17 cases were *in utero* foetal death (IUFD) with no found cause and 6 out of the 17 cases were perpartum or immediate postpartum death with no found reason or with a cause other than cerebral. The two children aged 3 months and 35 months died of prone position sleep and anaphylactic shock, respectively. In all cases, the brain was macroscopically and microscopically free of detectable abnormalities. Patients who had been suspected of central nervous system anomalies or of dying from neurological causes were systematically excluded.

Seventeen foetal and postnatal FASD brains ranging from 15 WG to 22 postnatal months were also included in this study. Detailed clinical and morphological characteristics are presented in Table 2. Causes of death were IUFD in 6 cases, TOP for foetal malformations in 8 cases, post-natal early death in one case and sudden infant death syndrome in the two post-natal cases.

Methods

In each control and FASD patient, a complete autopsy had been performed with the written consent of the parents and according to standardized protocols including X-rays, photographs, macroscopical and microscopical examination of all viscerae and brain. Developmental age was evaluated by means of organ weights [19, 51], skeletal measurements and by the histological maturational stages of the different viscera.

Neuropathological studies

Brain growth was evaluated according to the criteria of Guihard-Costa and Larroche [18]. Macroscopic evaluation of brain maturation, in particular gyration, was performed according to the atlas of Feess-Higgins and Larroche [14]. After fixation in a zinc-10% formalin buffer solution for at least 1 month, several brain sections were obtained from frontal, temporal, parietal, cingular and occipital cortices including the calcarine fissure, as well as limbic structures, and basal ganglia including thalamus, striatum, pallidum and their related structures. Seven micrometer paraffin embedded sections were stained using Haematoxylin Eosin H&E and Cresyl Violet, which made it possible to confirm the absence of cerebral lesions. The morphology of all different brain structures studied was consistent with the patients' ages.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses of GABAergic systems were carried out on 6-micrometer sections obtained from paraffin-embedded, according to standardized protocols using antisera directed against GABA (Rabbit polyclonal, diluted 1/100; Thermofisher Scientific, F67403 Illkirch Cedex, France); CR (rabbit monoclonal, diluted 1/100; Life Technology Invitrogen, Villebon sur Yvette, France); Glut1 (Rabbit polyclonal, diluted 1/100; Dakopatts, Trappes, France) and Ki67 (mouse monoclonal, diluted 1/100; Dakopatts). Immunohistochemical procedures included a microwave pre-treatment protocol to aid antigen retrieval (pre-treatment CC1 kit, Ventana Medical Systems Inc, Tucson AZ). Incubations were performed for 32 minutes at room temperature using the Ventana Benchmark XT system. After incubation, slides were processed by means of the Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana). Semi-quantitative analysis of GABA and CR INs in the germinal and intermediate zones as well as in the different layers of the frontal cortex was evaluated as

follows: 0: no cell labelled; +: very few cells labelled (less than 10% of cells); ++: some cells labelled (10-25%); +++: a relatively high proportion of cells labelled (25-50%) and ++++: most of the cells of the structure are strongly labelled (>50%).

Quantitative analysis of GABAergic cortical interneuron number and density

Quantitative analyses of GABA were carried out in the frontal cortical plate in 15 cases including 8 FASD aged 26 WG to 3 post-natal months. Quantitative analyses of CR were performed in the same cortical area in 11 cases including 5 FASD aged 20, 24, 30, 33 and 37 WG. For measurements of GABA and/or CR positive cell density in the cortical plate, images were acquired and saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope. Images were subsequently opened in Mercator software and regions of interest (ROIs) were drawn. Afterwards, a counting frame was defined within the ROI and a threshold was set in order to differentiate immunoreactive cells from the background. By a segmentation process, the computer calculated the number and the cumulated area of objects corresponding to immunoreactive cell somata within the ROI, yielding cell number and cell density per $10^4 \mu\text{m}^2$.

Confocal analyses of interneuron migration in the cortical plate

For confocal analyses, double immunolabellings were performed using GABA or CR and Glut1 antibodies in the frontal cortex at early stages from 14 to 20 WG, and at late stages from 33 to 37 WG. Fluorescent-conjugated antibodies Alexafluor-488 and -592 were obtained from Molecular Probes (Eurogene, Or, USA). After 3 gentle washes in a phosphate buffer solution, coverslips were mounted in DAPI-containing Vectashield (Vector laboratories, Cambridgeshire, UK) and images were acquired with the Leica laser scanning confocal microscope TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. Chi square test was used to compare the intrinsic distribution of CR-positive cells in cortical plate between FASD and control brains at 24 and 30 WG.

Results

FAS patients' clinical and morphological characteristics

Among the 17 cases exposed to alcohol, 3 (18%) had intra uterine growth retardation (IUGR). All but 2 cases (88%) had cranio-facial dysmorphism which was characteristic of FAS in 7 of the cases (47%), associating an elongated and narrow forehead, short palpebral fissures, hypo- or hypertelorism and epicanthus, midface hypoplasia, a short nose with a broad nasal bridge and anteverted nostrils, indiscernible nasolabial folds, smooth and prominent philtrum, thin vermillion border and micrognathia. Five cases (29%) had microcephaly (brain weight below the 3rd percentile). In 9 cases (53%) other CNS anomalies were identified: myelomeningocele with Chiari II malformation, arhinencephaly, migration abnormalities consisting either in polymicrogyria or neuronal heterotopias and vermis hypoplasia. Clastic lesions consisted of massive cerebellar haemorrhage, cerebellar hemispheric necrosis, bilateral intraventricular haemorrhage, septal agenesis, diffuse astrogliosis and brain oedema. Five cases (29%) had associated visceral malformations: anterior coelosomia, renal hydronephrosis, unilateral pelvic dilatation and tetralogy of Fallot. Amniotic fluid inhalation and isolated pulmonary oedema were diagnosed in 2 cases.

In 10 cases, alcohol intake was self-reported by the mother (59%), consisting in daily chronic alcohol intake, associated with binge drinking in 3 cases. In the other 7 cases (41%), maternal alcohol intake was clinically suspected according to the criteria established by Riley

et al. or reported by the family environment [48]. Twelve mothers (71%) had co-morbidities consisting of multidrug addiction or antiepileptic drugs or psychotic traits. Among the 7 cases in which alcohol intake was suspected, 1 case had FAS craniofacial dysmorphism, IUGR and microcephaly with additional CNS anomalies; 1 case had FAS cranio-facial dysmorphism and microcephaly and 1 case had cranio-facial dysmorphism resembling the FAS dysmorphism associated with IUGR. Among these 7 cases, 2 had CNS anomalies with FAS craniofacial dysmorphism; 1 of which had craniofacial dysmorphism resembling the FAS (maternal alcohol intake reported by close relatives). One case had FAS craniofacial dysmorphism, microcephaly and CNS anomalies and 1 case had microcephaly with CNS anomalies and craniofacial dysmorphism reminiscent of FAS, although not characteristic.

Semi-quantitative and quantitative analyses of GABA, Calretinin and Ki67 immunohistochemistry

Semi-quantitative analyses concerning the developmental patterns of GABA and CR immunoreactivities in the GE, cortical VZ/SVZ and frontal cortical plate of FASD and controls are detailed in supplementary Tables 1 and 2 and summarized in Fig.1. Detailed results obtained from quantitative analyses are presented in supplementary material 1 and 2.

GABA immunohistochemistry

During the early foetal period (14-16 WG), cortical GABAergic IN density was only slightly diminished in FASD in comparison with control cortical plates through which they were migrating along the perforating cortical microvessels from the transient subpial granular cell layer (SGL) (Fig. 2a and 2b). However, GABA-immunoreactive INs were drastically reduced in the cortical VZ/SVZ (Fig. 2c and 2d) and the GE of FASD (Fig. 2e and 2f), reflecting a delayed migration toward the cortical SVZ from the GE where they appeared to

be insufficiently generated. At mid-gestation (20, 22 and 24 WG), a developmental stage in which there is normally a large production of cortical interneurons, very few GABA-immunoreactive INs were observed, dispersed in the cortical plate (Fig. 2g and 2h), in the cortical SVZ (Fig. 2i and 2j), as well as in the GE (Fig. 2k and 2l), thus confirming our observations at earlier stages in FASD brains. Moreover, similar abnormalities were noted in the 3 FASD brains aged 22 WG, and in the 2 FASD brains aged 24 WG. The low density of GABAergic INs was correlated with very low Ki67 proliferation indices in the GE in comparison with control brains (Fig. 2m-2r), confirming a defect in the generation of neurons at these stages. As projection neuron production in the cortical VZ/SVZ ceases from 26 WG and there is no more enrichment in glutamatergic neurons in the cortex, GABAergic IN density tended to be similar to that observed in control brains, without any overt increase in the GE up to 34 WG, a developmental stage when GE physiologically regress. But some cells remained immunolabelled in the GE and the cortical SVZ, likely corresponding to IN intermediate progenitors.

Calretinin immunohistochemistry

In both FASD and control layer I, Cajal Retzius cells were positive for CR antisera, along with the superficial tangential fibre network. This immunoreactivity was observed throughout foetal life and decreased from 38 WG, with a loss of positivity at 3 post-natal months. Additional small rounded neurons located in the molecular layer corresponding to pioneer neurons were also observed 14 WG onwards. In the intermediate zone, dispersed migrating CR-positive INs were observed at all developmental stages until birth and just below the cortical plate, dispersed CR-positive cells corresponding to subplate interneurons were noted until birth.

In the cortical plate, CR-positive INs were observed in all layers from 14 WG and between 14 and 16 WG, and no obvious differences were observed between FASD and controls in the GE, cortical VZ/SVZ and cortical plate. But whereas a significant production in the GE and migration of CR INs in the cortical VZ/SVZ was observed from 18 WG in controls, they were less numerous in the cortical plate (Fig. 3a, 3b and 3c), VZ/SVZ and GE of FASD brains at 20, 22 WG and 24 WG. Quantitative analysis of CR INs performed on two FASD foetal brains at 24 WG confirmed that CR-positive cell density was lower in the cortical plate. It also revealed mispositioning of these cells which were haphazardly located within the different layers and predominated in the deepest layers instead of being mainly located in the upper layers of the cortical plate (Fig. 3d and 3e). A chi-square comparison of the intrinsic distribution of CR-positive cells in cortical plate showed that the two 24 WG FASD brains significantly differed ($\text{Chi}^2=22.35$ and 20.27 , $\text{df } 4$, $p<0.0005$) from the control brain (Fig. 3f). These results were further confirmed at 30 WG, i.e., lower global cell density in the cortical plate, still predominating in the deep layers of the cortical plate in case of FASD (Fig. 4a-e), with a significant difference between FASD and control (Fig. 4c, $\text{Chi}^2=21.25$, $\text{df } 4$, $p<0,0005$). Besides, from 26 WG the production of CR INs also followed that of GABA in the germinal zones except for two small peaks of production observed at 26 and 30 WG in the GE and VZ/SVZ of FASD brains (Fig. 4f-i). Similar anomalies were identified in the cortical plate of the FASD brain at 37 WG compared to 5 control brains aged 35 to 39 WG. In the 2 FASD post-natal cases, CR INs were still misplaced in the deepest cortical layers and appeared more numerous than in the cortex of age-matched controls (Fig. 5). Since differences between FASD and control post-natal brains were obvious, quantitative and statistical analyses were not performed in these cases.

Confocal analyses of vascular interneuron migration in the cortical plate

Close to the pia, we also observed CR-positive neurons on the surface of the cerebral hemispheres, which correspond to the migration of GABAergic INs from the GE to the olfactory bulb via the rostral migratory stream, then to the marginal zone to form the SGL also named Brun layer. About 50% of these cells, which are known to migrate into the underlying cortex, were calretinin-immunoreactive and were observed both in FASD and control brains until 26 WG [39]. Before mid-gestation, no migratory abnormalities of calretininergic INs along the perforating microvessels of the cortical plate were identified. But at later stages, in particular between 33 and 37 WG, vascular migration was affected in the cortical plate of FASD fetuses, in which the majority of CR-immunoreactive INs remained at a distance from the vessels, contrary to controls, where CR-positive INs were found in close contact with the vessels in all layers (Fig. 6 and supplementary Fig. 1). Moreover, as previously reported [23], the physiological predominant radial organization of the vasculature was markedly altered.

Discussion

This study allows to confirm that GABA and CR interneurons are generated early during the foetal period with an intense interneuron generation within the GE from 18 WG followed by a progressive extinction by 30 WG, consistent with previous studies [57; 67]. Interestingly, the CaBP marker CR displayed a dynamic expression, as it reached a peak between 20 and 38 WG and decreased afterwards, suggesting that transient expression of CR-positive neurons could exert precise functions during specific developmental events, in particular during neuronal migration [58]. The main hallmarks of FASD interneuronopathy consisted in a delayed generation of GABA INs expressing calretinin which started from 24 WG instead of 18 WG and resulted in an inadequate number of INs, i.e., insufficient in the

cortical plate until birth, in excess after birth, as well as in a failure to integrate themselves at their appropriate location within the different layers according to an inside-out pattern. These anomalies in cell density were always associated with a mispositioning of calretinin INs located in the deepest layers in FASD whereas they were mainly located in the superficial layers in controls, as previously described [46]. It has been postulated that in humans, the location of CR INs in the upper cortical layers (II/III) might play a role in cortical circuit formation necessary for higher brain functions, notably abstract thinking and language [46] which could partly explain the neurocognitive and behavioural deficits observed in FASD.

To our knowledge, no study concerning the effects of alcohol during human or rodent brain development has focused on GE. Nevertheless, studies on the effects of alcohol on VZ/SVZ of the dorsal telencephalon in a murine model of cultured radial glial cells and in murine embryonic cerebral cortices revealed that *in utero* ethanol exposure impairs cell proliferation and results in a decreased production of neurons and astrocytes [50]. Telencephalic cultures obtained from ethanol-treated rats displayed a reduction of actively dividing radial glia progenitors, and neurosphere formation assay showed a reduced number of multipotent progenitor cells in cultures isolated from ethanol-treated rats. More recently, using *in vivo* and *in vitro* mouse models, it has been demonstrated that alcohol hinders basal progenitor proliferation in the SVZ by interfering with the cell cycle at G1-S transition from early development [47]. From these observations, it might be suggested that a similar mechanism occurs in the GE, which could explain defective/delayed production of GABAergic INs during foetal life and even microcephaly due to alcohol-induced teratogenic effects on germinative zones. Brain growth failure which is the most frequent brain structural anomaly could also be related to alcohol-induced neuroapoptosis which was first reported 20 years ago by Ikonomidou et al. who showed that the proapoptotic effects of alcohol mediated by both extrinsic and intrinsic pathways were mimicked by NMDA blockers and GABA_A

receptor modulators and peaked at P7 in rats, which corresponds to 34-38 WG in humans [21]. Since then, it has been shown that nearly all types of neurons including INs are affected by this process.

Several studies have suggested that in rodents and monkeys, the defects in the numbers of GABA cortical IN and in their positioning in the cortex of FADS patients resulted from impaired migration but data remain contradictory and this could be partly due to the plethora of alcohol exposure schedules and animal models used. Upon alcohol exposure, fewer GABA INs and more particularly in layers II and III have been reported in the somatosensory cortex of guinea pigs and monkeys [5, 40] suggesting that late born interneurons are susceptible to alcohol exposure. Conversely, other studies reported an increased density of GABA INs in mouse prefrontal cortex, which was attributed to enhanced tangential migration [12, 54]. It is recognized that tangential migration is largely controlled by GABA signaling and that a reduction in ambient GABA results in improper migration of GABA INs which express GABA_A, GABA_B and GABA_C receptors and are a target of alcohol [53]. On the other hand, alcohol has been shown to potentiate GABA-mediated signaling by increasing GABA release and GABA_A receptor activity with subsequent premature migration. According to Skorput et al., INs of layer V are particularly sensitive to alcohol which could explain increased migration to this layer [54]. Otherwise, IN migration depends on neurotrophic factor activity which regulates the tangential migration mode, such as BDNF, GDNF and HGF which play a crucial role in the dispersion and appropriate location of INs arising from the GE in the dorsal telencephalon [45]. Basic fibroblast growth factor stimulates the generation and differentiation of CR INs, and its effects are enhanced by retinoic acid which plays an essential role in stem cell differentiation and development and is a major target of alcohol [41, 52].

Migration and positioning of GABAergic INs in the cortex is also controlled by cortical microvessels [63] and it has previously been demonstrated that cortical angiogenesis in foetal human brains is impaired by antenatal alcohol exposure [23, 27]. In the present study, we observed that a significant proportion of GABAergic/CR INs were located at a distance from cortical vessels from the beginning of the third trimester of gestation which could also explain IN mispositioning in FASD brains. Recently, *Léger et al.* reported that during normal neurodevelopment, glutamate stimulates activity of the endothelial proteases MMP-9 and t-PA along the pial and radial cortical microvessels. They showed that t-PA invalidation and *in vivo* administration of a MMP inhibitor resulted in a mispositioning of GABA INs which were missing in the superficial cortical layers supporting the fact that glutamate, *via* its t-PA-dependent endothelial NMDA receptor, controls vessel-associated migration of GABA INs by regulating endothelial protease activity [28]. Furthermore, these authors provided for the first time mechanistic and functional evidence that upon *in utero* exposure, alcohol impairs glutamate-regulated activity of pial microvessels and IN positioning by altering metalloproteinase activity. From these results, it could be suggested that alcohol-induced endothelial dysfunction may contribute to ectopic cortical GABAergic IN positioning observed in the present FASD cases [29].

Conclusion

This study provides further evidence that alcohol affects the GABAergic system in humans from early foetal life by impacting on critical stages of brain development and thus inducing an interneuronopathy. Semi-quantitative and quantitative analyses of GABAergic and calretininergic interneuron density allowed us to identify an insufficient and delayed production of GABAergic interneurons in the ganglionic eminences during the two first trimesters of the pregnancy, a delayed incorporation into the laminar structures of the frontal cortical plate and a mispositioning of GABAergic and calretininergic interneurons which

persisted throughout the foetal life. Moreover, vascular migration of calretinergeric interneurons within the cortical plate appeared abnormal, as reflected by low numbers of interneurons observed close to the cortical perforating vessel walls that may in part explain their abnormal intracortical distribution. Our results are globally concordant with those previously obtained in mouse and *in vitro* models, in which alcohol has been shown to induce an interneuronopathy by affecting interneuron density and positioning within the cortical plate, and which could account for the cognitive and behavioral disabilities as well as epilepsy observed in children with foetal alcohol disorder spectrum.

Abbreviations

CGE: Caudal Ganglionic Eminence
CNS: Central Nervous System
CP: Cortical Plate
CR: Calretinin
FAS: Foetal Alcohol Syndrome
FASD: Foetal Alcohol Spectrum Disorder
GABA: γ -aminobutyric acid
GE: Ganglionic Eminences
IN: Interneuron
IUFD: *In Utero* Foetal Death
IUGR: Intra Uterine Growth Retardation
LGE: Lateral Ganglionic Eminence
MGE: Median Ganglionic Eminence
ROI: Regions Of Interest
SGL: Subpial transient Granular cell Layer
SVZ: Subventricular Zone
TOP: Medical Termination of the Pregnancy
VZ: Ventricular Zone
WG: Weeks of Gestation

Ethics approval

Autopsy and neuropathological analyses were performed after appropriate informed consent was obtained from the parents.

Availability of data and materials

Most data generated or analyzed during this study are included in this article. Additional datasets are available from the corresponding author on request.

Competing interests

The authors declare no competing interest.

Funding

This work was supported by the Rouen University Hospital, the Normandy University, the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM; UMR1245), the *Fondation de France*, the *Fondation de l'Avenir* and the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR). MB is a recipient of a fellowship from the French Research Ministry.

Authors' contributions

FM, BG and AL designed the study. FS, PM and SM collected the clinical data. FM and AL performed and interpreted the pathological analyses. CL and CL performed immunohistochemical and confocal analyses and FM and AL analysed the results. FM and AL wrote the manuscript. BG and SM critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript and Gaëlle Friocourt for her critical reading and her very helpful comments.

References

1. Al-Jaberi N, Lindsay S, Sarma S, Bayatti N, Clowry GJ (2015) The early fetal development of human neocortical GABAergic interneurons. *Cereb Cortex* 25(3):631-45. doi: 10.1093/cercor/bht254.
2. Alzu'bi A, Clowry GJ (2019) Expression of ventral telencephalon transcription factors ASCL1 and DLX2 in the early fetal human cerebral cortex. *J Anat* 235(3):555-568. doi: 10.1111/joa.12971.
3. Andreu-Fernández V, Bastons-Compta A, Navarro-Tapia E, Sailer S, Garcia-Algar O (2019) Serum concentrations of IGF-I/IGF-II as biomarkers of alcohol damage during foetal development and diagnostic markers of Foetal Alcohol Syndrome. *Sci Rep* 9(1):1562. doi:10.1038/s41598-018-38041-0.
4. Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128(1):29-43. doi:10.1016/j.cell.2006.12.021.
5. Bailey CD, Brien JF, Reynolds JN (2004) Chronic prenatal ethanol exposure alters the proportion of GABAergic neurons in layers II/III of the adult guinea pig somatosensory cortex. *Neurotoxicol Teratol* 26(1):59-63. doi: 10.1016/j.ntt.2003.08.002.
6. Bakoyiannis I, Gkioka E, Pergialiotis V, Mastroleon I, Prodromidou A, Vlachos GD, et al (2014) Fetal alcohol spectrum disorders and cognitive functions of young children. *Rev Neurosci* 25(5):631-9. doi:10.1515/revneuro-2014-0029.
7. Barateiro A, Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta* 1843(9):1917-29. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.018.
8. Ben-Ari Y (2007) GABA, a key transmitter for fetal brain maturation. *Med Sci (Paris)* 23(8-9):751-5. doi:10.1051/medsci/20072389751.
9. Ben-Ari Y (2014) The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* 279:187-219. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.001.
10. Bonneau D, Toutain A, Laquerrière A, Marret S, Saugier-veber P, Barthez MA, et al (2002) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia (XLAG): clinical, magnetic resonance imaging, and neuropathological findings. *Ann Neurol* 51(3):340-9. doi: 10.1002/ana.10119.

11. Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ (2012) GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* 36(9):2044-55. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.07.005.
12. Cuzon VC, Yeh PW, Yanagawa Y, Obata K, Yeh HH (2008) Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J Neurosci* 28(8):1854-64. doi:10.1523/JNEUROSCI.5110-07.2008.
13. DeFelipe J (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3(4):273-89. doi:10.1093/cercor/3.4.273.
14. Feess-Higgins A, Larroche JC (1987) *Development of the human fetal brain.* (Masson, ed) Paris, INSERM CNRS.
15. Friocourt G, Poirier K, Rakić S, Parnavelas JG, Chelly J (2006) The role of ARX in cortical development. *Eur J Neurosci* 23(4):869-76. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04629.x.
16. Girault V, Gilard V, Marguet F, Lesueur C, Hauchecorne M, Ramdani Y, et al (2017) Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis* 8(2):e2610. doi:10.1038/cddis.2017.29.
17. Guerrini R, Duchowny M, Jayakar P, Krsek P, Kahane P, Tassi L, et al (2015) Diagnostic methods and treatment options for focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 56(11):1669-86. doi: 10.1111/epi.13200.
18. Guihard-Costa AM, Larroche JC (1990) Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. *Early Hum Dev* 23, 27–40. doi:10.1016/0378-3782(90)90126-4.
19. Guihard-Costa AM, Ménez F, Delezoide AL (2002) Organ weights in human fetuses after formalin fixation: standards by gestational age and body weight. *Pediatr Dev Pathol* 5, 559-578. doi:10.1007/s10024-002-0036-7.
20. Hansen DV, Lui JH, Flandin P, Yoshikawa K, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, et al (2013) Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci* 16(11):1576-87. doi:10.1038/nn.3541.
21. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, et al (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287(5455):1056-60. doi: 10.1126/science.287.5455.1056.
22. Jakovcevski I, Mayer N, Zecevic N (2011) Multiple origins of human neocortical interneurons are supported by distinct expression of transcription factors. *Cereb Cortex* 21(8):1771-82. doi: 10.1093/cercor/bhq245.
23. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudénbach V, Uguen A, et al (2012) Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol* 72(6):952-60. doi:10.1002/ana.23699.
24. Jones EG (2009) The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex* 19(9):1953-6. doi: 10.1093/cercor/bhp088.

25. Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302(7836):999-1001. doi:10.1016/s0140-6736(73)91092-1.
26. Korpi ER, den Hollander B, Farooq U, Vashchinkina E, Rajkumar R, Nutt DJ, et al (2015) Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. *Pharmacol Rev* 67(4):872-1004. doi:10.1124/pr.115.010967.
27. Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, Lesueur C, Ramdani Y, Jégou S, et al (2017) PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun* 5(1):44. doi:10.1186/s40478-017-0444-6.
28. Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, et al (2020) Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci* 77(10):1959-1986. doi:10.1007/s00018-019-03248-5.
29. Léger C, Dupré N, Laquerrière A, Lecointre M, Dumanoir M, Janin F, et al (2020) In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. *Neurobiol Dis.* 2020 Sep 2:105074. doi:10.1016/j.nbd.2020.105074. Epub ahead of print.
30. Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417(6889):645-9. doi:10.1038/nature00779.
31. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O (2018) Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron* 100(2):294-313. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009.
32. Long JE, Cobos I, Potter GB, Rubenstein JL (2009) Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1(Suppl 1):i96-106. doi:10.1093/cercor/bhp045.
33. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W (2015) Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* 9:4. doi:10.3389/fncel.2015.00004.
34. Ma T, Wang C, Wang L, Zhou X, Tian M, Zhang Q, et al (2013) Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci* 16(11):1588-97. doi:10.1038/nn.3536.
35. Marín O, Plump AS, Flames N, Sánchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130(9):1889-901. doi:10.1242/dev.00417.
36. Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2(11):780-90. doi:10.1038/35097509.
37. Mei L, Nave KA (2014) Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron* 83(1):27-49. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.007.

38. Métin C, Baudoin JP, Rakić S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23(4):894-900. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04630.x.
39. Meyer G, González-Gómez M (2018) The subpial granular layer and transient versus persisting Cajal-Retzius neurons of the fetal human cortex. *Cereb Cortex* 28(6):2043-2058. doi: 10.1093/cercor/bhx110.
40. Miller MW (2006) Effect of prenatal exposure to ethanol on glutamate and GABA immunoreactivity in macaque somatosensory and motor cortices: critical timing of exposure. *Neuroscience* 138(1):97-107. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.060.
41. Pappas IS, Parnavelas JG (1998) Basic fibroblast growth factor promotes the generation and differentiation of calretinin neurons in the rat cerebral cortex in vitro. *Eur J Neurosci* 10(4):1436-45. doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00147.x.
42. Petanjek Z, Berger B, Esclapez M (2009) Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. *Cereb Cortex* 19(2):249-62. doi:10.1093/cercor/bhn078.
43. Petryniak MA, Potter GB, Rowitch DH, Rubenstein JL (2007) *Dlx1* and *Dlx2* control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 2;55(3):417-33. doi: 10.1016/j.neuron.2007.06.036.
44. Poulos SG, Richie WD, Bailey RK, Lee A, Dela Peña I, Sanberg PR, et al (2014) The potential of neural stem cell transplantation for the treatment of fetal alcohol spectrum disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 54:149-56. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.05.016.
45. Powell EM, Mars WM, Levitt P (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30(1):79-89. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00264-1.
46. Radonjić NV, Ortega JA, Memi F, Dionne K, Jakovcevski I, Zecevic N (2014) The complexity of the calretinin-expressing progenitors in the human cerebral cortex. *Front Neuroanat* 8:82. doi:10.3389/fnana.2014.00082.
47. Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Henderson GI, Mahimainathan L (2016) Ethanol induces cytoostasis of cortical basal progenitors. *J Biomed Sci* 23:6. doi:10.1186/s12929-016-0225-8.
48. Riley EP, Infante MA, Warren KR (2011) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev* 21(2):73-80. doi:10.1007/s11065-011-9166-x.
49. Robinson S, Li Q, Dechant A, Cohen ML (2006) Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. *J Neurosurg* 104(6 Suppl):396-408. doi:10.3171/ped.2006.104.6.396.
50. Rubert G, Miñana R, Pascual M, Guerri C (2006) Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 84(3):483-96. doi:10.1002/jnr.20963.

51. Schulz DM, Giordano DA, Schulz DH (1962) Weights of organs of fetuses and infants. *Arch pathol* 74(244):1306-1308.
52. Serio RN, Laursen KB, Urvalek AM, Gross SS, Gudas LJ (2019) Ethanol promotes differentiation of embryonic stem cells through retinoic acid receptor- γ . *J Biol Chem* 294(14):5536-5548. doi: 10.1074/jbc.RA118.007153.
53. Shenoda BB (2017) An overview of the mechanisms of abnormal GABAergic interneuronal cortical migration associated with prenatal ethanol exposure. *Neurochem Res* 42(5):1279-1287. doi:10.1007/s11064-016-2169-5.
54. Skorput AG, Gupta VP, Yeh PW, Yeh HH (2015) Persistent interneuronopathy in the prefrontal cortex of young adult offspring exposed to ethanol in utero. *J Neurosci* 35(31):10977-88. doi:10.1523/JNEUROSCI.1462-15.2015.
55. Smiley JF, Saito M, Bleiwas C, Masiello K, Ardekani B, Guilfoyle DN, et al (2015) Selective reduction of cerebral cortex GABA neurons in a late gestation model of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol* 49(6):571-80. doi:10.1016/j.alcohol.2015.04.008.
56. Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 91(2):260-92. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.033.
57. Ulfing N. (2002) Ganglionic eminence of the human fetal brain--new vistas. *Anat Rec* 267(3):191-5. doi: 10.1002/ar.10104.
58. Verney C (2003) Phenotypic expression of monoamines and GABA in the early development of human telencephalon, transient or not transient. *J Chem Neuroanat* 26(4):283-92. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.002.
59. Wang B, Long JE, Flandin P, Pla R, Waclaw RR, Campbell K, et al (2013) Loss of Gsx1 and Gsx2 function rescues distinct phenotypes in Dlx1/2 mutants. *J Comp Neurol* 521(7):1561-84. doi: 10.1002/cne.23242.
60. Wang G, Zhong S, Zhang SY, Ma ZL, Chen JL, Lu WH, et al (2016) Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J Appl Toxicol* 36(5):692-701. doi:10.1002/jat.3201.
61. Wichterle H, Alvarez-Dolado M, Erskine L, Alvarez-Buylla A (2003) Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2):727-32. doi: 10.1073/pnas.242721899.
62. Wilhelm CJ, Guizzetti M (2016) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. *Front Integr Neurosci* 9:65. doi:10.3389/fnint.2015.00065.
63. Won C, Lin Z, Kumar TP, Li S, Ding L, Elkhail A, Szabó G, et al (2013) Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun* 4:2149. doi:10.1038/ncomms3149.

64. Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2006 (9):687-96. doi: 10.1038/nrn1954.
65. Xing L, Huttner WB (2020) Neurotransmitters as modulators of neural progenitor cell proliferation during mammalian neocortex development. *Front Cell Dev Biol* 8:391. doi: 10.3389/fcell.2020.00391.
66. Ye Z, Mostajo-Radji MA, Brown JR, Rouaux C, Tomassy GS, Hensch TK, et al (2015) Instructing perisomatic inhibition by direct lineage reprogramming of neocortical projection neurons. *Neuron* 88(3):475-83. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.006.
67. Zecevic N, Hu F, Jakovcevski I (2011) Interneurons in the developing human neocortex. *Dev Neurobiol* 71(1):18-33. doi: 10.1002/dneu.20812.

Figure legends

Fig. 1 Schematic representation of GABA and CR containing interneurons in the GE, VZ/SVZ and in the cortical plate of FASD and control brains during foetal and post-natal life

(a) Evolution of GABA interneuron density in the GE and VZ/SVZ obtained from semi-quantitative immunohistochemical evaluation. The vertical dotted line indicates the stage from which no significant differences between FASD and controls were observed (26 WG). Between 20 and 26 WG, an intense generation of GABA-positive cells was observed in control brains

(b) Evolution of CR interneuron density in the GE and VZ/SVZ obtained from semi-quantitative immunohistochemical evaluation. The vertical dotted line indicates the stage at which no significant differences between FASD and controls were observed (24 WG). Between 20 and 24 WG, an intense generation of CR-positive cells was observed in control brains and after 24 WG, two smaller peaks of production were observed in FASD brains indicating a production delay of two months

(c) Evolution of cortical density in GABA interneurons. Before 26 WG, cortical interneuron density was lower in FASD, from 26 WG to birth, no major differences were observed between FASD and controls. After birth, cortical density was slightly increased in FASD

(d) Evolution of cortical density in CR interneurons. Before birth, the density of CR interneurons was constantly lower in FASD cortices with a reverse pattern after birth, indicating a delayed settling of CR interneurons in the cortex of FASD.

Fig. 2 GABA and Ki67 immunohistochemistry in the brains of FASD and controls at early developmental stages and at mid-gestation

Similar GABA interneuron density in cortical plate of FASD and controls at 14-16 WG migrating along the perforating microvessels indicated by arrows (a, b) [OM x 200], contrasting with the low number of GABA interneurons in the VZ/SVZ (c, d) [OM x200], and in the GE in FASD compared to control brains (e, f) [OM x100]. At 20 WG, GABA interneurons were scarce and immature (round-shaped instead of being bipolar, arrow) in the cortical plate of FASD compared to control (g, h) [OM x 200], in the VZ/SVZ (i, j) [OM x 200] and in the GE (k, l) [OM x 200]. Low proliferative activity revealed by Ki67 immunohistochemistry in the GE of the FASD brains aged 20 and 22 WG compared to control brains (m-r) [OM x 100].

CP: cortical plate; CTRL: control cases; GE: ganglionic eminence; FASD: foetal alcohol spectrum disorder; OM: original magnification; SVZ: cortical subventricular zone

Figure 3: Calretinin immunohistochemistry in cortical plate of FASD and control brains at 24 WG

Random cortical distribution of CR interneurons in FASD brains with a predominance in deeper layers (asterisks) (**a, b**) compared to control cortical plate in which CR cells were more abundant in layer III (asterisk) (**c**). Quantitative analysis of cortical distribution of CR interneurons in each layer showing a predominance in layer III in normal brain (black arrow) and in deeper layers in FASD brains (red arrows) (**d**), associated with a lower global density in FASD brain compared to normal brain (**e**). Intrinsic distributions of CR-positive cells were compared in cortical layers I-VI from the control fetus and the FASD cases. Chi square analysis indicated that the cortical distributions significantly differed between the control case and both FASD cases (**f**). Scale bar = 0,18 mm

Figure 4: Calretinin immunohistochemistry in the brains of FASD and control at 30 WG

Quantitative analysis of cortical distribution of CR interneurons in each layer showing a predominance in superficial layers in particular layer I in normal brain (asterisk) whereas they were still present in the deeper layers in FASD brain (red arrows) (**a**), associated with a lower global density in FASD brain compared to normal brain (**b**). Statistical analysis using Chi square again confirmed that the cortical distributions significantly differed between the control and the FASD cases (**c**). Cortical distribution of CR interneurons which were still present in the deeper layers in FASD brain (asterisk) (**d**) compared to control cortical plate in which CR cells were located in superficial layers, in particular layer I (asterisk) (**e**). CR interneurons were more abundant respectively in GE (**f, g**) and SVZ (**h, i**) of the FASD brain compared to control [OM x 20]. Scale bar = 0,18 mm

CP: cortical plate; CTRL: control cases; GE: ganglionic eminence; FASD: foetal alcohol spectrum disorder; OM: original magnification; SVZ: cortical subventricular zone

Figure 5: Calretinin immunohistochemistry in the cortex of FASD and control brains after birth

CR cells were more abundant in superficial and especially in deeper cortical layers of FASD brains at 3 months and 2 years (**a** and **b**, **e** and **f**) in comparison with control brains (**c** and **d**, **g** and **h**). Scale bar = 0,22 mm.

Figure 6: Confocal analysis with calretinin and GLUT1 immunolabellings at 33-34 WG

CR-immunoreactive interneurons, labeled in red, remaining at a distance from the vessels, labeled in green (double-headed arrows) in FASD brain (**a**, **c**, **e**, **g**) contrary to control, where CR-positive interneurons were found in close contact with the vessels (arrows) in all cortical layers (**b**, **d**, **f**, **h**). Scale bar = 5 μ m.

Supplementary Figure 1: Confocal analysis with calretinin and GLUT1 immunolabellings at 36-37 WG

The network of CR fibers (asterisk), labeled in red, was observed in layer I but no CR interneuron was observed in the superficial layers of FASD cortex at 37 WG (**a**) while they were abundant and migrated along the vessels, labeled in green, in superficial layers of control cortex at 36 WG (arrows) (**b**). In another superficial area, CR interneurons were at a distance from the vessels (double-headed arrows) in the FASD brain (**c**) while they were always more abundant and in close contact with the vessels in control (arrows) (**d**). In deeper layers, CR interneurons were more abundant in FASD cortex but at a distance from the vessels (double-headed arrows) (**e**), in contrast with control where they were less abundant and still in close contact with the vessels (arrows) (**f**). Scale bar = 10 μ m.

Figure 1

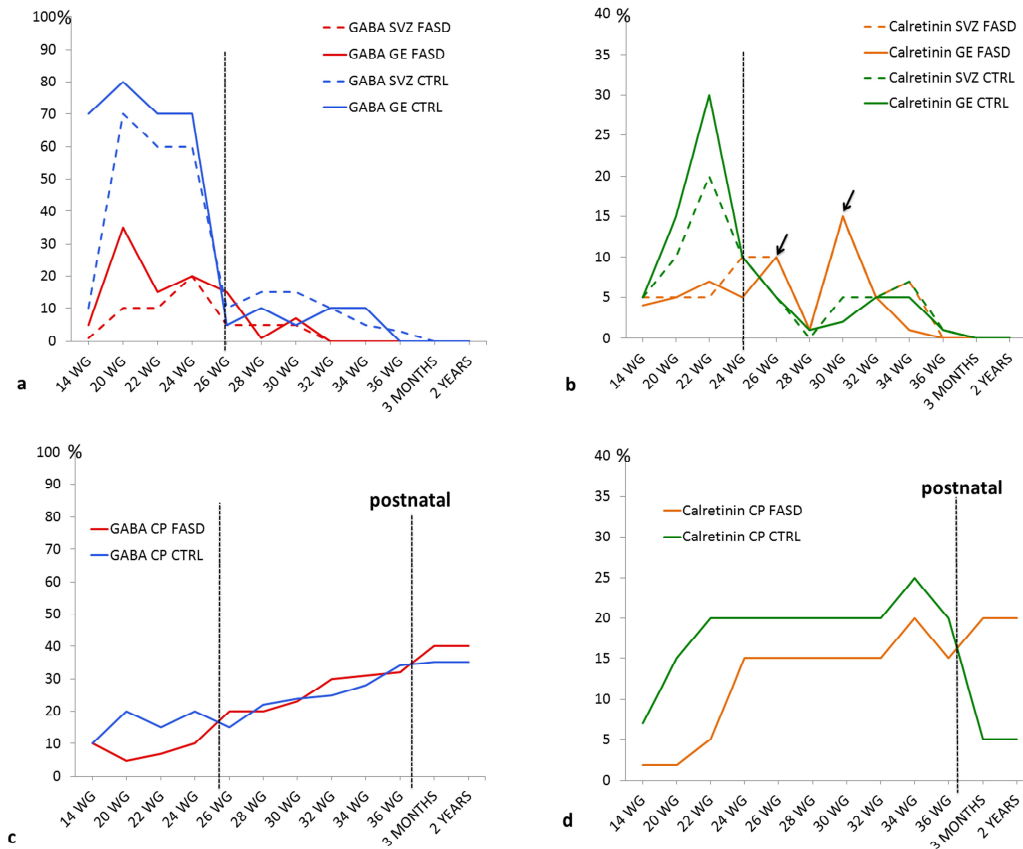


Figure 2

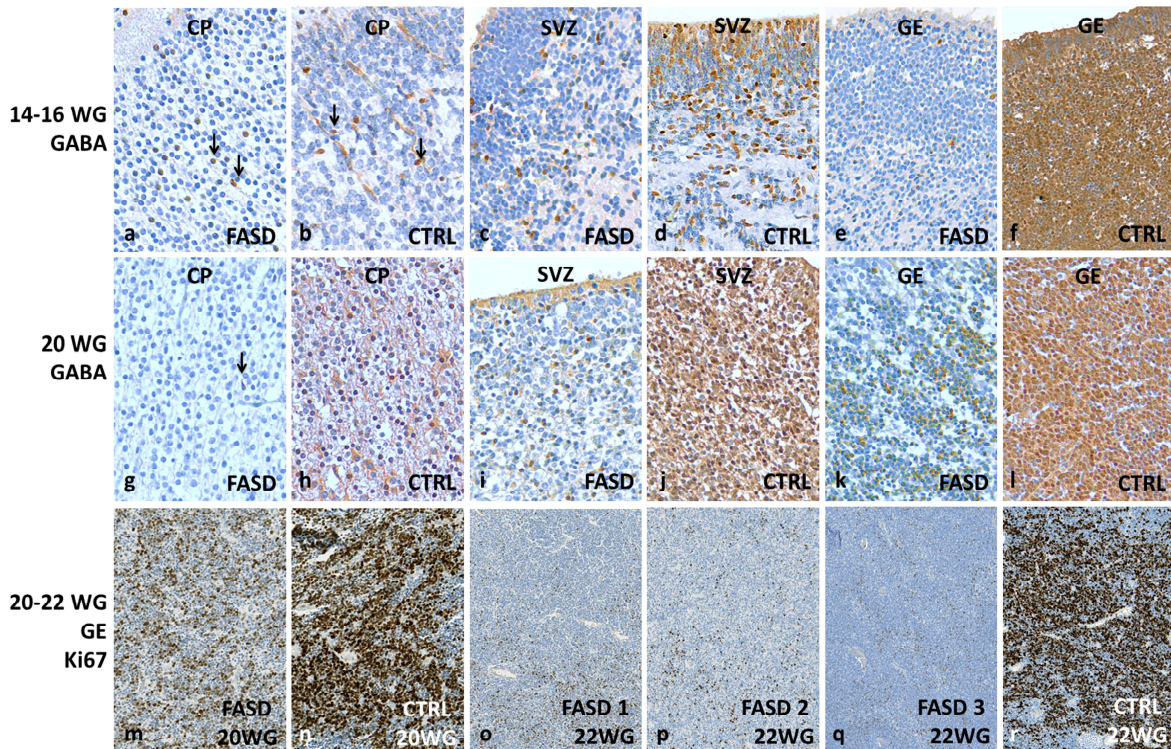


Figure 3

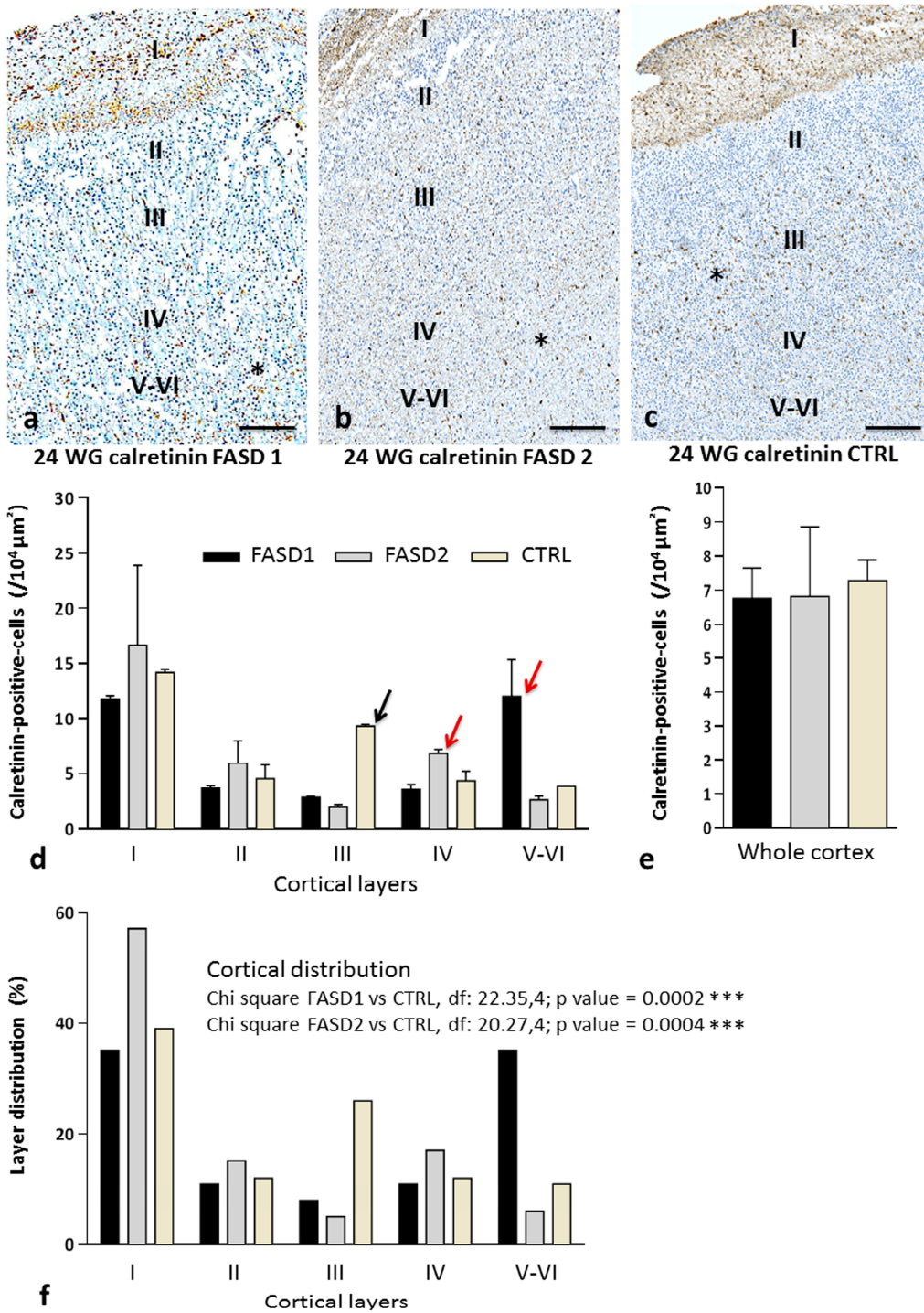


Figure 4

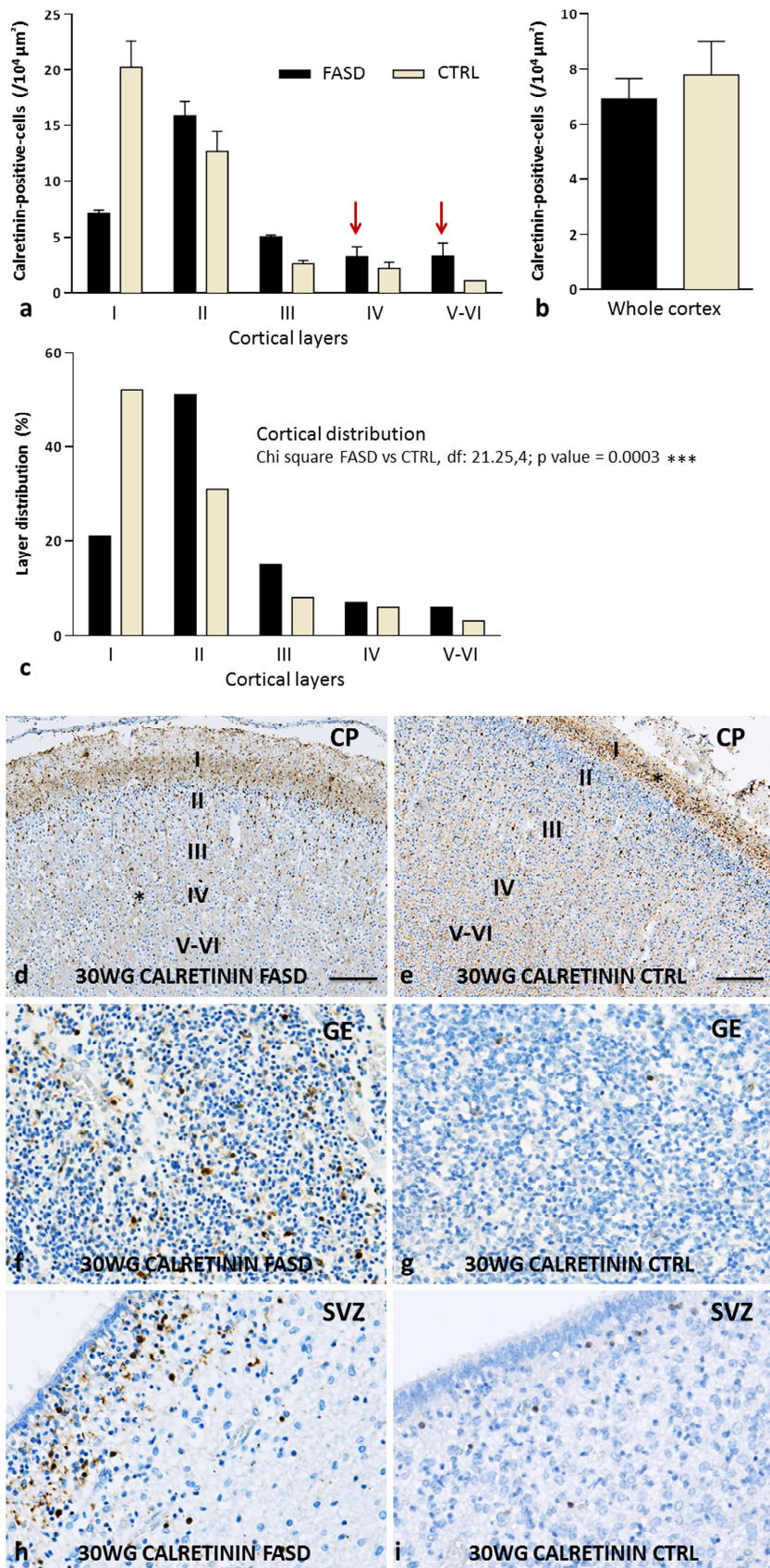


Figure 5

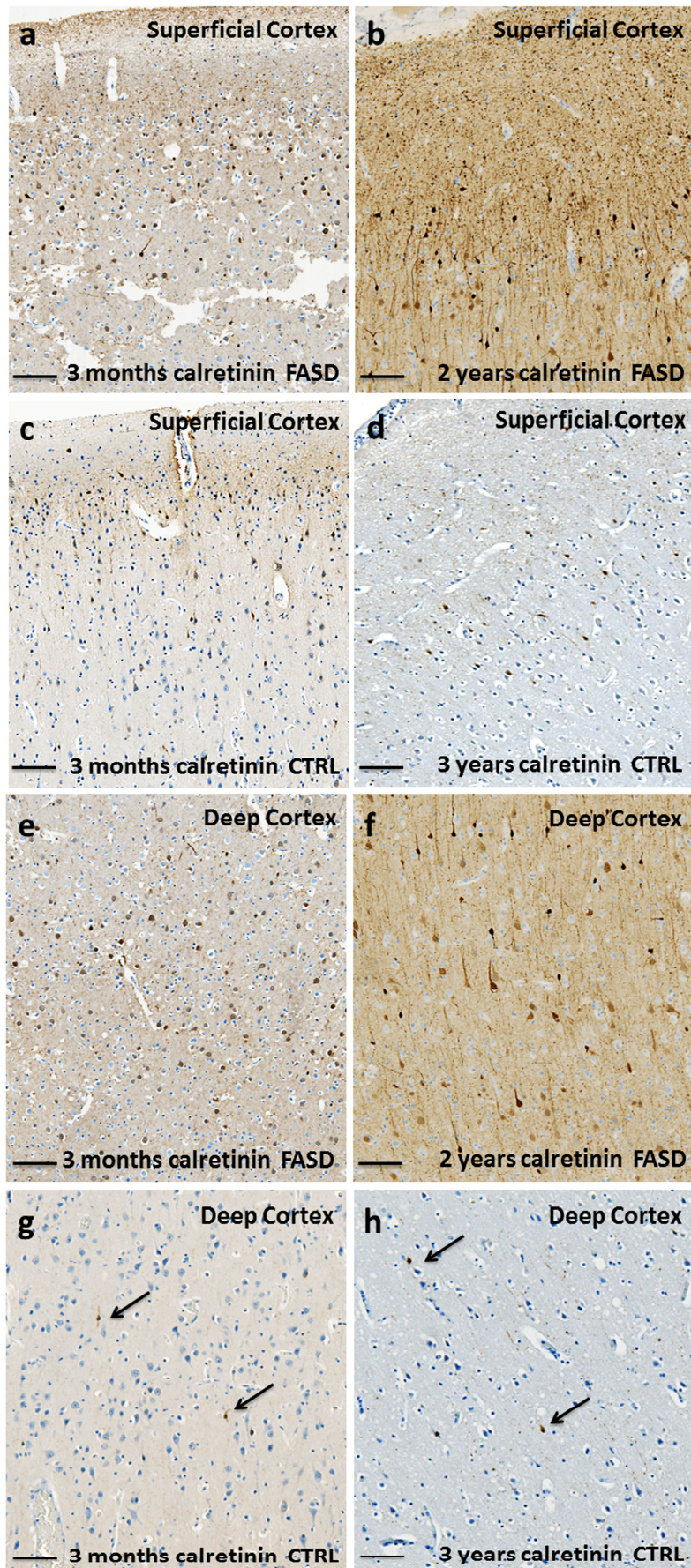
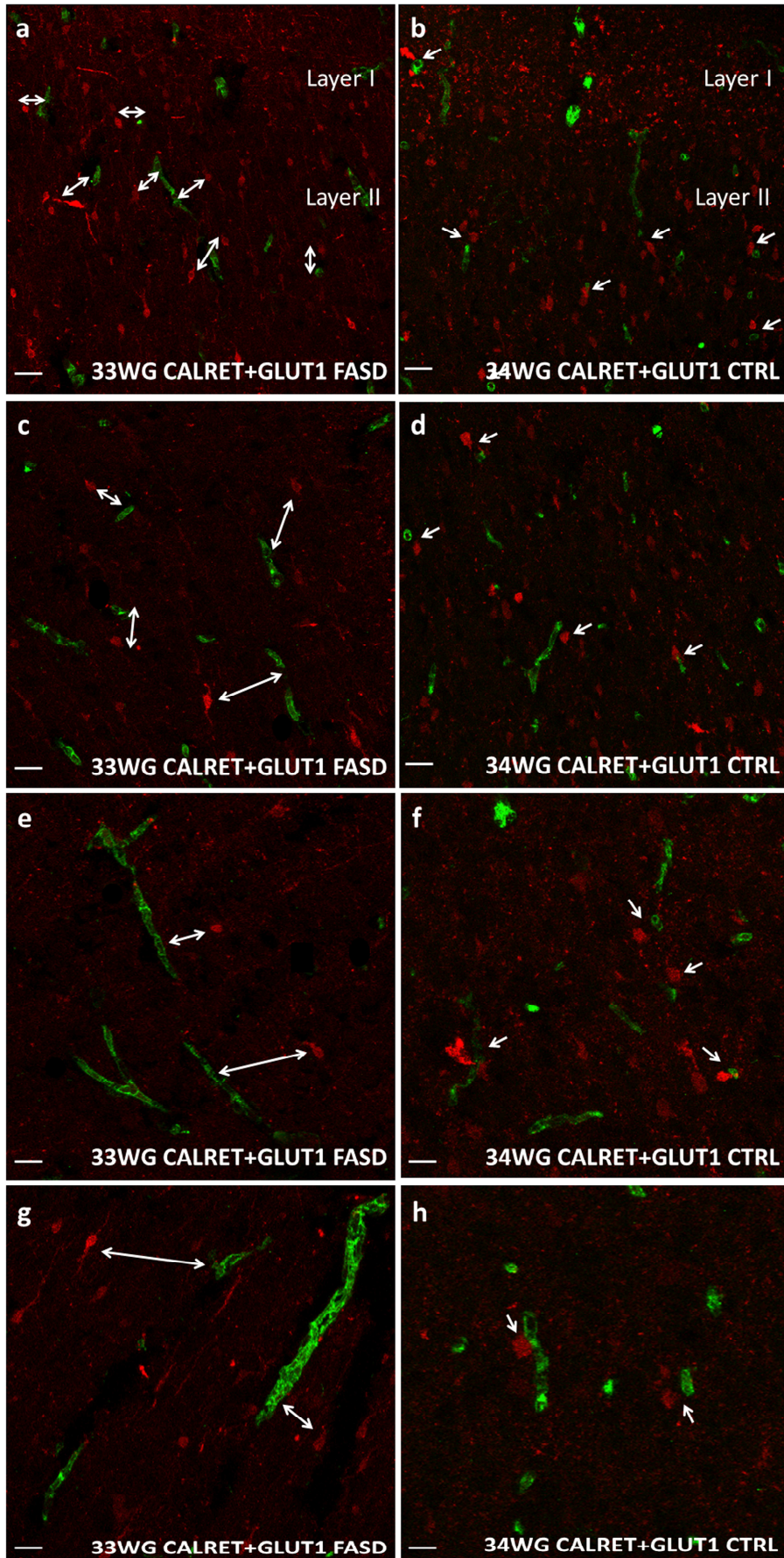


Figure 6



Supplementary Figure 1

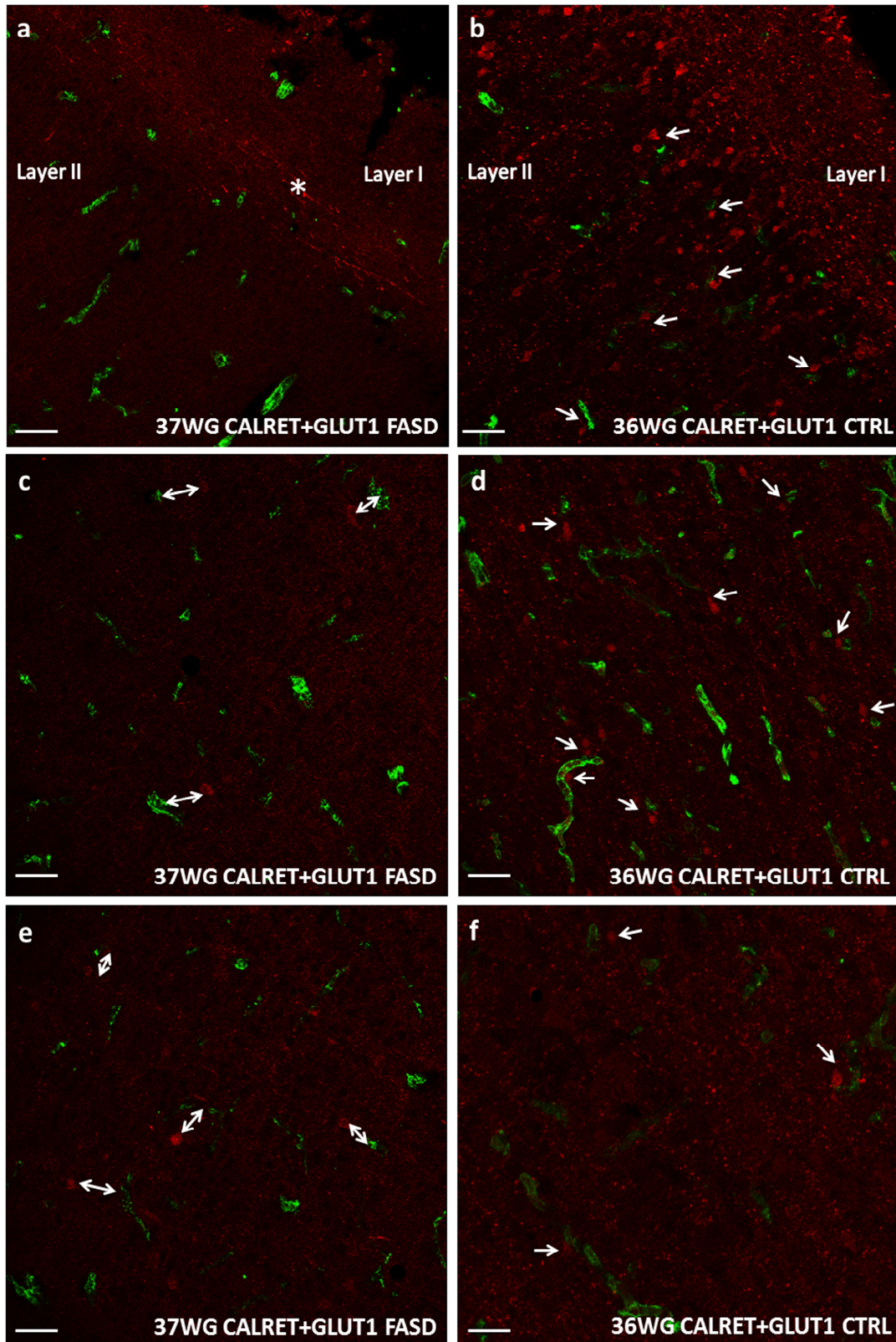


Table 1. Gestational age/postnatal age and cause of death of selected control cases

Case number	Term	Cerebral maturation*	TOP	Cause of death
1	15 WG	14 WG	Yes	Atrioventricular canal
2	16WG	16WG	Yes	Isolated sacral myelomeningocele
3	22 WG	20 WG	No	IUFD
4	22 WG	22 WG	Yes	Obstructive uropathy
5	24 WG	24 WG	No	IUFD
6	26 WG	26 WG	Yes	Hereditary bilateral microphthalmia
7	28 WG	28 WG	Yes	Severe distal arthrogryposis
8	30 WG	30 WG	No	Cord prolapse
9	32 WG	32 WG	Yes	Complex cardiac malformation
10	34 WG	34 WG	Yes	Suspected vermis hypoplasia (Not confirmed)
11	35 WG	35 WG	No	Non immune fetal hydrops Caesarean section
12	36 WG	36 WG	No	Bilateral renal agenesis Fallot tetralogy Immediate postpartum death
13	36 WG	36 WG	No	Dilated cardiomyopathy Dead at day 2
14	37 WG	37 WG	No	Normal pregnancy Death despite resuscitation No autopsy and placental abnormalities
15	39 WG	39 WG	No	Perpartum in utero death Placental membrane praevia vessel rupture
16	3 months PN	3 months PN	No	Prone position sleep
17	2 years and 11 months	3 years	No	Anaphylactic shock

IUFD: *in utero* fetal death; PN: post-natal; TOP: Medical termination of pregnancy;
WG: weeks' gestation

* according to the morphometric criteria of Guihard-Costa and Larroche [18].

Table 2. Main clinical and morphological characteristics of antenatal alcohol exposed fetuses and infants

Case number	WG	Cause of death	Body weight	Cranio-facial dysmorphism	Brain weight	Visceral anomalies	CNS anomalies	Maternal alcohol intake	Maternal Co-morbidity
1	15	TOP	25 th percentile	Indistinct philtrum Low set posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 15.8 g	Anterior coelosomia	No	Chronic alcohol intake*	Heroin Methadone
2	20	TOP Maternal distress	10 th percentile	Midface hypoplasia, short nose, flat face	25 th percentile 39.34 g	No	No	Chronic alcohol intake and Binge drinking* (ND)	HIV, Hepatitis C Multi-drug addiction
3	22	TOP Chiari malformation	<3 rd percentile IUGR	FAS craniofacial dysmorphism	<<3 rd percentile 45.65g	Renal hydronephrosis	Microcephaly Arnold Chiari II Myelomeningocele	Chronic alcohol intake**	Psychotic Disorder Valproate
4	22	TOP Maternal distress	3 rd percentile IUGR	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 63.5 g	No	No	Chronic alcohol intake (262 g per day) **	Psychotic Disorder psychotropics Increased MGV
5	22	TOP Maternal distress	50 th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	50 th percentile 63.21 g	Unilateral pelvicaliceal dilatation	No	Daily chronic alcohol intake*	Multi-drug addiction Valproate (epilepsy)
6	24	TOP Amnion band sequence	NA	FAS craniofacial dysmorphism	50 th percentile 75g	NA	Micropolygyria Migration anomalies Vermis hypoplasia cerebellar hemisphere necrosis	Chronic alcohol intake**	Cocaine

7	24	TOP septal agenesis	50 th percentile	FAS dysmorphism	50 th percentile 100.3g	No		Arhinencephaly	Chronic alcohol intake**	Cannabis addiction
8	26	Spontaneous abortion	50 th percentile	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 133.6 g	Unilateral pelvic dilatation		No	Chronic alcohol intake**	ND
9	27	Preeclampsia Death at D10	10 th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	3 rd percentile 109 g	No		Microcephaly Massive cerebellar haemorrhage	Alcohol intake**	ND
10	29	IUFD cardiopathy	5 th percentile	Anteversed nostrils and pointed nose Ear anomalies Indistinct philtrum Retrognathism	5 th percentile 178 g	Tetralogy of Fallot		No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased MGV and GGT
11	30	IUFD Abruptio placentae	10 th percentile	No	50 th percentile 211 g	No		Bilateral intraventricular haemorrhage	Daily chronic alcohol intake*	Cannabis addiction Treated hypothyroidism
12	31	IUFD Preeclampsia	3 rd percentile IUGR	Ear anomalies Retrognathism	3 rd percentile 197.05 g	No		No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased MGV and GGT
13	31	TOP Septal agenesis	50 th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	50 th percentile 234 g	No		Septal agenesis	Chronic and Binge drinking*	Cannabis
14	33	IUFD Acute alcohol intoxication (maternal distress)	50 th percentile	No	50 th percentile 348.15 g	Amniotic inhalation	fluid	Diffuse astrogliosis	Chronic and Binge drinking* (4.98 g/L)	Multi-drug addiction Increased MGV and GGT First pregnancy: IUFD at 33 WG One child alive with FAS.

15	37	IUFD	25 th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	<3 rd percentile 248 g	No	Neuron heterotopia Microcephaly	Chronic and Binge drinking**	Heroin addiction
16	3 PN months	SIDS	5 th percentile	FAS cranio-facial dysmorphism	50 th percentile 633g	No	Brain oedema	Chronic alcohol intake* (ND)	Cannabis addiction
17	22 PN months	SIDS	50 th percentile	FAS cranio-facial dysmorphism	ND	Isolated pulmonary oedema	No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	ND

CNS: central nervous system; GGT: gamma-glutamyl transferase; IUFD: *in utero* fetal death; IUGR: intra uterine growth retardation; MGV: mean globular volume; MTP: medical termination of the pregnancy; ND not determined; PN: post-natal; SIDS: sudden infant death syndrome; WG: weeks' gestation

* maternal self report; ** suspected

Supplementary Table 1: Semi-quantitative analysis of immunohistochemical data with GABA antibody

Term	FASD/CTRL	VZ/SVZ	GE	IZ	Subplate	CP
15 WG	FASD	1% +	5% +	1% +	<1%	10% +
14 WG	CTRL 1	10% +	>50% +++++	10% +	10% +	10% +
16 WG	CTRL 2	10% +	>50% +++++	0	1% +	10% +
20 WG	FASD	5% +	50% +++	5% +	<5% +	5% +
	CTRL	70% +++++	80% +++++	5% +	10% +	20% ++
22 WG	FASD 1	10% +	20% ++	0	0	5% +
	FASD 2	5% +	10% +	0	0	5% +
	FASD 3	5% +	5% +	0	0	10% +
	CTRL	60% +++++	70% +++++	20% ++	NA	15% ++
24 WG	FASD 1	20% ++	10% +	<5% +	NA	10% +
	FASD 2	20% ++	30% ++	<5% +	NA	10% +
	CTRL	60% +++++	>50% +++++	10% ++	NA	20% ++
26 WG	FASD 1	5% +	15% ++	10% +	dispersed	20% ++
	FASD 2	5% +	5% +	20% ++	dispersed	20% ++
	CTRL	10% +	5% +	<5% +	NA	15% ++
29 WG	FASD	5% +	1% +	10% +	NA	20% ++
28 WG	CTRL	0	10% +	20% ++	scant	22% ++
30 WG	FASD	5% +	10% +	10% ++	NA	23% ++
	CTRL	12% ++	5% +	10% ++	10% ++	24% ++
31 WG	FASD 1	NA	NA	10% +	NA	30% +++
	FASD 2	TF	TF	TF	TF	TF
32 WG	CTRL	10% +	10% +	20% ++	scant	25% ++
33 WG	FASD	NA	NA	10% +	NA	31% +++
34 WG	CTRL	5% +	10% +	20% ++	NA	28% +++
37 WG	FASD	NA	NA	NA	NA	32% +++
35 WG	CTRL 1	NA	NA	NA	NA	NA
36 WG	CTRL 2	NA	NA	NA	NA	NA
	CTRL 3	3% +	NA	numerous	NA	34% +++
37 WG	CTRL 4	NA	NA	NA	NA	NA
39 WG	CTRL 5	NA	NA	NA	NA	NA
3 months	FASD	absent	absent	10% +	NA	38% +++
	CTRL	absent	absent	10% +	NA	35% +++
2 years	FASD	absent	absent	dispersed	NA	38% +++
	CTRL	absent	absent	dispersed	10% +	35% +++

CP: cortical plate; CTRL: control; FASD: fetal alcohol spectrum disorder ; GE: ganglionic eminences; IZ: intermediate zone; NA: not available ; TF: technical failure ; VZ/SVZ: cortical ventricular and subventricular zones

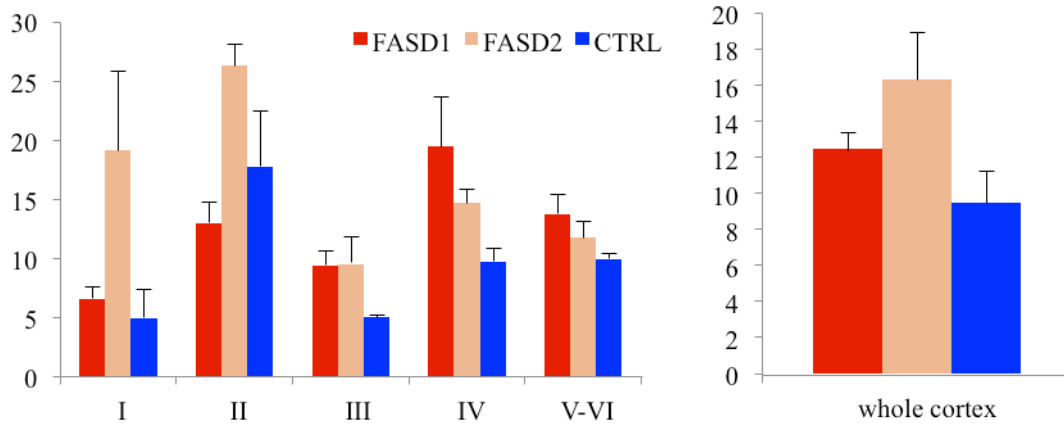
Supplementary Table 2: Semi-quantitative analysis of immunohistochemical data with Calretinin antibody

Term	FASD/CTRL	VZ/SVZ	EG	IZ	subplate	CP
15 WG	FASD	5-10% +	5% +	5% +	5% +	2% + (dispersed)
14 WG	CTRL 1	5% +	5% +	5% +	5% +	7% + (dispersed)
16 WG	CTRL 2	5-10% +	5-10% +	1% +	1% +	7% + (dispersed)
20 WG	FASD	5% +	5% +	0	0	2% + (dispersed)
	CTRL	5-10% +	15% ++	5% +	5% +	15% ++ (dispersed)
22 WG	FASD 1	10% +	5-10% +	<10% +	NA	10% + (dispersed)
	FASD 2	5% +	5% +	1% +	0	2% + (dispersed)
	FASD 3	<5% +	<5% +	1% +	NA	2% + (dispersed)
	CTRL	30% +++	30% +++	20% ++	NA	20% ++ (layers IV-V-VI)
24 WG	FASD 1	5-10% +	5% +	10-20% ++	10% +	15% ++ (dispersed)
	FASD 2	5% +	5% +	5%	NA	15% ++ (dispersed)
	CTRL	10% +	10% +	10% +	NA	20% ++ (deep layer III)
26 WG	FASD 1	5-10% +	15% ++	5% +	<5% +	15% ++ (dispersed)
	FASD 2	5% +	5% +	scant	<1% +	15% ++ (dispersed)
	CTRL	5% +	5% +	5-10% +	5% +	20% ++ (superficial layer III)
29 WG	FASD	<1% +	<1% +	scant	0	15% ++ (dispersed)
28 WG	CTRL	0	<1% +	5% +	NA	20% ++ (layers II-III)
30 WG	FASD	10% +	10-15% ++	5% +	NA	15% ++ (dispersed)
	CTRL	5% +	2% +	10% +	NA	20% ++ (layers II-III)
31 WG	FASD 1	5% +	5% +	5-10% +	0	15% ++ (dispersed)
	FASD 2	NA	NA	scant	0	15% ++ (dispersed)
32 WG	CTRL	<5% +	5% +	5-10% +	NA	20% ++ (layers II-III)
33 WG	FASD	5% +	1% +	<5% +	NA	20% ++ (dispersed)
34 WG	CTRL	5% +	5% +	10% +	NA	25% ++ (layers II-III)
37 WG	FASD	NA	NA	5%	NA	15% ++ (deep layers)
35 WG	CTRL 1	NA	NA	NA	NA	20% ++ (superficial layers)
36 WG	CTRL 2	NA	NA	NA	NA	20% ++ (superficial layers)
	CTRL 3	1% +	1%	5%	NA	20% ++ (superficial layers)
37 WG	CTRL 4	NA	NA	NA	NA	20% ++ (superficial layers)
39 WG	CTRL 5	NA	NA	NA	NA	20% ++ (superficial layers)
3 months	FASD	absent	absent	NA	NA	20% ++ (layers II-III and V)
	CTRL	absent	absent	NA	NA	5% + (layers II-III)
2 years	FASD	absent	absent	NA	NA	20% ++ (layers II-III and V)
	CTRL	absent	absent	NA	NA	5% + (layers II-III)

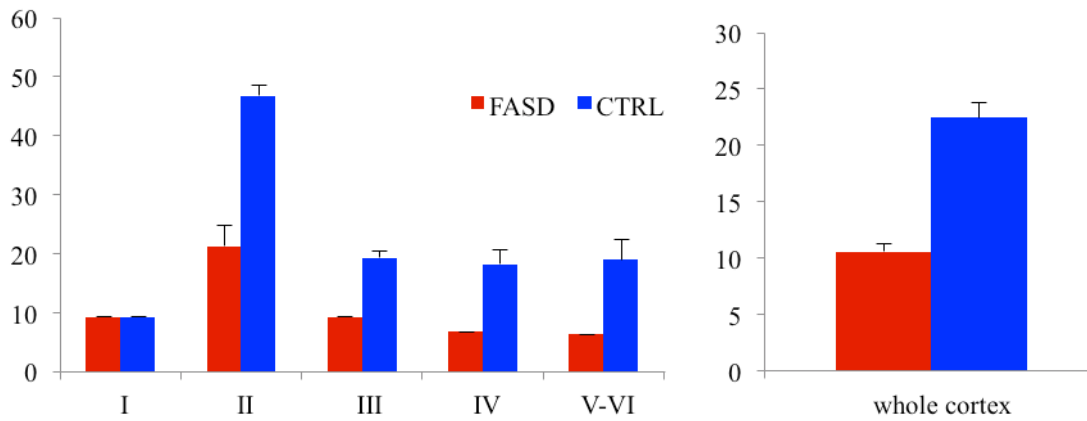
CP: cortical plate; CTRL: control; FASD: fetal alcohol spectrum disorder; GE: ganglionic eminences; IZ: intermediate zone; NA: not available; TF: technical failure; VZ/SVZ: cortical ventricular and subventricular zones

Supplementary material 1: Quantitative analysis of GABA immunolabelling in each layers and in whole cortex (Calretinin-positive-cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)

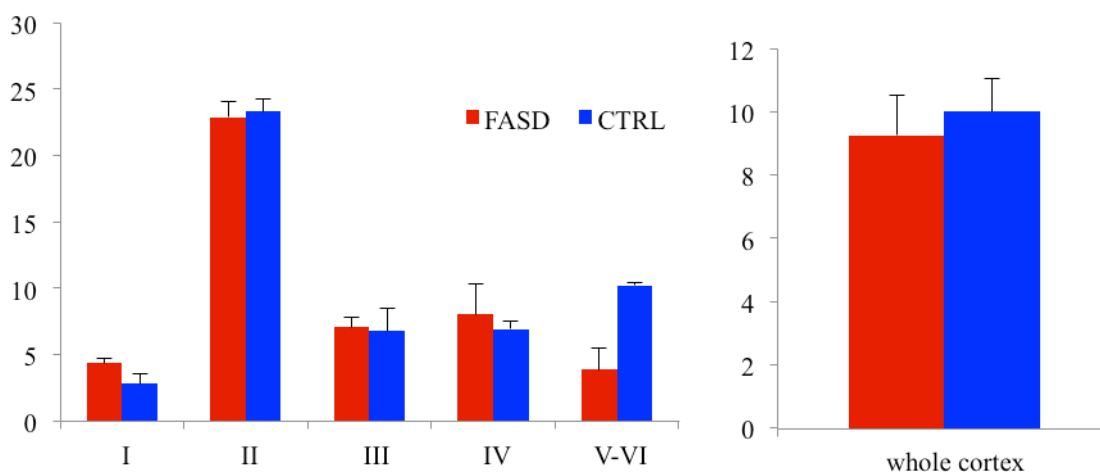
At 26WG:



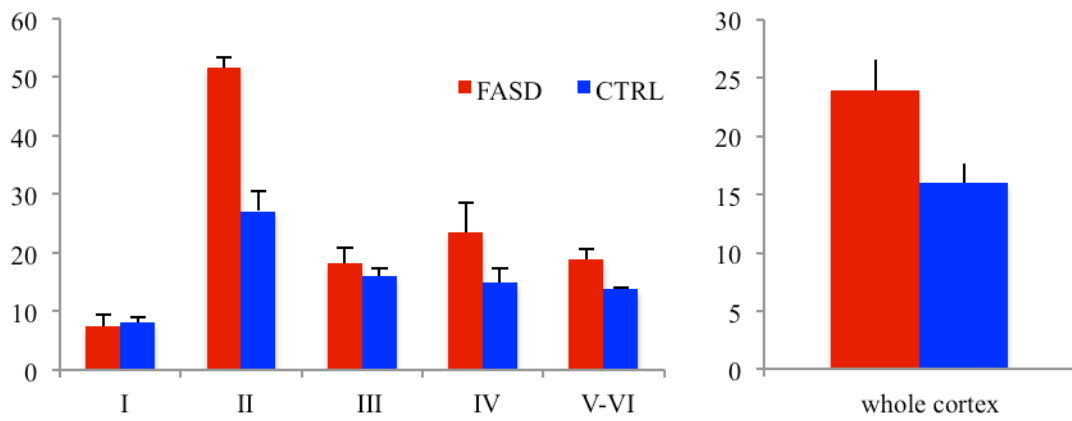
At 28-29WG:



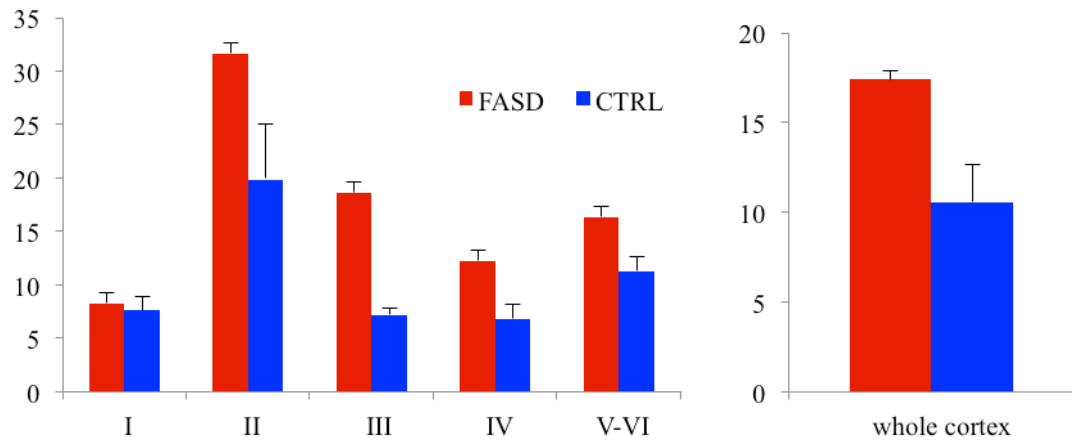
At 30WG:



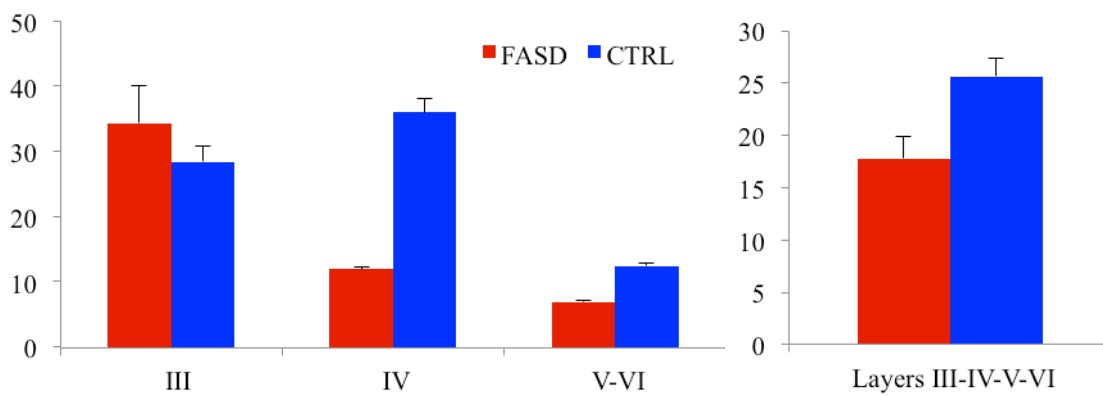
At 31-32WG:



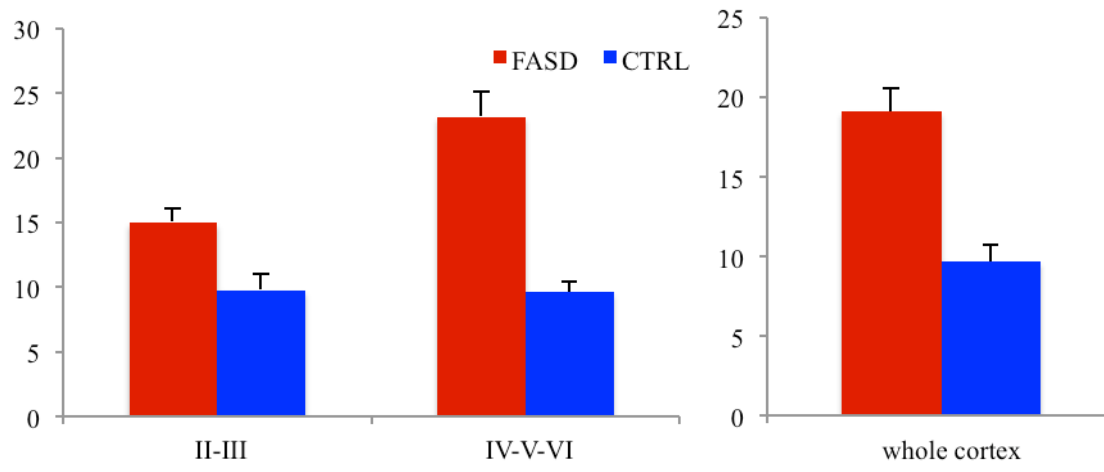
At 33-34WG:



At 36-37WG:

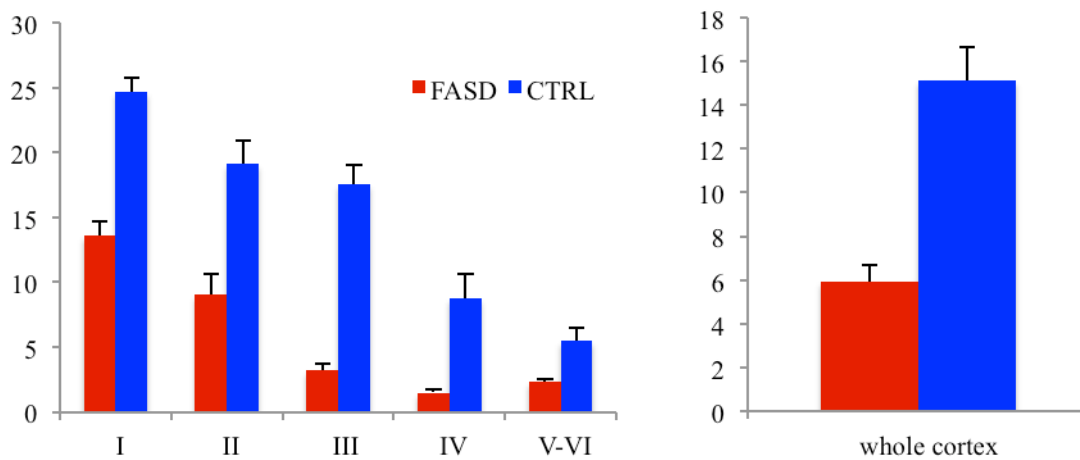


At 3 months after the birth:

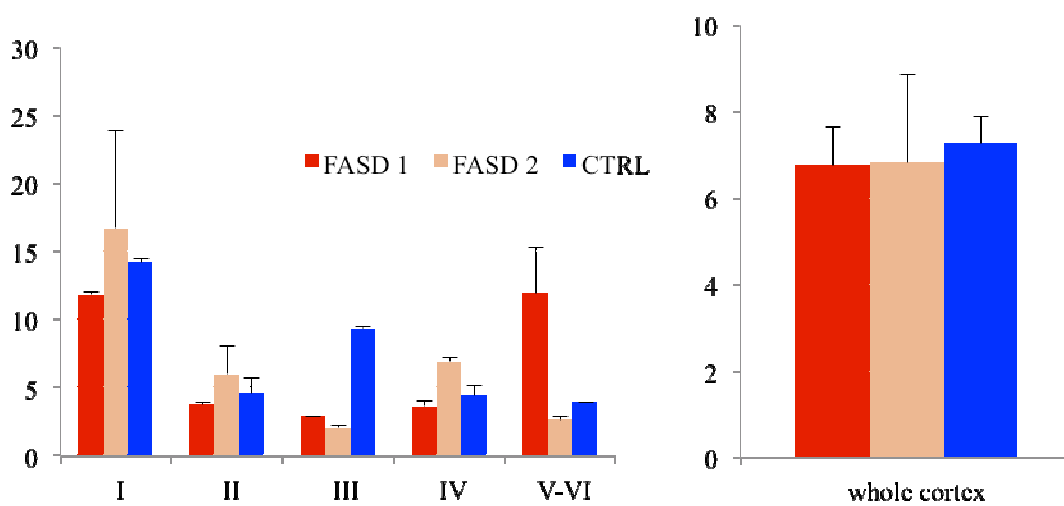


Supplementary material 2: Quantitative analysis of Calretinin immunolabelling in each layers and in whole cortex (Calretinin-positive-cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)

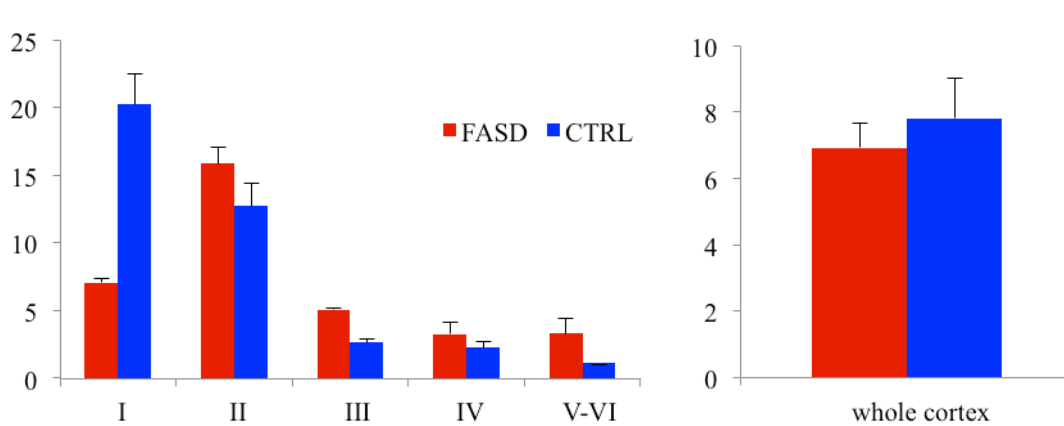
At 20WG:



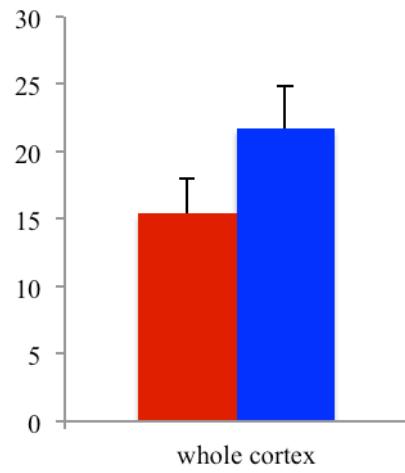
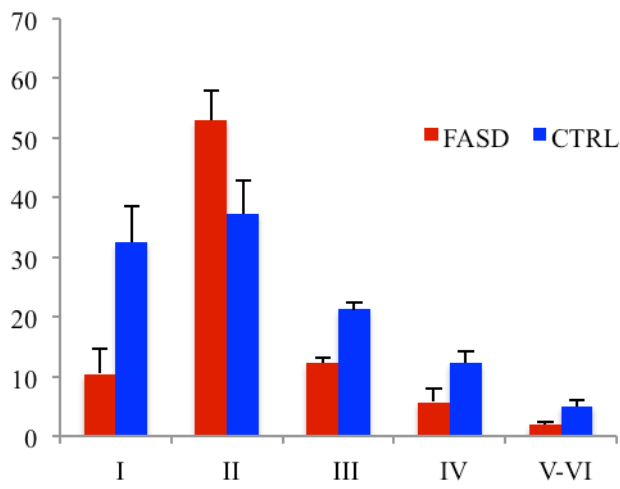
At 24WG:



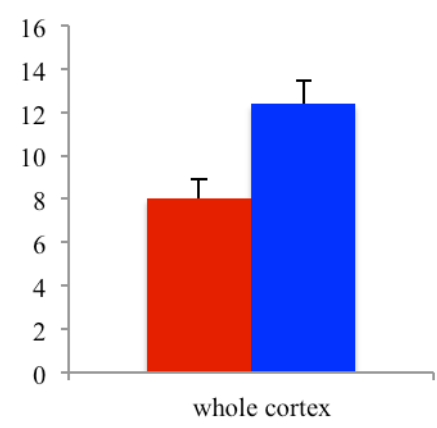
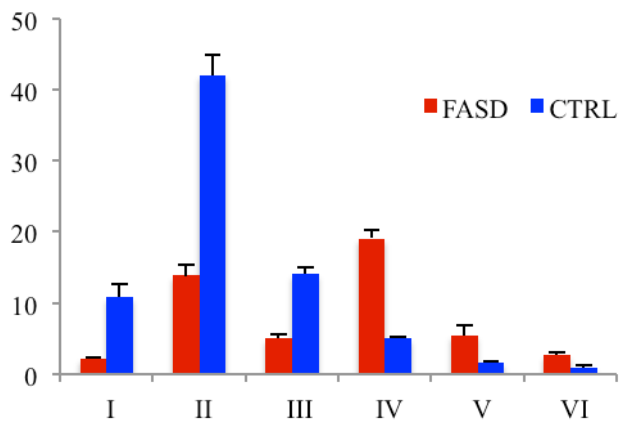
At 30WG:



At 33-34WG:



At 36-37WG:



Article 2

Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed fetuses

Article en préparation, soumission prévue à *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, IF : 3.71

Florent Marguet, MD ⁽¹⁾, Mélanie Brossolo, BS ⁽²⁾, Fanny Sauvestre, MD ⁽³⁾, Pascale Marcorelles, MD PhD ⁽⁴⁾, Céline Lesueur, BS ⁽²⁾, Stéphane Marret, MD PhD ⁽⁵⁾, Bruno Gonzales, PhD ⁽²⁾ and Annie Laquerrière, MD PhD ⁽¹⁾.

Affiliations

⁽¹⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Pathology, F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

⁽²⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

⁽³⁾ Department of Pathology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.

⁽⁴⁾ Pathology Laboratory, Pole Pathologie-Biologie, Centre Hospitalier Universitaire Brest, Brest, France; Laboratory of Neurosciences of Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Brest University, Brest, France.

⁽⁵⁾ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, F76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

Corresponding author

Prof. Annie Laquerrière

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Pavillon Jacques Delarue

CHU, 1 Rue de Germont 76031 Rouen Cedex France

Phone Number: + 33 2 32 88 80 48

Fax: +33 2 32 88 86 46

E-Mail: annie.laquerriere@chu-rouen.fr

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Authors' contributions

FM, BG and AL designed the study. FS, PM and SM collected the clinical data. FM and AL performed and interpreted the pathological analyses. CL and MB performed immunohistochemical and confocal analyses and FM and AL analyzed the results. FM and AL wrote the manuscript. BG and SM critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding : This work was supported by the Rouen University Hospital, the Normandy University, the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM; UMR1245), the *Fondation de France*, the *Fondation de l'Avenir* and the *Agence Nationale de la Recherche (ANR)*. MB is a recipient of a fellowship from the French Research Ministry.

Key words: Oligodendrocyte precursors, PDGFR- α , Olig2, Myelination defects, Human fetal brain, Fetal alcohol syndrome, Immunohistochemistry

Running title: Fetal Alcohol Syndrome and Oligodendrocyte lineage

Abstract

Prenatal alcohol exposure is a major cause of neurobehavioral disabilities. MRI studies in humans have revealed that alcohol is associated with white matter microstructural anomalies but these studies have focused on myelin abnormalities only after birth and no data concerning the generation of oligodendrocyte precursors have been reported so far. As data are lacking in humans and alcohol is known to impair oligodendrocyte differentiation in rodents, the present study aimed at evaluating by immunohistochemistry PDGFR- α and Olig2 expression in the ganglionic eminences and the frontal cortex of fetuses exposed to alcohol from 15 to 37 weeks' gestation by comparison with age-matched controls. Before birth, PDGFR- α expression was strongly increased in the ganglionic eminences and the cortex of all fetuses exposed to alcohol except for the earliest stage. No massive generation of Olig2 immunoreactive cells was identified in the ganglionic eminences until the end of the pregnancy and the density of Olig2-positive cells within the cortex was consistently lower by comparison with unexposed to alcohol fetuses. This study further provides evidence that there is major oligodendrocyte lineage impairment at all stages of brain development upon prenatal exposure including defective or delayed generation and maturation of oligodendrocyte precursors.

Introduction

Prenatal alcohol exposure (PAE) is a major non genetic cause of central nervous system (CNS) abnormalities resulting in irreversible life-long consequences which associate mental retardation or more specific neurocognitive disorders and behavioural disabilities (1). The diagnosis of Fetal Alcohol Syndrome (FAS), the most severe form of fetal alcohol spectrum disorders (FASD), is based on three characteristics including growth retardation, craniofacial dysmorphism and CNS dysfunction. Children with FASD often suffer from motor delays, deficits in attention, learning and memory as well as in executive functioning and language, but they do not present the characteristic craniofacial dysmorphism and growth retardation (2).

In the mature brain, heavy chronic or binge drinking is responsible for a variety of brain injuries, notably a disproportionate loss of cerebral white matter, as glial cells are major targets of alcohol, which accounts for white matter atrophy. Alcohol has not only teratogenic properties but also devastating neurotoxic effects on the developing brain. Over the last decade, imaging studies with diffusion tensor imaging (DTI) have revealed changes in the organization and microstructure of callosal white matter with diffusion abnormalities extending beyond the corpus callosum in individuals with FASD, suggesting that several specific white matter regions, especially commissural, cingular and temporal connections along with deep grey matter areas are sensitive to PAE (3, 4, 5, 6). Microstructural abnormalities as assessed by fractional anisotropy occur throughout the corpus callosum and have been correlated with impaired cognition (7). In a recent MRI study, it has been suggested that PAE was associated with reduced white matter microstructural integrity from the neonatal period (8). Whereas all these studies have focused on newborns, children and adolescents with FASD, no human antenatal data concerning the generation of

oligodendrocytes (OLs) in FAS or FASD have been reported so far, especially as alcohol has been shown to impair astrocyte and oligodendrocyte differentiation and to increase apoptosis during rodent brain development (9). As imaging studies indicate widespread white matter fiber tract anomalies in children and adults with FASD, it has been emphasized that PAE likely impacts on the programming of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) (10, 11). In the CNS, myelin is formed by processes emanating from OLs which are engaged or are preparing to engage in myelination (12, 13). Myelination is one of the final stages of brain development, and apart from the brainstem and cerebellum which are progressively myelinated from the second half of the pregnancy, this process takes place mainly during the first 30 years of postnatal life in humans (3, 14, 15).

OLs originate from neural stem cell-derived OPCs which express platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR- α), then differentiate into immature premyelinating OLs (pre-OLs) expressing oligodendrocyte lineage factor 4 and eventually into mature OLs expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein, phospholipid protein and myelin basic protein (MBP) which contact axons and begin to produce myelin (12, 16). Proliferating neural stem cells commit to the OL lineage under the influence of the transcription factors Olig1, Olig2, Nkx2.2, and Sox10 (16, 17). *In vitro* studies have also revealed a primary role of Sonic Hedgehog (Shh) signalling by promoting expansion and specification of multipotent progenitors into Olig2-positive late OPCs and immature OLs (18).

In rodents, the first wave of OPCs originates in the anterior entopeduncular area followed by 2 other waves arising from the lateral and caudal ganglionic eminences (LGE and CGE) (19). Besides, OPCs require vessels as a physical substrate for migration and it has been demonstrated that human OPCs emerge from progenitor domains and associate with the abluminal endothelial surface of blood vessels, *via* Wnt-Cxcr4 (chemokine receptor 4) allowing them to crawl along and jump between vessels (20).

PDGF signalling is essential for controlling the proliferation and differentiation of OPCs (21) which express a characteristic set of markers including PDGFR- α , these cells being mitotic and therefore considered as progenitors/precursors. The first PDGFR- α expressing cells have been identified in the forebrain of human fetuses 10 WG onwards, and are predominantly produced in higher numbers in the ganglionic eminences (GE) around 15 WG (22). In monkeys and humans, OPCs have been shown to be also produced in the outer subventricular zone just when the upper layer neurons are generated, allowing for the rapid expansion and folding of the cortical surface (23). PDGFR- α is rapidly downregulated when OPCs differentiate into non proliferating OLs, contrary to the oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (Olig2) which is expressed in OPCs, pre-OLs and OLs, increase in OL number during development depending on OPC proliferative capacities (24, 25). OL lineage progression in cerebral white matter occurs similarly in humans and in rodents, being mostly composed by pre-OLs around 18–27 weeks of gestation in humans and of increasingly abundant MBP-positive cells in full-term infants (26).

As human antenatal data concerning the generation and differentiation of OLs upon PAE are lacking and as alcohol impairs OL differentiation, the present study aimed at evaluating by immunohistochemical techniques PDGFR- α and Olig2 expression in the GE and CP of fetuses with PAE by comparison with age-matched controls.

Patients and methods

Patients

As previously reported (27), the brains used in this study belong to the collection which has been declared to the French Ministry of Health (collection number DC-2015-2468, cession number AC-2015-2467, located in A. Laquerrière's Pathology Laboratory, Rouen University hospital). For all selected cases, the parents gave their consent for

neuropathological studies following autopsy performed in agreement with our local ethic committee and in accordance with the French law.

Ten fetal control brains ranging from 16 to 36 WG for whom main clinical and morphological characteristics are presented in table 1 were selected. In 6 out of the 10 cases, a medical termination of pregnancy (TOP) was carried out for pathologies other than cerebral. Two out of the 10 cases were *in utero* fetal death (IUFD), two cases were *perpartum* or immediate *postpartum* death with a cause other than cerebral or with no found cause after careful examination of the placenta and fetal organs. In all cases, the brain was macroscopically and microscopically free of detectable abnormalities. Despite the absence of lesions, patients who had been antenatally suspected of central nervous system anomalies or who had been clinically suspected of dying of neurological causes were systematically excluded.

Fourteen fetal FAS or FADS brains ranging from 15 to 37 WG were also included in this study. Detailed clinical and morphological characteristics are presented in table 2. Causes of death were IUFD in 6 cases, TOP for fetal malformations in 7 cases and post-natal early death in one case.

Methods

In each control and FADS patient, a complete autopsy had been performed with the written consent of the parents and according to standardized protocols (28). Developmental age was evaluated by means of organ weights (29), skeletal measurements and by the histological maturational stages of the different viscera.

Neuropathological studies

Brain growth was evaluated according to the biometric data of Guihard-Costa and Larroche (30). Macroscopic evaluation of gyration was performed according to the atlas of Feess-Higgins and Larroche (31). After fixation into a zinc-10% formalin buffer solution for at least one month, brain sections were obtained from all cortical areas and subcortical structures including thalamus, striatum, pallidum and their related nuclei. Seven-micrometer paraffin embedded sections were stained using Haematoxylin-Eosin. The morphology of all different brain structures studied was consistent with the patients' ages.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses of OPCs and pre-OLs were carried out on six-micrometer sections obtained from paraffin-embedded material according to standardized protocols using antisera directed against Olig2 (Rabbit polyclonal, 1/200 ; Clinisciences, Nanterre, France) and anti-PDGFR- α (Rabbit polyclonal, 1/100 ; Thermofisher Scientific F67403 Illkirch Cedex, France). Immunohistochemical procedures included a microwave pre-treatment protocol to aid antigen retrieval (pre-treatment CC1 kit, Ventana Medical Systems Inc, Tucson AZ). Incubations were performed for 32 minutes at room temperature using the Ventana Benchmark XT system. After incubation, slides were processed by means of the Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana). Semi-quantitative analyses of the density in Olig2 and PDGFR- α positive cells in the GE as well as in the different layers of the frontal CP were evaluated as follows: 0: no cell labelled; +: less than 10% of cells labelled; ++: between 10 and 25% of cells labelled; +++: between 25 and 50% of cells labelled and ++++: more than 50% of the cells labelled.

Confocal analyses

In order to identify more precisely the different populations Olig2-positive within the GE and CP, double immunolabellings were performed using Olig2 and either PDGFR- α , GABA MAP2 or GFAP in the frontal cortex at 15-16 WG, a developmental stage in which some Olig2 positive could belong to other lineages than OL. Fluorescent-conjugated antibodies Alexafluor-488 and -592 were obtained from Molecular Probes (Eurogene, Or, USA). After 3 gentle washes in a phosphate buffer solution, coverslips were mounted in DAPI-containing Vectashield (Vector laboratories, Cambridgeshire, UK) and images were acquired with the Leica laser scanning confocal microscope TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Analyses en cours

Results

FAS Patient's clinical and morphological characteristics

Among the 14 cases exposed to alcohol, 3 (21%) had an intra uterine growth retardation (IUGR). All but 2 cases (86%) had cranio-facial dysmorphism which was characteristic of FAS in half of these cases, associating short palpebral fissures, smooth and prominent philtrum, thin upper lip hypo- or hypertelorism with epicanthus, marked nasal bridge and anteverted nostrils, midface hypoplasia and micrognathia . Five cases (36%) had microcephaly with a brain weight $\leq 3^{\text{rd}}$ percentile. Nine cases (57%) had other CNS anomalies: myelomeningocele with Chiari II malformation, arhinencephaly, polymicrogyria or neuronal heterotopias and vermis hypoplasia. Clastic lesions consisted of massive cerebellar haemorrhage, cerebellar hemispheric necrosis, bilateral intraventricular haemorrhage, septal agenesis, diffuse astrogliosis and brain oedema. Five cases (36%) had associated visceral

anomalies: anterior coelosomia, hydronephrosis, unilateral pelvic dilatation, tetralogy of Fallot). Amniotic fluid inhalation was diagnosed in 1 case.

In 7 cases, alcohol intake was self-reported by the mother (50%), consisting in daily chronic alcohol intake, associated with binge drinking in 3 cases. In the other 7 cases, maternal alcohol intake was clinically suspected according to the criteria established by Riley et al. (32). Ten mothers (71%) had co-morbidities consisting either of multidrug addiction, antiepileptic drugs or psychotic traits. Among the 7 seven cases in which alcohol intake was suspected, 1 case had FAS craniofacial dysmorphism, IUGR and microcephaly with additional CNS anomalies; 1 case had FAS cranio-facial dysmorphism and microcephaly and 1 case had cranio-facial dysmorphism resembling the FAS dysmorphism associated with IUGR. Two cases had CNS anomalies with FAS craniofacial dysmorphism. One case had FAS craniofacial dysmorphism, microcephaly and CNS anomalies and 1 case had microcephaly with CNS anomalies and craniofacial dysmorphism reminiscent of FAS, although not characteristic.

Semi-quantitative analysis of PDGFR- α and Olig2 immunohistochemistry in the cortical plate and ganglionic eminences

Semi quantitative evaluation of PDGFR- α and Olig2 immunolabellings are summarized in Figure 1 and in Table 3.

PDGFR- α expression was strongly increased in the GE and in the CP of all FASD brains in comparison with controls whatever the developmental stage with the exception of the earliest stage (Figure 1A and 1B). Indeed, at 15-16 WG, PDGFR- α expression remained lower in the MGE, LGE and CP of the FASD brain contrary to the control (Figures 2A, B, C and D) in which more than 60% of the cells were observed. From 20 WG, PDGFR- α cell

numbers were higher than in controls in all structures studied (Figure 2E, F, G, H, I, J, K and L).

At 16 WG, more than 60% Olig2-positive precursors and pre-OLs were identified in the MGE and LGE of the control brain, whereas Olig2-positive cells were scarce in the FASD brain (Figure 3A and B). Moreover, Olig2 immunoreactivity was essentially identified in the MGE of the FASD brain and not yet in the LGE. Between 15 and 24 WG, Olig2-positive cell density was drastically reduced in the GE of FASD brains (Figure 3C, D, E and F), and remain low until the regression of GE that occurs around 34 WG. No massive generation of Olig2 immunoreactive cells was identified in FASD brains until the end of the pregnancy, except for three small peaks of generation in FASD brains between 24 and 30 WG (Figure 1C, 3G and H), contrary to controls in which a major production was observed between 16 and 24 WG.

At all developmental stages, the density of Olig2-positive cells within the CP was consistently higher in each control brain in comparison with FASD brains (Figure 1D and Figure 4), with the highest density in the control cortical plate (around 80% of the cells) observed at 16 WG, contrasting with the paucity of immunolabelled cells in FASD (Figure 4A and B).

Confocal analyses

At early stages, we observed a diffuse and intense immunolabelling of cells with Olig2 antibody. As Olig2 is known to be also expressed in immature interneurons and in a subpopulation of astrocytes, we performed double immunolabellings using Olig2, GABA, MAP2 and GFAP to evaluate more precisely the percentage of Olig2-positive OPCs.

Analyses en cours

Discussion

In living individuals with FASD, imaging studies have revealed lower white matter volumes and sometimes complete lack of myelination of major white matter tracts in the brain of as well as white matter microstructure alterations (11, 13). However, the impact of alcohol on oligodendrocyte lineage and by extension on myelination has essentially been studied using *in vitro* experiments or animal models. Alcohol can disrupt myelination at any stage of OL development but targets particularly OPCs which are more vulnerable to excitotoxic damage, free radicals and proinflammatory cytokines than mature OLs (13+33). Furthermore, it has been shown in a study performed on primary mouse OL cultures that acetaldehyde, the metabolic byproduct of alcohol is lethal to OLs which are much more sensitive to acetaldehyde than to alcohol, particularly upon long-term alcohol exposure (34).

To our knowledge, no study concerning the effects of alcohol during human brain development has focused on OPC production from the GE. Nevertheless, using *in vivo* and *in vitro* mouse models, it has been demonstrated that alcohol hinders basal progenitor proliferation in the VZ/SVZ of the cortex by interfering with the cell cycle at G1-S transition from early development (35). It might be therefore suggested that a similar mechanism occurs in the LGE and CGE, which could explain defective or delayed production of OPCs during fetal life. A study performed in fetal macaque brains exposed to alcohol has revealed that the decrease in OLs observed in comparison with control brains was linked to massive apoptosis. A single *in utero* alcohol exposure triggered widespread acute apoptotic death of OLs throughout white matter regions at a rate higher than 12 times in alcohol-exposed macaque brains compared to the physiological OL apoptosis rate. Moreover, this study highlighted the fact that OLs also become sensitive to the apoptogenic effect of alcohol at the time they are beginning to generate myelin constituents in their cytoplasm, i.e, when they become positive for MBP and negative for PDGFR- α (12). From this study, it could be suggested that in

addition to a defective and/or delayed generation of OPCs, apoptosis also likely contributes to the decrease of Olig2 positive cells observed in human FASD brains. Epigenetic mechanisms could play an additional role in cell fate specification of brain precursor cells as alcohol is known to induce an oxidative stress that alters gene expression in particular Shh which promotes expansion and specification of multipotent progenitors into OPCs and immature OLs (18, 36). Upon alcohol exposure, several other signalling pathways through which alcohol may directly disrupt OPC differentiation and survival have also been implicated, such as PDGFR α , Wnt3a and Wnt5a which regulate OL cell fate specification, differentiation and proliferation (37, 38, 39). The increase in PDGFR- α positive OPCs observed in our study could be therefore related to a deregulation of Wnt signalling, preventing OPCs from progressing towards OL differentiation.

Whereas changes in OL morphology, maturation, differentiation and survival have been reported in third trimester-equivalent preclinical models of FASD (12, 40, 41), very little is known about the deleterious effects of alcohol on OL lineage derived from distinct telencephalic germinal zones (10, 42). In a recent study, Newville et al. found a drastic decrease in the number of mature OLs and proliferating OPCs within the corpus callosum of alcohol-exposed mice at postnatal day 16, but neither mature OLs nor OPCs derived from the postnatal subventricular zone (SVZ) were numerically affected, indicating ontogenetic heterogeneity in susceptibility to alcohol (43). Several studies performed in rodents have demonstrated that myelination is delayed upon PAE, consisting in a weak expression of MBP, reduced myelin thickness and myelin alterations at the ultrastructural level, which impair the formation of neuronal circuits and conduction of neuronal signals (10, 44). Another mechanism which regulates the formation of myelin around axons consists in interactions between OPCs which receive excitatory and inhibitory inputs mediated by glutamate and GABA, and developing axons. Recent studies have demonstrated that a significant proportion

of gray matter myelin in the cortex forms on the axons of local inhibitory interneurons in both rodents and humans (45, 46). During development, GABA likely acts as a local environmental cue to control myelination and thus influences the conduction velocity of action potentials in the CNS. Nevertheless, data remain controversial since endogenous GABA by interacting with GABA_A receptors has been shown either to increase or to decrease proliferation, apoptosis and consequently oligodendrocyte numbers, as well as shortening internode length, which allows for faster saltatory conduction velocities. Similar discrepancies have also been observed regarding glutamate which blocks proliferation and progression of OPCs but also promotes myelin formation (47, 48).

It has long been acknowledged that in rodents, Olig2 expressing progenitors in the MGE give rise to GABAergic interneurons at early developmental stages and oligodendrocytes thereafter (49). In humans, Olig2 has been mainly detected in the proliferative zones of the ganglionic eminences between 5–15 post-conceptual weeks prior to the expression of oligodendrocyte precursor markers. By 20 WG, these cells spread throughout the cortex, and co-express markers for immature neurons, neurogenic radial glia and intermediate progenitors (22, 50). Using immunohistochemistry on 8–12 post-conceptual weeks' human sections, it has recently been found that Olig2 immunoreactivity was observed in GABAergic cells of the proliferative zones of the MGE and septum (51). In the present study, the detection of more than 60% of Olig2 immunoreactive cells at early stage could correspond to OPCs admixed with other nerve cell populations.

Interprétations en cours

Conclusion:

The present study provides further evidence that there is major oligodendrocyte lineage impairment at all stages of brain development upon PAE, consisting in defective/delayed generation, migration and maturation of oligodendrocyte precursors. Since oligodendrocyte

development and myelin are a target of alcohol, the disruption of oligodendrocyte differentiation and of myelination process are very likely responsible for inadequate establishment of neuronal networks, inefficient conduction of neuronal signals and thereby account in association with GABA interneuronopathy for the developmental encephalopathy and subsequent life-long neuro-behavioural disabilities.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

Abbreviations

CNS: Central Nervous System

CP: Cortical Plate

DTI: Diffusion Tensor Imaging

FAS: Fetal Alcohol Syndrome

FASD: Fetal Alcohol Spectrum Disorder

GE: Ganglionic Eminences

IUFD: *In Utero* Fetal Death

IUGR: Intra Uterine Growth Retardation

LGE: Lateral Ganglionic Eminence

MBP: myelin basic protein

MGE: medial ganglionic eminence

OLs: oligodendrocytes

Olig2: Oligodendrocyte lineage transcription factor 2

OPCs: oligodendrocyte precursor cells

PAE: Prenatal Alcohol Exposure

PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor alpha

Pre-OL: Pre-oligodendrocyte

Shh: Sonic Hedgehog

SVZ: subventricular zone

TOP: termination of the pregnancy

VZ: ventricular zone

WG: weeks of gestation

References

- 1- Roozen S, Peters GY, Kok G, et al. Systematic literature review on which maternal alcohol behaviours are related to fetal alcohol spectrum disorders (FASD). *BMJ Open* 2018; 8(12):e022578
- 2- Riley EP, McGee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(6):357-65
- 3- Lebel C, Rasmussen C, Wyper K, et al. Brain diffusion abnormalities in children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32(10):1732-40
- 4- Norman AL, Crocker N, Mattson SN, et al. Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders. *Developmental disabilities research reviews* 2009;5:209–217
- 5- Lebel C, Roussotte F, Sowell ER. Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. *Neuropsychology Review* 2011; 21:102–118
- 6- Moore EM, Migliorini R, Infante MA, et al. Fetal alcohol spectrum disorders: recent neuroimaging findings. *Curr Dev Disord Rep* 2014;1:161–72
- 7- Wozniak JR, Muetzel RL, Mueller BA, et al. Microstructural corpus callosum anomalies in children with prenatal alcohol exposure: an extension of previous diffusion tensor imaging findings. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2009;33:1825–35
- 8- Donald KA, Roos A, Fouche JP, et al. A study of the effects of prenatal alcohol exposure on white matter microstructural integrity at birth. *Acta Neuropsychiatr* 2015;27(4):197-205
- 9- Young C, Roth KA, Klocke BJ, et al. Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2005;20(2):608-14
- 10- Guizzetti M, Zhang X, Goeke C, et al. Glia and neurodevelopment: focus on fetal alcohol spectrum disorders. *Front Pediatr* 2014;2:123
- 11- Wilhelm CJ, Guizzetti M. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. *Front Integr Neurosci* 2016;9:65
- 12- Creeley CE, Dikranian KT, Johnson SA, et al. Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain. *Acta Neuropathol Commun* 2013;1:23
- 13- Rice J, Gu C. Function and mechanism of myelin regulation in alcohol abuse and alcoholism. *Bioessays* 2019;41(7):e1800255
- 14- Bartzokis G, Lu PH, Heydari P, et al. Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biol Psychiatry* 2012;72(12):1026-34
- 15- Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, et al. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 2013;77(5):873-85

- 16- Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 2010;330(6005):779-82
- 17- van Tilborg E, de Theije CGM, van Hal M, et al. Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*. 2018;66(2):221-238
- 18- Ortega JA, Radonjić NV, Zecevic N. Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front Cell Neurosci* 2013;7:254
- 19- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, et al. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 2006;9(2):173-9
- 20- Tsai HH, Niu J, Munji R, et al. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 2016;351(6271):379-84
- 21- Collarini EJ, Pringle N, Mudhar H, et al. Growth factors and transcription factors in oligodendrocyte development. *J Cell Sci Suppl* 1991;15:117-23
- 22- Jackocevski I, Filipovic R, Mo Z, et al. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 2009;3:5
- 23- Rash BG, Duque A, Morozov YM, et al. Gliogenesis in the outer subventricular zone promotes enlargement and gyrification of the primate cerebrum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(14):7089-7094
- 24- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, et al. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 2008;11(12):1392-401
- 25- Egawa N, Shindo A, Hikawa R, et al. Differential roles of epigenetic regulators in the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 2019;67(4):718-728
- 26- Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(9):1917-29
- 27- Marguet F, Friocourt G, Brossolo M, Sauvestre F, et al. Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans. *Acta Neuropathol Commun* 2020; *In press*
- 28- Haute Autorité de santé. Protocole type d'examen autopsique foetal ou néonatal - juin 2014. *Ann Pathol*. 2014;34(6):415-33
- 29- Guihard-Costa AM, Ménez F, Delezoide AL. Organ weights in human fetuses after formalin fixation: standards by gestational age and body weight. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5: 559-78
- 30- Guihard-Costa AM, Larroche JC. Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. *Early Hum Dev* 1990; 23:27-40

- 31- Feess-Higgins A, Larroche JC. Development of the human fetal brain. (Masson, ed) Paris, INSERM CNRS 1987
- 32- Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev* 2011;21(2):73-80
- 33- Back SA, Gan X, Li Y, et al. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998;18(16):6241-53.
- 34- Coutts DJ, Harrison NL. Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 2015;39(3):455-62
- 35- Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, et al. Ethanol induces cytoostasis of cortical basal progenitors. *J Biomed Sci.* 2016;23:6
- 36- Ehrhart F, Roozen S, Verbeek J, et al. Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. *Mol Psychiatry.* 2019;24(1):10-17
- 37- Luo J, Miller MW. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res Brain Res Rev* 1998;27(2):157-67
- 38- Ille F, Sommer L. Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(10):1100-8
- 39- Vangipuram SD, Lyman WD. Ethanol affects differentiation-related pathways and suppresses Wnt signaling protein expression in human neural stem cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36(5):788-97
- 40- Dalitz P, Cock M, Harding R, et al. Injurious effects of acute ethanol exposure during late gestation on developing white matter in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:391–9
- 41- Zoeller RT, Butnariu OV, Fletcher DL, et al. Limited postnatal ethanol exposure permanently alters the expression of mRNAs encoding myelin basic protein and myelin-associated glycoprotein in cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:909–16
- 42- Guerri C, Pascual M, Renau-Piqueras J. Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* 2001;22:593–9
- 43- Newville J, Valenzuela CF, Li L, et al. Acute oligodendrocyte loss with persistent white matter injury in a third trimester equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. *Glia* 2017;65(8):1317-1332
- 44- Ozer E, Sarioglu S, Güre A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol* 2000;19(1):21-5
- 45- Micheva KD, Wolman D, Mensh BD, et al. A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *Elife* 2016;5:e15784

- 46- Stedehouder J, Couey JJ, Brizee D, et al. Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. *Cereb Cortex* 2017;27(10):5001-5013
- 47- Zonouzi M, Scafidi J, Li P, et al. GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nat Neurosci.* 2015;18(5):674-82
- 48- Hamilton NB, Clarke LE, Arancibia-Carcamo IL, et al. Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia* 2017;65(2):309-321
- 49- Miyoshi G, Butt SJB, Takebayashi H, et al. Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 2007;27:7786–7798
- 50- Jakovceski I, Zecevic N. Olig transcription factors are expressed in oligodendrocytes and neuronal cells in the human fetal CNS. *J Neurosci* 2005;25:10064–10073
- 51- Alzu'bi A, Lindsay S, Kerwin J, et al. Distinct cortical and sub-cortical neurogenic domains for GABAergic interneuron precursor transcription factors NKX2.1, OLIG2 and COUP-TFII in early fetal human telencephalon. *Brain Struct Funct* 2017;222(5):2309-2328

Figure legends

Figure 1: Schematic representation of PDGFR- α and Olig2 expressing cells in the GE and CP of FASD and control brains

A: Semi-quantitative evaluation of PDGFR- α immunoreactive OPCs in the GE displaying a delayed production at 16 WG and an increased density until the physiological disappearance of GE by comparison with control brains

B: As well as in the cortical plate of all FASD brains compared to normal brains from 20 WG which persisted until 37 WG.

C: Semi-quantitative evaluation of Olig2-expressing OPCs and preOLs in the GE in which the density of Olig2 immunoreactive cells was drastically reduced up to 24 WG in FASD brains, followed by an increasing trend to the production/differentiation between 24 and 30 WG (arrows) in the FASD brains though the number of OPCs and preOLs remained low until regression of GE by 34 WG by comparison with control brains

D: In the cortical plate a lower density of Olig2-expressing cells in all FASD brains was observed regardless of the developmental stage compared with control brains

(Dotted blue lines: control brains; dotted red line: PAE exposed brains; black triangles: second FASD case available at a given stage).

Figure 2: PDGFR- α immunoreactivities in the GE and CP of FADS and control brains

A and B: Lower densities of PDGFR- α expressing OPCs in the GE of FASD brain at 15 WG by comparison with the control GE aged 16 WG in which most of the cells were immunolabelled (OM X20)

C and D: with a similar pattern observed in the CP of FASD and control brain

E and F: But from 20 WG, higher densities of PDGFR- α expressing OPCs in the GE of FASD brain compared with the control brain (OM X20)

G and H: As observed in the CP

I and J: With the same pattern found at 30 WG in the GE (OM X20)

K and L: and in the CP

(OM: original magnification; scale bar: 0.35mm)

Figure 3: Olig2 immunoreactivities in the GE of FADS and control brains

A and B: Lower densities of Olig2 expressing cells in the GE of FASD brain at 15 WG by comparison with the GE of the control brain at 16 WG in which more than 50% of Olig2 positive cells were observed

C and D: The most striking differences between FASD and control GE being observed at 22 WG

E and F: Similar differences, though less pronounced, were also noted at 24 WG in the FASD brain (case 5) compared to the control

G and H: contrary to what noted in the FASD brain (case 6), in which an intense immunoreactivity was observed arguing for a delayed production/differentiation starting from this term

Figure 4: Olig2 immunoreactivities in the CP of FADS and control brains

A and B: Significantly lower densities of Olig2-positive cells in FASD brains compared to control brain at 15-16 WG (OM X10)

C and D: with a similar pattern observed at 20 WG (OM X10)

E and F: At 30 WG, Olig2-positive cells remained scarce in the FASD brain contrary to the control, in which Olig2-positive cells were located in all layers of the cortical plate (OM X20)

G and H: With an increase in density in the superficial layers at 33 WG in the control cortical plate only (OM X20)

(Scale bar: 0.35mm)

Figure 1

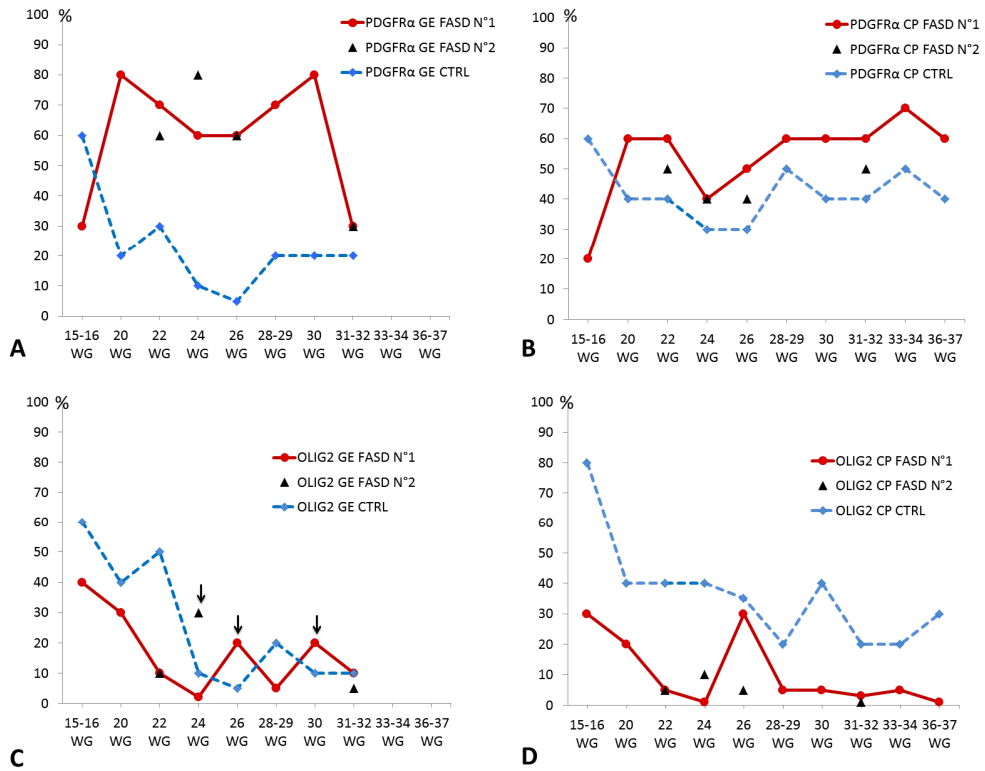


Figure 2

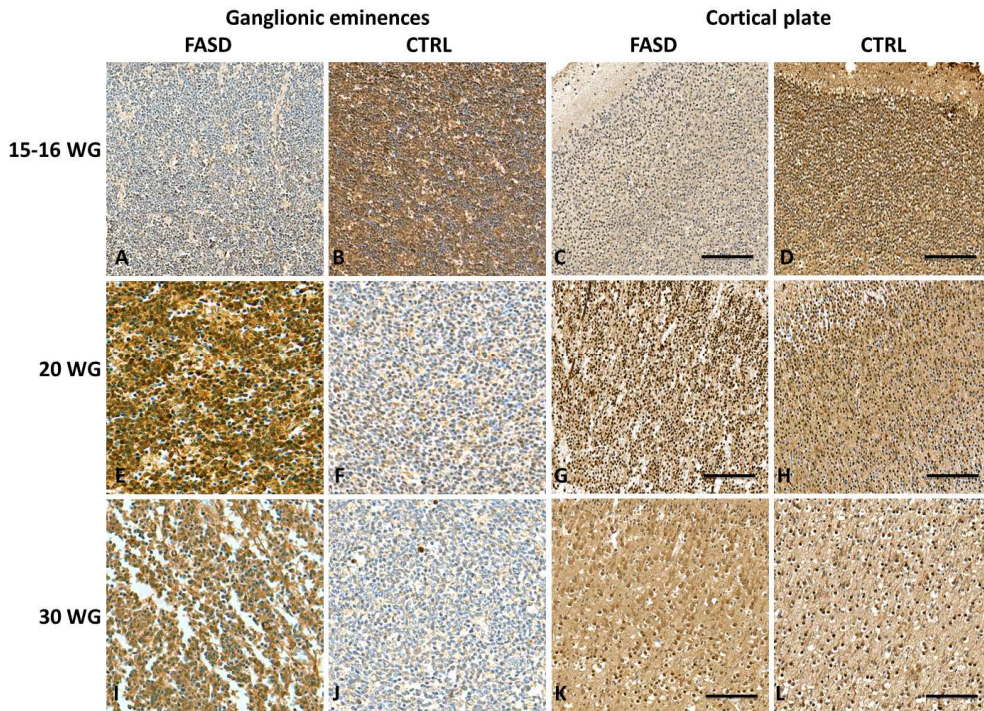


Figure 3

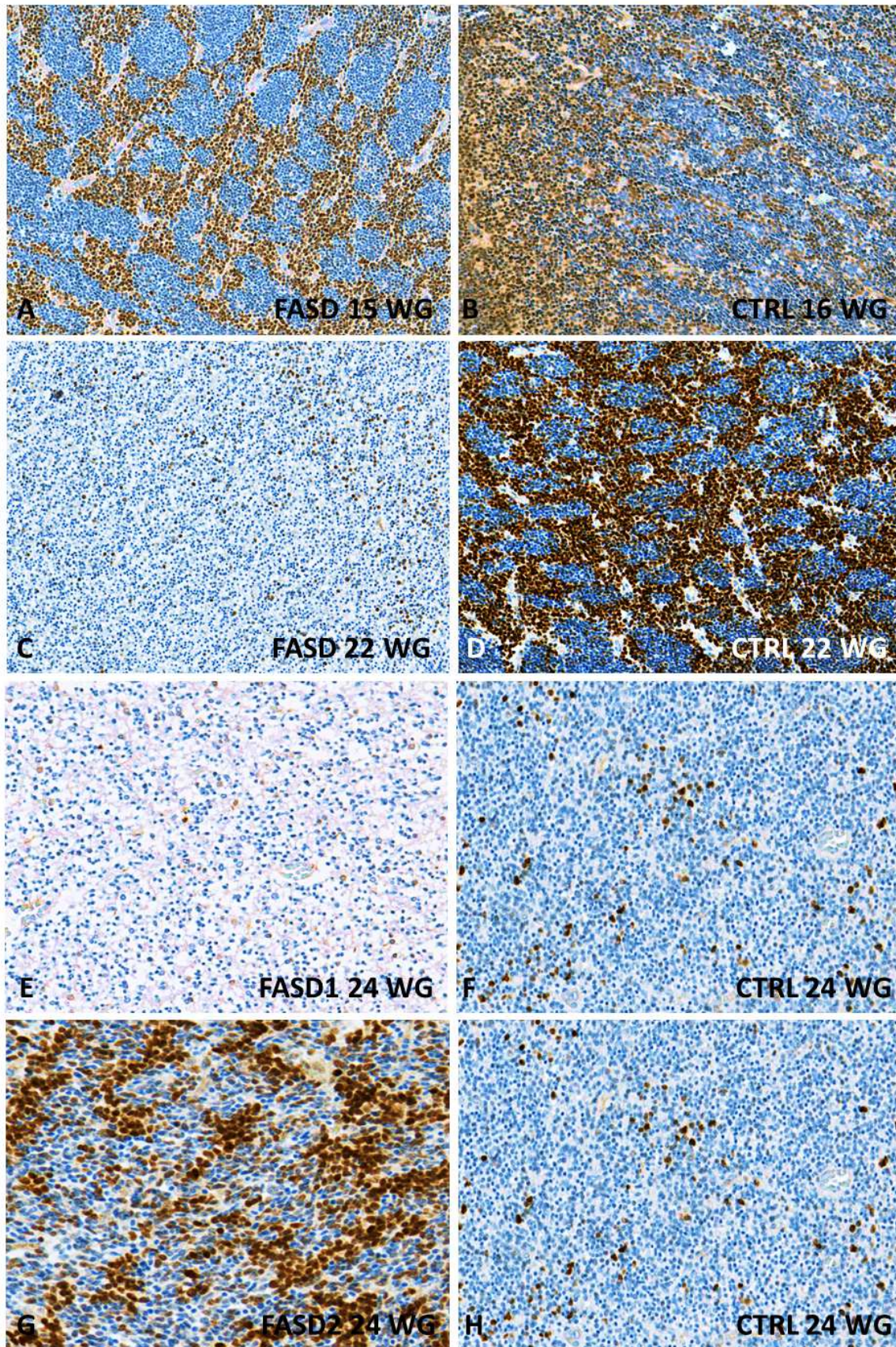


Figure 4

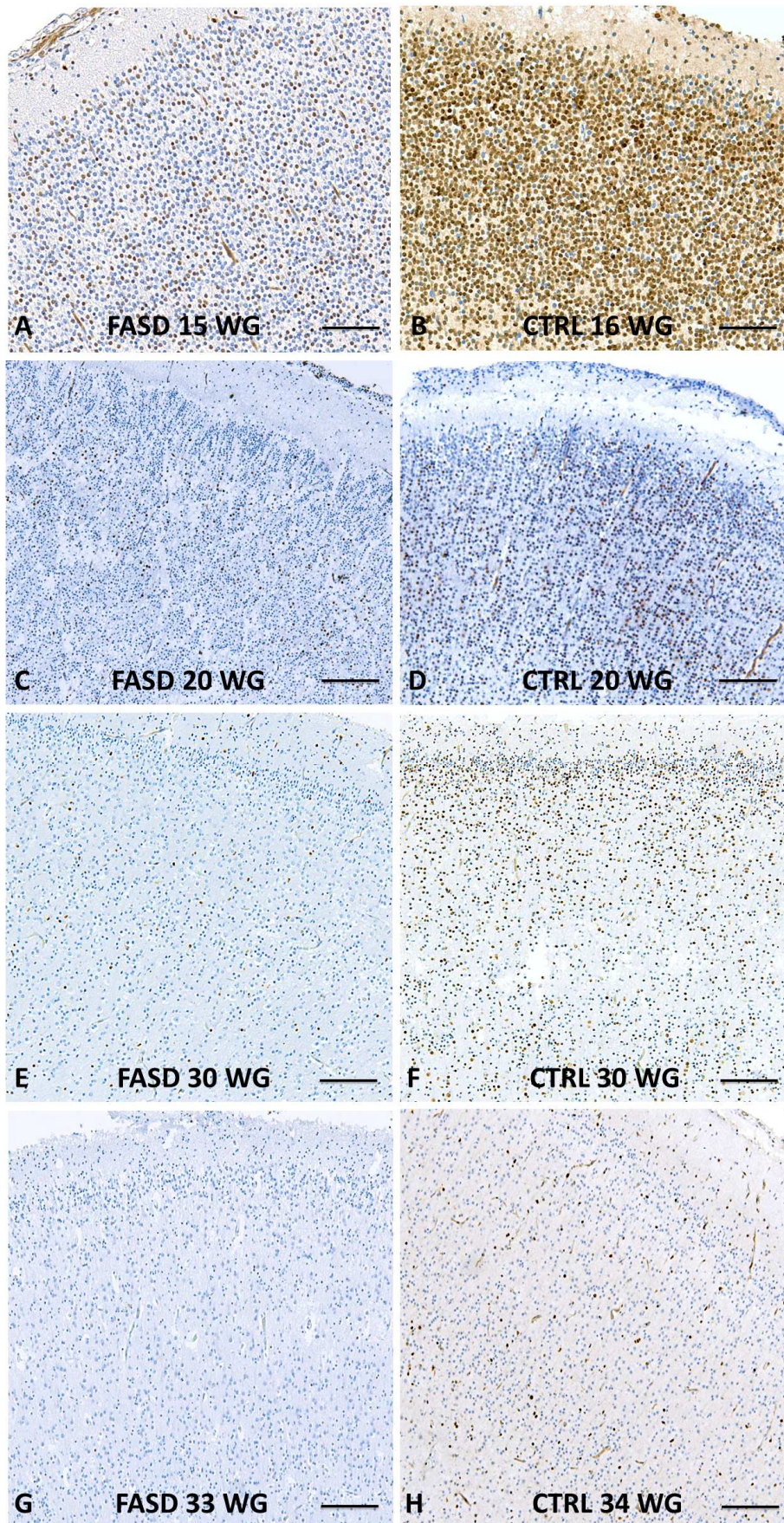


Table 1. Gestational age and cause of death of selected control cases

Case number	Term	Cerebral maturation*	TOP	Cause of death
1	16 WG	16 WG	Yes	Isolated sacral myelomeningocele
2	22 WG	20 WG	No	IUFD
3	22 WG	22 WG	Yes	Obstructive uropathy
4	24 WG	24 WG	No	IUFD
5	26 WG	26 WG	Yes	Hereditary bilateral microphthalmia
6	28 WG	28 WG	Yes	Severe distal arthrogyriposis
7	30 WG	30 WG	No	Cord prolapse
8	32 WG	32 WG	Yes	Complex cardiac malformation
9	34 WG	34 WG	Yes	Suspected vermis hypoplasia (Not confirmed)
10	36 WG	36 WG	No	Dilated cardiomyopathy Dead at day 2

IUFD: *in utero* fetal death; TOP: Medical termination of pregnancy; WG: weeks of gestation
* According to the morphometric criteria of Guihard-Costa and Larroche (30).

Table 2. Main clinical and morphological characteristics of antenatal alcohol exposed fetuses

Case number	WG	Cause of death	Body weight	Cranio-facial dysmorphism	Brain weight	Visceral anomalies	CNS anomalies	Maternal alcohol intake	Maternal Co-morbidity
1	15	TOP	25 th percentile	Indistinct philtrum Low set posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 15.8 g	Anterior coelosomia	No	Chronic alcohol intake*	Heroin Methadone
2	20	TOP Maternal distress	10 th percentile	Midface hypoplasia, short nose, flat face	25 th percentile 39.34 g	No	No	Chronic alcohol intake and Binge drinking* (ND)	HIV, Hepatitis C Multi-drug addiction
3	22	TOP Chiari malformation	<3 rd percentile IUGR	FAS craniofacial dysmorphism	<<3 rd percentile 45.65g	Renal hydronephrosis	Microcephaly Arnold Chiari II Myelomeningocele	Chronic alcohol intake**	Psychotic Disorder Valproate
4	22	TOP Maternal distress	3 rd percentile IUGR	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 63.5 g	No	No	Chronic alcohol intake (262 g per day) **	Psychotic Disorder psychotrop Increased MGV
5	24	TOP Amnion band sequence	NA	FAS craniofacial dysmorphism	50 th percentile 75g	NA	Micropolygyria Migration anomalies Vermis hypoplasia cerebellar hemisphere necrosis	Chronic alcohol intake**	Cocaine
6	24	TOP septal agenesis	50 th percentile	FAS dysmorphism	50 th percentile 100.3g	No	Arhinencephaly	Chronic alcohol intake**	Cannabis addiction
7	26	Spontaneous abortion	50 th percentile	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50 th percentile 133.6 g	Unilateral pelvic dilatation	No	Chronic alcohol intake**	ND

8	27	Preeclampsia Death at D10	10 th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	3 rd percentile 109 g	No		Microcephaly Massive cerebellar haemorrhage	Alcohol intake**	ND
9	29	IUFD cardiopathy	5 th percentile	Anteversed nostrils and pointed nose Ear anomalies Indistinct philtrum Retrognathism	5 th percentile 178 g	Tetralogy of Fallot	No		Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased and GGT MGV
10	30	IUFD Abruptio placentae	10 th percentile	No	50 th percentile 211 g	No		Bilateral intraventricular haemorrhage	Daily chronic alcohol intake*	Cannabis addiction Treated hypothyroidism
11	31	IUFD Preeclampsia	3 rd percentile IUGR	Ear anomalies Retrognathism	3 rd percentile 197.05 g	No		No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased and GGT MGV
12	31	TOP Septal agenesis	50 th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	50 th percentile 234 g	No		Septal agenesis	Chronic and Binge drinking*	Cannabis
13	33	IUFD Acute alcohol intoxication (maternal distress)	50 th percentile	No	50 th percentile 348.15 g	Amniotic inhalation	fluid	Diffuse astrogliosis	Chronic and Binge drinking* (4.98 g/L)	Multi-drug addiction Increased and GGT First pregnancy: IUFD at 33 WG One child alive with FAS.
14	37	IUFD	25 th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	<3 rd percentile 248 g	No		Neuron heterotopia Microcephaly	Chronic and Binge drinking**	Heroin addiction

CNS: central nervous system; GGT: gamma-glutamyl transferase; IUFD: *in utero* fetal death; IUGR: intra uterine growth retardation; MGV: mean globular volume; NA: not available; PN: post-natal; TOP: medical termination of the pregnancy; WG: weeks of gestation

* Maternal self report; ** suspected

Table 3: Semi-quantitative analysis of immunohistochemical data with PDGFR- α and Olig2 antibodies

Term	FASD/Ctrl	GE		CP	
		PDGFR- α	Olig2	PDGFR- α	Olig2
15 WG	FASD	30% +++	40% +++	20% ++	30% +++
16 WG	CTRL	60% +++++	60% +++++	>60% +++++	80% +++++
20 WG	FASD	80% +++++	30% +++	60% +++++	20% ++
	CTRL	20% ++	40% +++	40% +++	40% +++
22 WG	FASD 1	70% +++++	10% +	60% +++++	5% +
	FASD 2	60% +++++	10% +	50% +++	5% +
	CTRL	30% +++	50% +++++	40% +++	40% +++
24 WG	FASD 1	60% +++++	2% +	40% +++	1% +
	FASD 2	80% +++++	30% ++	40% +++	10% +
	CTRL	10% +	10% +	30% +++	40% +++
26 WG	FASD 1	60% +++++	20% ++	50% +++	30% +++
	FASD 2	60% +++++	NA	40% +++	5% +
	CTRL	5% +	5% +	30% +++	35% +++++
29 WG	FASD	70% +++++	5% +	60% +++++	5% +
28 WG	CTRL	20% ++	20% ++	50% +++	20% ++
30 WG	FASD	80% +++++	20% ++	60% +++++	5% +
	CTRL	20% ++	10% +	40% +++	40% +++++
31 WG	FASD 1	30% +++	10% +	60% +++++	3% +
	FASD 2	30% +++	5% +	50% +++	1% +
32 WG	CTRL	20% ++	10% +	40% +++	20% ++
33 WG	FASD	absent	absent	>60% +++++	5% +
34 WG	CTRL	absent	absent	50% +++++	20% ++
37 WG	FASD	absent	absent	60% +++++	1% +
36 WG	CTRL	absent	absent	40% +++	30% +++

CP: Cortical plate; CTRL: Control; FASD: Fetal alcohol spectrum disorder; GE: Ganglionic eminences; NA: Not analyzed

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Après l'obésité et le tabac, la consommation excessive d'alcool est la troisième cause de décès qui pourrait être prévenue dans le monde occidental, et si l'on prend en compte les décès secondaires à la prise d'alcool tels que les accidents et le suicide, le nombre de décès augmente d'un facteur 2, ce qui constitue un problème majeur de Santé Publique. Par ailleurs, la consommation excessive d'alcool, qu'elle soit chronique ou aigue (binge) favorise la survenue de complications au cours de certaines affections telles que l'hypertension artérielle, le diabète ou les maladies hépatiques. Le taux le plus élevé d'individus consommant de l'alcool selon un mode aigu ou chronique se situe chez les jeunes adultes entre 18 et 25 ans, période au cours de laquelle les femmes enceintes sont susceptibles d'exposer leur enfant à naître.

Chez l'adulte, les effets délétères de l'alcool sur le système nerveux résultent de son impact lésionnel sur les cellules hépatiques qui deviennent inaptes à détoxifier l'éthanol, ce qui ne permet plus de prévenir les effets toxiques de l'alcool et de ses métabolites sur les autres organes et le SNC. Les hépatocytes lésés produisent des composés métaboliques et inflammatoires qui induisent des lésions cérébrales structurales et fonctionnelles. A ces effets s'ajoute l'action toxique de cofacteurs tels que l'ammoniaque, ou les carences vitaminiques en folates, thiamine et pyridoxine ainsi que certaines molécules comme le zinc. Les études postmortem réalisées chez l'adulte ont montré que dans 75% des cas, la consommation d'alcool chronique ou aigüe associée à un déficit en thiamine provoque des lésions neurodégénératives. Ces lésions intéressent le néocortex, les noyaux gris centraux, le thalamus et l'hippocampe, et se traduisent cliniquement par un déclin progressif des fonctions cognitives par perte de la plasticité neuronale induite par une diminution de l'inhibition GABAergique et une augmentation de l'excitotoxicité glutamatergique. La substance blanche est également une cible préférentielle de l'alcool combiné à un déficit en thiamine. Une intoxication alcoolique aigüe provoque des lésions de l'ensemble des constituants à tous les niveaux du névraxe (neurones, glie, myéline et microcirculation cérébrale) ainsi que des lésions des nerfs périphériques et des muscles striés. Il est intéressant de noter qu'en cas d'intoxication alcoolique aigüe, (l'alcohol poisoning des anglo-saxons), les lésions morphologiques sont semblables à celles qui sont observées dans le syndrome de Leigh, la forme la plus caractéristique des encéphalopathies mitochondriales, et dans l'encéphalopathie de Wernicke qui comportent tous deux une vasculopathie avec lésions ischémiques secondaires en rapport avec un stress oxydatif. De même, la myélopathie secondaire à la dysfonction hépatique se traduit par des lésions bilatérales et symétriques de démyélinisation, telles qu'on peut les observer dans certains déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale et

qui ont été décrites sous le terme de « lésions clastiques » chez le fœtus. L'atrophie de la substance blanche est classiquement rapportée. Elle peut être diffuse, mais concerne en premier lieu le corps calleux et les faisceaux associatifs qui se connectent au cortex préfrontal et au cortex temporal et qui présentent des altérations de l'organisation et de la microstructure visualisées par des études de tractographie et par imagerie de la tension de diffusion [De la Monte, 2014 ; Wozniak et coll., 2019].

Si les conséquences de l'intoxication alcoolique aiguë ou chronique sur le SNC sont établies de façon précise chez l'adulte grâce à des études postmortem et d'imagerie, elles sont moins connues chez le fœtus et le nouveau né exposés à une alcoolisation anténatale et porteurs d'un FAS ou d'un FASD, puisqu'elles n'ont fait l'objet que de quelques publications. Néanmoins, à partir de l'étude neuropathologique la plus récente et la plus exhaustive effectuée par Jarmasz et coll. en 2017 ainsi que des études antérieures portant sur un nombre plus restreint de cas [Jones et Smith, 1973 ; Clarren, 1977 ; Clarren et coll., 1978, Wisniewski, 1983 ; Roebuck, 1998 ; Guerri, 2009 ; Jarmasz et coll., 2017] on remarque que les lésions induites par une PAE sont de nature très variée dont la plus fréquente est la micrencéphalie, alors que les anomalies de fermeture du tube neural, l'holoprosencéphalie, l'hydrocéphalie et les anomalies du corps calleux sont plus rarement observées au cours de la vie foetale et de la petite enfance. La diversité des lésions pourrait être en partie expliquée par une consommation maternelle simultanée de plusieurs substances addictives et/ou de médicaments ainsi qu'aux modalités variées de la consommation d'alcool qui ne permettent pas de déterminer clairement les relations de cause à effet dans la genèse des lésions. Enfin, ces études sont purement descriptives, et l'étude des mécanismes physiopathologiques chez l'humain n'ont fait, à notre connaissance, l'objet d'aucune publication.

L'étude des mécanismes physiopathologiques du FASD humain se heurte à de nombreuses difficultés en raison de la multiplicité et de la complexité des variables à prendre en compte, qu'il s'agisse des conditions socio-économiques, de l'état de santé de la mère, de ses carences alimentaires éventuelles, des modalités de consommation d'alcool et de la fenêtre d'exposition du fœtus à l'éthanol pendant la grossesse. Ces difficultés peuvent être en partie résolues par l'utilisation de modèles animaux, outils simples et efficaces pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la tératogénicité/ toxicité de l'alcool et pour dépister les altérations cognitives et comportementales. Les modèles animaux permettent également d'évaluer différentes approches thérapeutiques dans le cadre d'études précliniques qui

puissent être transposées à de futures études cliniques humaines [Almeida et coll., 2020]. Les premiers modèles animaux furent développés pour étayer les descriptions cliniques de Jones et Smith [Jones et coll., 1973]. Depuis lors, une pléthore de modèles a été mise au point tenant compte de la dose administrée, du mode de consommation (chronique ou binge), de la période à laquelle les animaux sont traités, de facteurs nutritionnels et d'exposition conjointe à d'autres substances toxiques [Lussier et coll., 2017]. L'intérêt majeur de ce type d'études est d'apporter des données presque impossibles à obtenir en clinique. Un autre intérêt est de pouvoir établir des corrélations entre les tissus centraux et périphériques, car les études cliniques n'ont pas facilement accès aux tissus « critiques » tels que le cerveau, et même s'il s'agit d'un prélèvement postmortem, le délai postmortem peut altérer le tissu cérébral. Par ailleurs, les modèles animaux permettent d'étudier les mécanismes moléculaires qui soutendent les conséquences de la PAE, ce qui ouvre la voie vers l'identification de nouveaux biomarqueurs. Depuis quelques années, des progrès significatifs ont été réalisés concernant la caractérisation des altérations neurodéveloppementales, neurocognitives et comportementales associées à la PAE, ainsi que l'élucidation des mécanismes moléculaires par lesquels ces altérations se produisent à différentes doses et modes d'exposition à l'alcool [Lussier et coll., 2017].

Bien que les primates représentent en théorie le « gold standard », les difficultés d'utilisation sont essentiellement liées à la durée de la gestation et aux limites éthiques. Les petits mammifères, et surtout les rongeurs, sont les animaux les plus utilisés car ils permettent d'étudier toutes les structures cérébrales et un certain nombre de comportements complexes, en particulier chez le rat dont le comportement est plus sophistiqué que celui de la souris. Ce sont néanmoins les souris qui sont les mammifères les plus couramment utilisés en raison de l'accessibilité aux modèles transgéniques, de leur courte durée de vie et de leur physiologie et génétique de base similaires à celles des humains. Il est maintenant possible d'établir des corrélations entre développement murin et humain en raison de la connaissance précise de l'équivalence des différents stades développementaux entre ces deux espèces. Le premier trimestre de la grossesse humaine correspond à la période de gestation E1–E10/11 chez la souris et le rat respectivement. Le second trimestre correspond à E11–E21/22 et le troisième trimestre correspond chez la souris et le rat à la période postnatale P1–P10 [Barateiro et Fernandes, 2014 ; Almeida et coll., 2020]. Cependant, la problématique principale est liée au fait que le troisième trimestre chez l'humain correspond à la période post-natale chez les rongeurs et que par conséquent, les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et

d'élimination de l'alcool seront différents, l'absence de molécules sécrétées par le placenta étant susceptible de modifier les conditions et les résultats expérimentaux.

En raison de ses propriétés pharmacologiques, l'éthanol passe facilement la barrière hémato-encéphalique et atteint rapidement le cerveau du fœtus. A partir des multiples études reproduisant une PAE réalisées chez l'animal et *in vitro*, il a été démontré que l'alcool affecte les trois grands processus se déroulant au cours du développement: prolifération, migration et différenciation/maturation. L'alcool accroît la mort cellulaire par apoptose [Ikonomidou et coll., 2000 ; Naseer et coll., 2014], affecte la gliogenèse des astrocytes et des [Manzo-Avalos et Saavedra-Molina, 2010] oligodendrocytes [Coutts et Harrison, 2015] et interagit étroitement avec les systèmes de neurotransmission, notamment avec le système excitateur glutamatergique [Nevo et Hamon, 1995] et le système inhibiteur GABAergique [Zorumski et coll., 2014].

Les anomalies de la neuronogénèse induites par une PAE ont été particulièrement étudiées sur les modèles murins, et surtout dans le cortex hippocampique. Si les phénomènes de prolifération cellulaire surviennent tout au long du développement, la phase de prolifération la plus intense est située entre E10 et E21 chez la souris et entre E11 et E22 chez le rat, correspondant au 2^{ème} trimestre de la grossesse chez l'humain. Les données actuellement disponibles chez la souris indiquent que l'exposition prénatale et néonatale à l'alcool entraîne une réduction du nombre de neurones matures et immatures mais cette réduction est moindre lorsque l'exposition à l'éthanol est discontinuée. En cas de binge drinking, l'alcool aurait une action directe sur le cycle cellulaire des progéniteurs du gyrus denté Sox2-positifs dont les capacités prolifératives sont diminuées, qu'ils soient à destinée gliale ou neuronale avec présence de progéniteurs ectopiques dans le hile et la molécule de l'hippocampe. Cet effet est cependant réversible car deux semaines après l'arrêt de la prise d'alcool, il existe une néo-neurogénèse réactionnelle en rapport avec une augmentation du nombre de cellules Sox2-positives en phase S et G2M, alors que ni le nombre de progéniteurs en G1 ni le nombre de cellules à destinée neuronale ou gliale (GFAP et NeuroD1-positives) ne varie par rapport à des contrôles, ce qui témoigne d'une augmentation sélective du pool de progéniteurs dans le gyrus denté qui supporteront les fonctions de mémoire et d'apprentissage après leur différenciation [Nickell et coll., 2017].

Au cours de la migration des interneurons GABAergiques, la PAE induit une altération des niveaux de méthylation de la voie MeCP2-BDNF/Dlx5 par mécanisme

épigénétique. MeCP2 régule l'expression du BDNF, un marqueur de plasticité neuronale et de survie cellulaire, également connu pour influencer la migration des interneurons GABAergiques, et la transcription de *Dlx5*, facteur impliqué dans la migration et la maturation des interneurons GABAergiques chez le rongeur [Martinowich et coll., 2003 ; Horike et coll., 2005]. Les effets à long terme de la PAE sur la prolifération et la migration ont été évalués chez des rats exposés à l'alcool au cours de la gestation. Une PAE entre E6 et E21 entraîne un retard de migration des neurones générés précocement et tardivement. Des travaux plus anciens avaient déjà permis d'établir que l'éthanol bloque la migration neuronale, entraînant une désynchronisation du développement cortical, entravant donc l'établissement du réseau neuronal cortical [Miller, 1993]. Contrairement à ce que nous avons observé chez l'humain, la PAE est responsable chez la souris d'une augmentation de la génération des interneurons dans les GE ainsi qu'une augmentation du nombre d'interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine dans le cortex préfrontal médial adulte [Skorput et coll., 2016].

Au cours et au décours de la phase de différenciation, l'alcool modifie les niveaux d'expression des neurotransmetteurs, en premier lieu du glutamate ainsi que du nombre de son récepteur ionotrope NMDA. Sur un modèle de rat ayant été soumis à une PAE, la combinaison d'une surexpression des récepteurs au GABA et d'une inhibition des récepteurs NMDA entraîne une neurodégénérescence au cours de la période de synaptogénèse [Sanderson et coll., 2009], période durant laquelle surviennent des modifications biochimiques et morphologiques sur les versants pré- et post-synaptiques. En fonction des modalités d'alcoolisation des animaux, les effets sur l'expression et la fonction du récepteur NMDA sont variables : une consommation aiguë d'alcool a pour effet d'inhiber la conductance cationique du récepteur alors qu'une consommation chronique d'alcool a pour effet d'augmenter la transmission glutamatergique [Farley et Mihic, 2015]. Chez les rongeurs, la maturation des connexions synaptiques s'effectue pendant la période postnatale, et la PAE affecte le niveau d'expression de protéines synaptiques telles que la synapsine 1, la GAP-43, la synaptophysine et synaptotagmine, ou de protéines post-synaptiques comme MAP2 et neurogranine [Almeida et coll., 2020].

Le cerveau des primates non hominiens et humain ont la caractéristique particulière de posséder un nombre plus élevé de neurones GABAergiques dans le néocortex que celui des rongeurs [DeFelipe et coll., 2006], source d'une augmentation de la diversité moléculaire,

biochimique et morphologique [Lim et coll., 2018]. S'il existe des descriptions neuropathologiques humaines dans la littérature, il n'y a pas à notre connaissance d'études chez l'humain ayant ciblé spécifiquement le système GABAergique et la glie de myélinisation sur une cohorte de cerveaux à de nombreux stades du développement en situation normale et pathologique d'exposition à l'alcool. Nous avons donc réalisé deux études qui ont été exposées dans le chapitre Résultats. Il faut souligner d'emblée que les vérifications anatomiques après IMG ou MFIU chez des foetus porteurs de FAS ou FASD sont très peu nombreuses, ce qui constitue une limite à l'interprétation de nos données en raison de la rareté du matériel disponible. Bien que la cohorte étudiée recouvre la plupart des stades développementaux importants, nous n'avons à notre disposition qu'un seul ou parfois deux cas pour lesquels les modalités d'exposition n'étaient pas toujours précisées, ce qui explique au moins partiellement les discordances parfois observées. Une autre limite est liée au fait que les prélèvements cérébraux étudiés avaient été préalablement fixés, parfois longuement, par le formaldéhyde et que les techniques réalisables sur tissu paraffiné sont restreintes. Enfin, l'interprétation des immunomarquages est parfois difficile sur certains tissus postmortem, et les résultats doivent être interprétés avec précaution.

Ainsi que nous l'avons observé dans notre premier travail, la PAE détermine une interneuronopathie caractérisée par une diminution du nombre d'interneurones GABAergiques et calrétininergiques dans le cortex et, fait majeur, une anomalie de la répartition de ces cellules qui sont situées dans les couches profondes de la plaque corticale comme observé dans le cortex du modèle murin développé par notre équipe, alors qu'elles sont situées dans les couches II et III dans le cerveau humain normal [Léger et coll., 2020b].

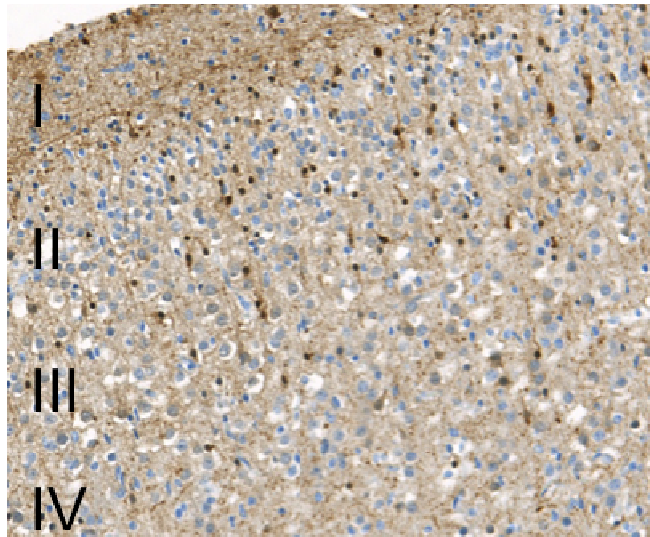


Figure 42 : Interneurones calrétinergiques de morphologie bipolaire situées dans les couches II-III d'un cortex humain normal à 36 SA, correspondant à la classe d'interneurones Htr3a et la sous-classe VIP+/CCK- (CR+) selon la classification de Lim (source : résultats de notre thèse).

Les interneuronopathies regroupent un vaste ensemble de maladies associées à des altérations du développement, de la migration, de la différenciation ou de la fonction des interneurones. Ce terme fut introduit en 2005 par Kato et Dobyns en référence aux signes cliniques et morphologiques observés dans le syndrome X-LAG (X-linked Lissencephaly with Abnormal Genitalia, MIM#300215) dans lequel il existe une épilepsie réfractaire liée à un défaut de spécification et de migration des interneurones GABAergiques. Actuellement, les interneuronopathies constitutionnelles regroupent également les anomalies de l'organogénèse du SNC (holoprosencéphalies et lissencephalies), les encéphalopathies épileptogènes précoces se manifestant le plus souvent par un syndrome de West, d'Ohtahara ou de Dravet, un certain nombre de pathologies syndromiques comme le syndrome de l' X Fragile, le syndrome de Rett, le syndrome de la Tourette et la neurofibromatose ainsi que certaines affections neuropsychiatriques comme les troubles du spectre autistique et la schizophrénie. Les étiologies des interneuronopathies dites acquises sont variées, mais sont dominées par la prématurité.

Au sein des anomalies de l'organogénèse, l'holoprosencéphalie (HPE) est la forme la plus sévère et de survenue la plus précoce, au cours de la 5^{ème} semaine de développement. Elle résulte d'une absence complète ou partielle de clivage du prosencéphale en 2 hémisphères cérébraux [Marcorelles et Laquerrière, 2010]. Les interneurones corticaux

exprimant NOS, NPY et SST, sont soit absents, soit considérablement réduits dans les cas foetaux et infantiles d'HPE, alors que la sous-population d'interneurones calrétinergiques ne semble pas affectée [Fertuzinhos et coll., 2009].

Un développement aberrant des systèmes GABAergiques a été décrit chez l'humain dans le cadre des anomalies de la migration neuronale, un groupe hétérogène de malformations cérébrales dont la forme la plus sévère est la lissencéphalie, encore appelée agyrie/pachygyrie, caractérisée par une absence ou une raréfaction des gyri et des sillons et un cortex désorganisé et épais. Les manifestations cliniques consistent en un retard mental profond et une épilepsie réfractaire, et le diagnostic est basé sur les données de l'IRM et l'examen neuropathologique. Dans la lissencéphalie de type 1 ou lissencéphalie classique liée à des mutations sur le gène *LISI* [MIM#607432] ou à des remaniements chromosomiques impliquant la région 17p.13, les interneurones ayant migré dans la plaque corticale sont correctement positionnés dans les couches superficielles, mais les interneurones GABAergiques sont également identifiés dans la zone intermédiaire et dans les EGL. Dans la lissencéphalie de type 1 liée à l'X due à des mutations sur le gène *DCX* [MIM#300121], de rares interneurones se dispersent dans la plaque corticale, associés à une accumulation massive dans la zone intermédiaire et les régions périventriculaires, et persistent anormalement dans les GE à un stade où celles-ci devraient avoir régressé [Marcorelles et coll., 2010]. Dans la lissencéphalie de type 1 « variant » liée à l'X avec des organes génitaux anormaux (syndrome X-LAG), les patients de sexe masculin présentent une épilepsie pharmacorésistante avec convulsions cloniques ou des myoclonies dès la fin de la période foetale. L'IRM cérébrale objective une pachygyrie antérieure et une agyrie postérieure avec un cortex légèrement épaissi, une agénésie du corps calleux et des noyaux gris centraux dysplasiques et hypoplasiques, confirmés par les études neuropathologiques qui ont mis en évidence une quasi-absence d'interneurones dans le cortex en rapport avec un défaut de production et de différenciation [Bonneau et coll., 2001]. Il a d'ailleurs été montré dans le cerveau de souris knock-out pour *Arx*, une migration tangentielle et une différenciation des interneurones GABAergiques aberrantes [Friocourt et Parnavelas, 2010]. En fonction du phénotype observé, les mutations dans le gène *ARX* peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe comporte des malformations cérébrales (syndrome X-LAG et syndrome de Proud) [Kato et coll., 2004]. Dans le second groupe, les malformations cérébrales sont absentes et les patients présentent une déficience intellectuelle liée à l'X avec ou sans épilepsie, ou un syndrome de Partington qui associe déficience intellectuelle et mouvements dystoniques des mains [MIM#180849] [Friocourt et coll., 2006; Curie et coll., 2018].

Les interneurons GABAergiques jouent un rôle crucial dans le traitement cognitif en ajustant avec précision les oscillations de l'activité neuronale au niveau des réseaux qui soutiennent l'apprentissage et la mémoire [Wang et coll., 2010]. Des défauts de prolifération et de migration de sous-classes spécifiques d'interneurons GABAergiques ont été incriminés dans des pathologies de survenue plus tardive, en particulier dans les encéphalopathies épileptogènes précoces, les troubles du spectre autistique, et la schizophrénie [DeFelipe 1999; Uhlhaas et Singer 2010 ; Marín 2012]. Les étiologies des encéphalopathies épileptogènes précoces sont génétiquement et phénotypiquement hétérogènes, et pour un phénotype donné, plusieurs gènes peuvent être en cause. A l'inverse, un même variant pathogène dans un gène donné peut être responsable de phénotypes différents. Les gènes les plus fréquemment impliqués codent pour des canaux ioniques alors que les gènes impliqués dans les voies de signalisation GABAergiques et glutamatergiques sont peu nombreux : *ARX*, *ERBB4*, *FOXG1*, *GRIN1*, *GRIN2A* et *GRIN2B* [Mc Tague et coll., 2016]. Une défaillance des fonctions inhibitrices du système GABAergique a également été impliquée dans la genèse de l'épilepsie des dysplasies corticales [D'Antuono et coll., 2004 ; Cossart et coll., 2005], les synapses GABAergiques étant toujours fonctionnelles mais restant excitatrices [Represa et Ben-Ari, 2005]. Dans l'épilepsie temporale, il existe une élimination sélective de sous-populations spécifiques d'interneurons et les anomalies fonctionnelles des interneurons survivants provoquent un dysfonctionnement des fonctions inhibitrices [Zaitsev, 2016]. Les troubles du spectre autistique et la schizophrénie sont des affections neuropsychiatriques qui ont en commun des troubles cognitifs avec un substratum génétique extrêmement variable et complexe mais avec un phénotype comportemental comportant des similitudes. Des études ont montré une implication de voies de signalisation telles que la voie du transporteur vésiculaire du glutamate et du GABA, de l'activité des récepteurs NMDA, GABA_A et GABA_B dans les deux affections, suggérant l'existence de perturbations de voies de signalisation communes impliquées dans l'homéostasie excitation-inhibition [Gao et Penzes, 2015]. Il n'est cependant pas clairement établi s'il existe une diminution du nombre d'interneurons GABAergiques ou s'il s'agit d'un dysfonctionnement, ou encore d'une expression génique aberrante au niveau de ces cellules. Des mesures non invasives par spectroscopie-IRM ont montré une réduction des niveaux de GABA dans le cortex frontal, moteur, somato-sensoriel et auditif des patients. Des études postmortem ont révélé une diminution du nombre d'interneurons parvalbuminergiques dans le cortex préfrontal des patients avec troubles du spectre autistique et des patients schizophrènes [Rapanelli et coll., 2017 ; Reynolds et Beasley, 2001].

Chaque année, environ 15 millions de nourrissons dans le monde naissent prématurément et environ 1,9 million d'entre eux naissent avec un poids de naissance très faible (<1500 g). Des études en imagerie ont montré qu'il existe une diminution significative du volume de substance grise corticale qui perdure pendant l'enfance et l'adolescence et se manifeste par une déficience neuro-développementale modérée à sévère à partir de l'âge d'1 an [Dyet et coll., 2006; Thompson et coll., 2007]. Un certain nombre de patients nés prématurément souffrent de troubles neurocomportementaux dès l'enfance ou l'adolescence tels que troubles de l'attention, hyperactivité, anxiété, épilepsie et spectre autistique [De Kieviet et coll., 2012]. Ces anomalies neurocomportementales sont attribuées à des perturbations de la morphologie et de la fonction des interneurons corticaux [Marín, 2012]. Alors que la neurogénèse des interneurons se poursuit jusqu'à la fin de la grossesse humaine, et après la naissance en ce qui concerne les interneurons parvalbuminergiques à destinée préfrontale, la prématurité pourrait impacter la production d'interneurons corticaux [Malik et coll., 2013].

Qu'il s'agisse de substances addictives ou de médicaments, la prise de toxiques est souvent sous-estimée lors du bilan étiologique d'une anomalie cérébrale et ce, malgré une littérature abondante qui ne concerne cependant que des cas isolés ou de petites séries. De multiples substances ont été incriminées dans la survenue d'une interneuronopathie et il n'est pas possible d'en dresser une liste exhaustive. A titre d'exemple, les métaux comme le plomb [Duan et coll., 2017] ou l'aluminium [Inohama et coll., 2018], des anesthésiques comme la kétamine (antagoniste du NMDA) [Zhang et coll., 2016; Aligny et coll., 2014], des médicaments comme les antiépileptiques tel que l'acide valproïque [Watanabe et coll., 2017], ou les benzodiazépines [Haas et coll., 2013], des antiseptiques comme l'hexachlorophène [Watanabe et coll., 2018], des drogues illicites comme la cocaïne [McCarthy et coll., 2012] ou la phencyclidine (anti-NMDA) [Okamoto et coll., 2012] ou bien encore des neurotoxines comme le 3,3'-iminodipropionirite retrouvé dans un légume le *Lathyrus sativus* ou pois d'herbe [Tanaka et coll., 2019]. La kétamine, un antagoniste non compétitif du NMDA, très utilisée comme anesthésique en pédiatrie néonatale, est également une drogue illicite appelée Super K ou KitKat consommée par les adolescents et les jeunes adultes. Dans le cerveau immature, malgré plusieurs études indiquant que les antagonistes du NMDA ont un effet neuroprotecteur contre la survenue de lésions excito-toxiques, il est établi que ces molécules exercent un effet délétère en supprimant la fonction trophique du glutamate. En utilisant des souris Gad67-GFP, il a été montré que l'exposition prénatale à la kétamine au moment où les

précurseurs GABAergiques migrent entraîne une mort apoptotique massive dans les éminences ganglionnaires et des interneurons GABAergiques en migration et une diminution de la densité en interneurons [Aligny et coll., 2014].

Il est reconnu qu'une PAE provoque une migration tangentielle aberrante des interneurons GABAergiques et des altérations à long terme des fonctions du cortex préfrontal. L'interneuronopathie contribuerait de manière significative à la physiopathologie du FASD. La migration tangentielle dépendant de l'activité des neurones corticaux GABAergiques s'effectue grâce aux réponses dépolarisantes induites par le GABA ambiant présent dans la plaque corticale. Chez la souris, l'exposition à l'éthanol potentialise l'action dépolarisante du GABA sur les interneurons GABAergiques corticaux. L'antagonisme pharmacologique du co-transporteur NKCC1 atténue la potentialisation induite par l'éthanol de la dépolarisation du GABA, prévenant ainsi la migration tangentielle aberrante induite par l'éthanol *in vitro* [pour revue, Deidda et coll., 2014]. Il est établi que la migration et le positionnement des interneurons GABAergiques dans le cortex sont contrôlés par les microvaisseaux corticaux [Won et coll., 2013] et que l'angiogenèse corticale dans le cerveau humain foetal est altérée par l'exposition prénatale à l'alcool [Jégou et coll., 2012]. Dans la présente étude, nous avons observé qu'une proportion significative d'interneurons GABAergiques exprimant la calrétinine n'étaient pas en contact avec la face abluminale des vaisseaux, mais restaient situés à distance des vaisseaux dès le début du troisième trimestre de gestation, ce qui pourrait également expliquer le mauvais positionnement des interneurons dans les cerveaux FASD. Récemment, Léger et coll. ont démontré qu'au cours du développement, le glutamate stimule l'activité des protéases endothéliales MMP-9 et t-PA afin d'assurer une croissance du réseau vasculaire intracortical. Ces auteurs ont également montré que l'inactivation du t-PA et l'administration *in vivo* d'un inhibiteur de la MMP entraînaient un positionnement inadéquat des interneurons GABA qui restent dans les couches corticales profondes impliquant que le glutamate, via son récepteur NMDA endothélial dépendant du t-PA, contrôle la migration vasculaire des interneurons GABA en régulant l'activité de la protéase endothéliale. L'alcool altère l'activité régulée par le glutamate endothélial et le positionnement des interneurons en modifiant l'activité des métalloprotéinases [Léger et coll., 2020a ; Léger et coll., 2020b]. D'après ces résultats, il est fortement suggéré que le dysfonctionnement endothélial induit par l'alcool puisse contribuer à la malposition des interneurons GABAergiques exprimant la calrétinine que nous avons aussi observée chez le fœtus humain.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs équipes se sont focalisées sur les effets délétères de l'alcool sur la macroglie qui seraient en partie responsables des atteintes neurologiques présentes chez les enfants porteurs d'un FAS ou d'un FASD. Une PAE induit une diminution des capacités prolifératives de la glie radiaire et des cellules astrocytaires, et perturbe la maturation et la survie des oligodendrocytes et donc la myélinisation, impactant la conduction axonale [Wilhelm et Guizzetti, 2016]. L'exposition prénatale à l'éthanol perturbe de manière persistante le métabolisme des cellules gliales qui sont impliquées dans de nombreux processus tels que l'utilisation du glucose dans diverses régions cérébrales comme le cortex frontal et le corps calleux. Dès 1989, Lancaster et coll. avaient démontré dans un modèle murin une réduction de la myélinogénèse après une PAE, qui persistait après la naissance [Lancaster et coll., 1989]. Une réduction des protéines liées à l'intégrité de la myéline (MBP, PLP et MOG) a été observée chez des souris mâles adultes exposées à une PAE de type Binge drinking pendant la gestation et la lactation avec des troubles comportementaux ultérieurs affectant les fonctions exécutives et la coordination motrice [Cantacors et coll., 2017]. Les astrocytes sont également des cibles de l'alcool, tant en période anténatale que chez l'adulte. Une PAE est responsable d'une réduction de la prolifération des progéniteurs et de leur survie, d'une diminution de la différenciation des astrocytes, de la libération de facteurs neurotrophiques et de facteurs de croissance neuritique comme la laminine et la fibronectine et stimule la production d'inhibiteurs de la croissance neuritique comme la chondroïtine sulfate, liées à une altération des différentes étapes du transport vésiculaire intracellulaire [pour revue, Wilhelm et guizzetti, 2016].

Malgré la multiplicité des données obtenues chez les modèles animaux, peu de pistes thérapeutiques sont encore proposées. Des traitements visant à réduire le stress oxydatif provoqué par l'éthanol ont été proposés en raison de la constatation d'une augmentation de la survie des neurones hippocampiques ainsi que des cellules du cervelet exposés à l'éthanol traitées par de la vitamine E.

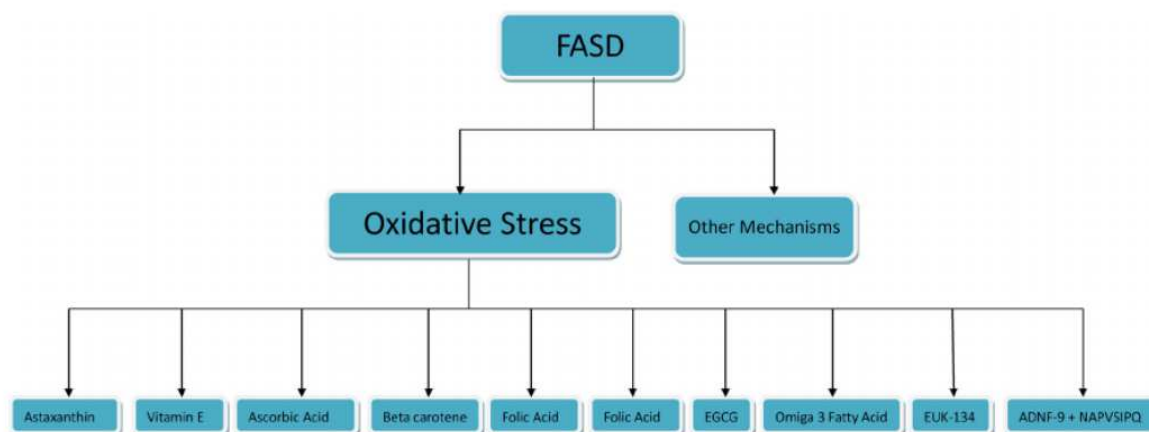


Figure 43 : Liste des substances anti-oxydantes proposées dans le traitement de la PAE [D’après Zhang et coll., 2018].

A titre d’exemple, l’astaxanthine atténuerait le retard de croissance induit par le traitement prénatal à l’éthanol en améliorant le niveau de régulation du peroxyde d’hydrogène et du malonyl-dialdéhyde. La Vitamine E diminuerait le stress oxydatif en y adjoignant de la vitamine C. La supplémentation en bêta-carotène protégerait de la neurotoxicité induite par l’alcool et la supplémentation prénatale en acide folique prénatal réduirait le RCIU. Le traitement par les oméga-3 améliorerait l’augmentation de l’activité de la glutathione réductase ainsi que l’augmentation des substances réactives à l’acide thiobarbiturique induites par l’alcool dans un modèle de rat [pour revue, Zhang et coll., 2018].

Le Bumétanide a été également proposé pour réduire l’interneuronopathie et sa prise a été préconisée au cours du second trimestre. Cependant, ce composé administré chez la souris diminue le nombre d’interneurones parvalbuminergiques qui ne sont générés chez l’humain qu’aux alentours de la naissance [Skorput et coll., 2016]. Ces auteurs ont également proposé d’utiliser le NKCC1, cible pharmacologique pour la prise en charge du FASD. Des molécules antagonistes du NMDA ont également été proposées car susceptibles d’atténuer les anomalies de la migration vasculaire des interneurones mais les données restent controversées [Léger et coll., 2020a]. En résumé, les nombreuses études faisant état de possibilités thérapeutiques ont été réalisées sur des modèles murins et n’ont jamais été encore proposées chez l’humain, restant donc encore très spéculatives.

La suite de notre travail s'inscrit dans la continuité de ceux de l'équipe, dont les objectifs sont entre autres d'identifier de nouveaux biomarqueurs au cours de l'exposition prénatale à l'alcool. Nous avons commencé à réaliser des études immunohistochimiques sur les placentas de patientes incluses dans le projet Alcobrain, dont les résultats seront confrontés aux données obtenues sur le sang de la mère et du nouveau né, et au suivi à long terme des enfants ayant été exposés à l'alcool au cours de la grossesse. Un autre aspect intéressant est l'existence chez les enfants ayant eu une PAE, d'une vasculopathie rétinienne qui constitue un marqueur d'alcoolisation fœtale, et que nous nous proposons d'investiguer sur des cas fœtaux. Les résultats pourraient ainsi être confrontés à ceux obtenus sur le modèle murin développé par l'équipe.

BIBLIOGRAPHIE

Adamsbaum C, Gelot A, André C, Baron JM (2001) Atlas d'IRM du cerveau foetal: guide d'interprétation des aspects normaux. 1^{ère} ed. Paris : Masson

Al-Jaberi N, Lindsay S, Sarma S, Bayatti N, Clowry GJ (2015) The early fetal development of human neocortical GABAergic interneurons. *Cereb Cortex* 25(3):631-45.

Aligny C, Roux C, Dourmap N, Ramdani Y, Do-Rego JC, Jégou S, Leroux P, Leroux-Nicollet I, Marret S, Gonzalez BJ (2014) Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. *Cell Death Dis* 5(7):e1311.

Alimov A, Wang H, Liu M, Frank JA, Xu M, Ou X, Luo J (2013) Expression of autophagy and UPR genes in the developing brain during ethanol-sensitive and resistant periods. *Metab Brain Dis* 28(4):667-76.

Almeida L, Andreu-Fernández V, Navarro-Tapia E, Aras-López R, Serra-Delgado M, Martínez L, García-Algar O, Gómez-Roig MD (2020) Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview. *Front Pediatr* 8:359.

Alzu'bi A, Clowry GJ (2019) Expression of ventral telencephalon transcription factors ASCL1 and DLX2 in the early fetal human cerebral cortex. *J Anat* 235(3):555-568.

Anastasiades PG, Marques-Smith A, Lyngholm D, Lickiss T, Raffiq S, Kätzel D, Miesenböck G, Butt SJ (2016) GABAergic interneurons form transient layer-specific circuits in early postnatal neocortex. *Nat Commun* 7:10584.

Antypa M, Faux C, Eichele G, Parnavelas JG, Andrews WD (2011) Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 34(10):1584-94.

Arese M, Serini G, Bussolino F (2011) Nervous vascular parallels: axon guidance and beyond. *Int J Dev Biol* 55(4-5):439-45.

Arikkath J, Reichardt LF (2008) Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31(9):487-94.

Aronne MP, Guadagnoli T, Fontanet P, Evrard SG, Brusco A (2011) Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Exp Neurol* 229(2):364-71.

Arshad A, Vose LR, Vinukonda G, Hu F, Yoshikawa K, Csiszar A, Brumberg JC, Ballabh P (2016) Extended Production of Cortical Interneurons into the Third Trimester of Human Gestation. *Cereb Cortex* 26(5):2242-2256.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R; Petilla Interneuron Nomenclature Group (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9(7):557-68.

- Astley SJ, Clarren SK (1996) A case definition and photographic screening tool for the facial phenotype of fetal alcohol syndrome. *J.Pediatr* 129: 33-41.
- Azouz EM, Kavarianian G, Der Kaloustian VM (1993) Fetal alcohol syndrome and bilateral tibial exostoses. A case report. *Pediatr.Radiol* 23: 615-616.
- Bakhireva LN, Savage DD (2011) Focus on: biomarkers of fetal alcohol exposure and fetal alcohol effects. *Alcohol Res Health*. 34(1):56-63.
- Balaraman S, Schafer JJ, Tseng AM, Wertelecki W, Yevtushok L, Zymak-Zakutnya N, Chambers CD, Miranda RC (2016) Plasma miRNA Profiles in Pregnant Women Predict Infant Outcomes following Prenatal Alcohol Exposure. *PLoS One* 11(11):e0165081.
- Balaszczuk V, Bender C, Pereno GL, Beltramino CA (2011) Alcohol-induced neuronal death in central extended amygdala and pyriform cortex during the postnatal period of the rat. *Int J Dev Neurosci* 29(7):733-42.
- Barateiro A, Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta* 1843(9):1917-29.
- Bartolini G, Sánchez-Alcañiz JA, Osório C, Valiente M, García-Frigola C, Marín O (2017) Neuregulin 3 Mediates Cortical Plate Invasion and Laminar Allocation of GABAergic Interneurons. *Cell Rep* 18(5):1157-1170.
- Bean JC, Lin TW, Sathyamurthy A, Liu F, Yin DM, Xiong WC, Mei L (2014) Genetic labeling reveals novel cellular targets of schizophrenia susceptibility gene: distribution of GABA and non-GABA ErbB4-positive cells in adult mouse brain. *J Neurosci* 34(40):13549-66.
- Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aebermann BD, Baka J, Bordé S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Faragó N, Kocsis ÁK, Kovács B, Maltzer Z, McCarrison JM, Miller JA, Molnár G, Oláh G, Ozsvár A, Rózsa M, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Wall A, Puskás LG, Barzó P, Steemers FJ, Schork NJ, Scheuermann RH, Lasken RS, Lein ES, Tamás G (2018) Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci* 21(9):1185-1195.
- Bonneau D, Toutain A, Laquerrière A, Marret S, Saugier-Veber P, Barthez MA, Radi S, Biran-Mucignat V, Rodriguez D, Gélot A (2002) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia (XLAG): clinical, magnetic resonance imaging, and neuropathological findings. *Ann Neurol* 51(3):340-9.
- Boronat S, Sánchez-Montañez A, Gómez-Barros N, Jacas C, Martínez-Ribot L, Vázquez E, Del Campo M (2017) Correlation between morphological MRI findings and specific diagnostic categories in fetal alcohol spectrum disorders. *Eur J Med Genet* 60(1):65-71.
- Borrell V, Götz M (2014) Role of radial glial cells in cerebral cortex folding. *Curr Opin Neurobiol* 27:39-46.

- Bortone D, Polleux F (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62(1):53-71.
- Bortone DS, Olsen SR, Scanziani M (2014) Translaminar inhibitory cells recruited by layer 6 corticothalamic neurons suppress visual cortex. *Neuron* 82(2):474-85.
- Bramley TA, Menzies GS, McPhie CA (1999) Effects of alcohol on the human placental GnRH receptor system. *Mol Hum Reprod* 5(8):777-83.
- Brown KN, Chen S, Han Z, Lu CH, Tan X, Zhang XJ, Ding L, Lopez-Cruz A, Saur D, Anderson SA, Huang K, Shi SH (2011) Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science* 334(6055):480-6.
- Brun A (1965) The subpial granular layer of the foetal cerebral cortex in man. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 179:3-98.
- Buchanan KA, Blackman AV, Moreau AW, Elgar D, Costa RP, Lalanne T, Tudor Jones AA, Oyrer J, Sjöström PJ (2012) Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron* 75(3):451-66.
- Burd L, Deal E, Rios R, Adickes E, Wynne J et al (2007) Congenital heart defects and fetal alcohol spectrum disorders. *Congenit Heart Dis* 2: 250-255.
- Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V (2004) Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231(3):474-88.
- Calhoun F, Warren K (2007) Fetal alcohol syndrome: historical perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* 31(2):168-71.
- Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Bräuninger M, Lewitus E, Sykes A, Hevers W, Lancaster M, Knoblich JA, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB, Treutlein B (2015) Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(51):15672-7.
- Cantacors L, Alfonso-Loeches S, Moscoso-Castro M, Cuitavi J, Gracia-Rubio I, López-Arnau R, Escubedo E, Guerri C, Valverde O (2017) Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. *Neuropharmacology* 123:368-384.
- Carstens MH (2008) Neural tube programming and the pathogenesis of craniofacial clefts, part I: the neuromeric organization of the head and neck. *Handbook of clinical neurology* 87, 247-276.
- Catala M (2003) Contrôle moléculaire de l'embryogenèse du corps calleux [Neurosurgical Embryology. Part 3: Molecular control of corpus callosum development]. *Neurochirurgie* 49(4):441-8.
- Chan, D. Q (1999) Fetal alcohol syndrome. *Optom.Vis.Sci.* **76**: 678-685.

Chang J, Mancuso MR, Maier C, Liang X, Yuki K, Yang L, Kwong JW, Wang J, Rao V, Vallon M, Kosinski C, Zhang JJ, Mah AT, Xu L, Li L, Gholamin S, Reyes TF, Li R, Kuhnert F, Han X, Yuan J, Chiou SH, Brettman AD, Daly L, Corney DC, Cheshier SH, Shortliffe LD, Wu X, Snyder M, Chan P, Giffard RG, Chang HY, Andreasson K, Kuo CJ (2017) Gpr124 is essential for blood-brain barrier integrity in central nervous system disease. *Nat Med* 23(4):450-460.

Charness ME, Riley EP, Sowell ER (2016) Drinking During Pregnancy and the Developing Brain: Is Any Amount Safe? *Trends Cogn Sci* 20(2):80-82.

Chasnoff IJ, Wells AM, King L (2015) Misdiagnosis and missed diagnoses in foster and adopted children with prenatal alcohol exposure. *Pediatrics* 135(2):264-70.

Chaudhuri JD (2000) Alcohol and the developing fetus--a review. *Med Sci Monit* 6:1031-1041.

Chen SY, Sulik KK (1996) Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. *Alcohol Clin Exp Res* 20(6):1071-6.

Chiriboga CA (2003) Fetal alcohol and drug effects. *Neurologist* 9: 267-279.

Chittajallu R, Isaac JT (2010) Emergence of cortical inhibition by coordinated sensory-driven plasticity at distinct synaptic loci. *Nat Neurosci* 13(10):1240-8.

Chudley AE, Conry J, Cook JL, Loock C, Rosales T, LeBlanc N; Public Health Agency of Canada's National Advisory Committee on Fetal Alcohol Spectrum Disorder (2005) Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *CMAJ* 172(5 Suppl):S1-S21.

Chudley AE, Kilgour AR, Cranston M, Edwards M (2007) Challenges of diagnosis in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol spectrum disorder in the adult. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C(3):261-72.

Church MW, Abel EL (1998) Fetal alcohol syndrome. Hearing, speech, language, and vestibular disorders. *Obstet.Gynecol.Clin.North Am.* 25: 85-97.

Ciceri G, Dehorter N, Sols I, Huang ZJ, Maravall M, Marín O (2013) Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 16(9):1199-210.

Clarren SK (1977) Central nervous system malformations in two offspring of alcoholic women. *Birth Defects Orig Artic Ser* 13(3D):151-3.

Clarren SK, Alvord EC Jr, Sumi SM, Streissguth AP, Smith DW (1978) Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J Pediatr* 92(1):64-7.

Clarren SK, Smith DW (1978) The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 298(19):1063-7.

Cleaver O, Melton DA (2003) Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9(6):661-8.

- Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C (2002) Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res* 68(2):213-25.
- Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL (2005) Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* 8(8):1059-68.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL (2007) *Dlx* transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54(6):873-88.
- Colasante G, Collombat P, Raimondi V, Bonanomi D, Ferrai C, Maira M, Yoshikawa K, Mansouri A, Valtorta F, Rubenstein JL, Broccoli V (2008) *Arx* is a direct target of *Dlx2* and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28(42):10674-86.
- Copp AJ, Greene ND (2010) Genetics and development of neural tube defects. *The Journal of pathology* 220(2), 217–230.
- Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y (2005) Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28(2):108-15.
- Coutts DJ et Harrison NL (2015). Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 39:455-462.
- Crain LS, Fitzmaurice NE, Mondry C (1983) Nail dysplasia and fetal alcohol syndrome. Case report of a heteropaternal sibship. *Am J Dis Child* 137: 1069-1072.
- Curie A, Friocourt G, des Portes V, Roy A, Nazir T, Brun A, Cheylus A, Marcorelles P, Retzepi K, Maleki N, Bussy G, Paulignan Y, Reboul A, Ibarrola D, Kong J, Hadjikhani N, Laquerrière A, Gollub RL (2018) Basal ganglia involvement in *ARX* patients: The reason for *ARX* patients very specific grasping? *Neuroimage Clin* 19:454-465.
- D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Mattia D, Bernasconi A, Olivier A, Turak B, Devaux A, Pumain R, Avoli M (2004) GABAA receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *Brain* 127(Pt 7):1626-40.
- De Chazeron I, Llorca PM, Ughetto S, Vendittelli F, Boussiron D et al. (2008) Is pregnancy the time to change alcohol consumption habits in France? *Alcohol Clin Exp Res* 32: 868-873.
- De Cornulier M, Avet-Loiseau H, Passuti N, Branger B et al. (1991) Vertebral involvement and fetal alcohol syndrome. *Pediatric* 46: 685-689.
- De Juan Romero C, Bruder C, Tomasello U, Sanz-Anquela JM, Borrell V (2015) Discrete domains of gene expression in germinal layers distinguish the development of gyrencephaly. *EMBO J* 34(14):1859-74.

De Kieviet JF, Zoetebier L, van Elburg RM, Vermeulen RJ, Oosterlaan J (2012) Brain development of very preterm and very low-birthweight children in childhood and adolescence: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 54(4):313-23.

De la Monte SM, Kril JJ (2014) Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol* 127(1):71-90.

De Marco García NV, Karayannis T, Fishell G (2011) Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 472(7343):351-5.

De Marco García NV, Priya R, Tuncdemir SN, Fishell G, Karayannis T (2015) Sensory inputs control the integration of neurogliaform interneurons into cortical circuits. *Nat Neurosci* 18(3):393-401.

Dean C, Dresbach T (2006) Neuroligins and neuexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 29(1):21-9.

DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* (1):1-19.

DeFelipe J (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 (Pt 10):1807-22.

DeFelipe J, Ballesteros-Yáñez I, Inda MC, Muñoz A (2006) Double-bouquet cells in the monkey and human cerebral cortex with special reference to areas 17 and 18. *Prog Brain Res* 154:15–32.

Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L (2014) Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* 8:119.

Dejana E, Betsholtz C (2016) Oligodendrocytes follow blood vessel trails in the brain. *Science* 351(6271):341-2.

Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119(1), 55–73.

Del Campo M, Jones KL (2017) A review of the physical features of the fetal alcohol spectrum disorders. *Eur J Med Genet* 60(1):55-64.

Dittrich L, Heiss JE, Warriar DR, Perez XA, Quik M, Kilduff TS (2012) Cortical nNOS neurons co-express the NK1 receptor and are depolarized by Substance P in multiple mammalian species. *Front Neural Circuits* 6:31.

Dou X, Menkari C, Mitsuyama R, Foroud T, Wetherill L, Hammond P, Suttie M, Chen X, Chen SY, Charness ME; Collaborative Initiative on Fetal Alcohol Spectrum Disorders (2018) L1 coupling to ankyrin and the spectrin-actin cytoskeleton modulates ethanol inhibition of L1 adhesion and ethanol teratogenesis. *FASEB J* 32(3):1364-1374.

- Douglas RJ, Martin KA (2004) Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* 27:419-51.
- Duan Y, Peng L, Shi H, Jiang Y (2017) The effects of lead on GABAergic interneurons in rodents. *Toxicol Ind Health* 33(11):867-875.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275(5300):661-5.
- Dyett LE, Kennea N, Counsell SJ, Maalouf EF, Ajayi-Obe M, Duggan PJ, Harrison M, Allsop JM, Hajnal J, Herlihy AH, Edwards B, Laroche S, Cowan FM, Rutherford MA, Edwards AD (2006) Natural history of brain lesions in extremely preterm infants studied with serial magnetic resonance imaging from birth and neurodevelopmental assessment. *Pediatrics*. 118(2):536-48.
- El Ghazi F, Desfeux A, Brasse-Lagnel C, Roux C, Lesueur C, Mazur D, Remy-Jouet I, Richard V, Jégou S, Laudenbach V, Marret S, Bekri S, Prevot V, Gonzalez BJ (2012) NO-dependent protective effect of VEGF against excitotoxicity on layer VI of the developing cerebral cortex. *Neurobiol Dis* 45(3):871-86.
- Ehrhart F, Roozen S, Verbeek J, Koek G, Kok G, van Kranen H, Evelo CT, Curfs LMG (2019) Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 24(1):10-17.
- Fairén A, Cobas A, Fonseca M (1986) Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 251(1):67-83.
- Farley NM, Mihic SJ (2015) Allosteric modulation of the glycine receptor activated by agonists differing in efficacy. *Brain Res* 1606:95-101.
- Fazzari P, Paternain AV, Valiente M, Pla R, Luján R, Lloyd K, Lerma J, Marín O, Rico B (2010) Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464(7293):1376-80.
- Feess-Higgins A, Larroche JC. Development of the human fetal brain. Masson ed., Paris, INSERM CNRS 1987.
- Feltes BC, de Faria Poloni J, Nunes IJ, Bonatto D (2014) Fetal alcohol syndrome, chemobiology and OMICS: ethanol effects on vitamin metabolism during neurodevelopment as measured by systems biology analysis. *OMICS* 18(6):344-63.
- Fertuzinhos S, Krsnik Z, Kawasawa YI, Rasin MR, Kwan KY, Chen JG, Judas M, Hayashi M, Sestan N (2009) Selective depletion of molecularly defined cortical interneurons in human holoprosencephaly with severe striatal hypoplasia. *Cereb Cortex* 19(9):2196-207.
- Fisher SE, Atkinson M, Burnap JK, Jacobson S, Sehgal PK, Scott W, Van Thiel DH (1982) Ethanol-associated selective fetal malnutrition: a contributing factor in the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 6(2):197-201.

Fisher SE, Duffy L, Atkinson M (1986) Selective fetal malnutrition: effect of acute and chronic ethanol exposure upon rat placental Na,K-ATPase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 10(2):150-3.

Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marín O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44(2):251-61.

Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puellas L, Marín O (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27(36):9682-95.

Frazer S, Prados J, Niquille M, Cadilhac C, Markopoulos F, Gomez L, Tomasello U, Telley L, Holtmaat A, Jabaudon D, Dayer A (2017) Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT_{3A}R expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Commun* 8:14219.

Friocourt G, Poirier K, Rakic S, Parnavelas JG, Chelly J (2006) The role of ARX in cortical development. *Eur. J. Neurosci* 23:869–876.

Friocourt G, Parnavelas JG (2010) Mutations in ARX result in several defects involving GABAergic neurons. *Front. Cell Neurosci* 4:4.

Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M (2005) Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron* 48(2):315-27.

Gao R, Penzes P (2015) Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr Mol Med* 15(2):146-67.

Gelman DM, Martini FJ, Nóbrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marín O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29(29):9380-9.

Goldowitz D, Lussier AA, Boyle JK, Wong K, Lattimer SL, Dubose C, Lu L, Kobor MS, Hamre KM (2014) Molecular pathways underpinning ethanol-induced neurodegeneration. *Front Genet* 5:203.

Green PP, McKnight-Eily LR, Tan CH, Mejia R, Denny CH (2016) Vital Signs: Alcohol-Exposed Pregnancies--United States, 2011-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65(4):91-7.

Greenberg DA, Jin K (2005) From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438(7070):954-9.

Gressens P, Lammens M, Picard JJ, Evrard P (1992) Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol* 27(3):219-26.

Guerri C, Bazinet A, Riley EP (2009) Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol* 44(2):108-14.

Guihard-Costa AM, Larroche JC (1990) Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. *Early human development* 23: 27-40

Guihard-Costa AM, Ménez F, Delezoide AL (2002) Organ weights in human fetuses after formalin fixation: standards by gestational age and body weight. *Pediatr Dev Pathol* 5(6):559-78.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3(5):342-55.

Haas M, Qu Z, Kim TH, Vargas E, Campbell K, Petrou S, Tan SS, Reid CA, Heng J (2013) Perturbations in cortical development and neuronal network excitability arising from prenatal exposure to benzodiazepines in mice. *Eur J Neurosci* 37(10):1584-93.

Habbick BF, Zaleski WA, Casey R, Murphy F (1979) Liver abnormalities in three patients with fetal alcohol syndrome. *Lancet* 1: 580-581.

Habbick BF, Blakley PM, Houston CS, Snyder RE, Senthilselvan A, Nanson JL (1998) Bone age and growth in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 22(6):1312-6.

Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464(7288):554-561.

Hansen DV, Rubenstein JL, Kriegstein AR (2011) Deriving excitatory neurons of the neocortex from pluripotent stem cells. *Neuron* 70(4):645-60.

Harwell CC, Fuentealba LC, Gonzalez-Cerrillo A, Parker PR, Gertz CC, Mazzola E, Garcia MT, Alvarez-Buylla A, Cepko CL, Kriegstein AR (2015) Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons. *Neuron* 87(5):999-1007.

He M, Tucciarone J, Lee S, Nigro MJ, Kim Y, Levine JM, Kelly SM, Krugikov I, Wu P, Chen Y, Gong L, Hou Y, Osten P, Rudy B, Huang ZJ (2016) Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex. *Neuron* 91(6):1228-1243.

Hevner RF, Daza RA, Englund C, Kohtz J, Fink A (2004) Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience* 124(3):605-18.

Hilscher MM, Leão RN, Edwards SJ, Leão KE, Kullander K (2017) ChRNA2-Martinotti Cells Synchronize Layer 5 Type A Pyramidal Cells via Rebound Excitation. *PLoS Biol* 15(2):e2001392.

Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER, Graybuck LT, Close JL, Long B, Johansen N, Penn O, Yao Z, Eggermont J, Höllt T, Levi BP, Shehata SI, Aebermann B, Beller A, Bertagnoli D, Brouner K, Casper T, Cobbs C, Dalley R, Dee N, Ding SL, Ellenbogen RG, Fong O, Garren E, Goldy J, Gwinn RP, Hirschstein D, Keene CD, Keshk M, Ko AL, Lathia K, Mahfouz A, Maltzer Z, McGraw M, Nguyen TN, Nyhus J, Ojemann JG, Oldre A, Parry S, Reynolds S, Rimorin C, Shapovalova NV, Somasundaram S, Szafer A, Thomsen ER, Tieu M,

Quon G, Scheuermann RH, Yuste R, Sunkin SM, Lelieveldt B, Feng D, Ng L, Bernard A, Hawrylycz M, Phillips JW, Tasic B, Zeng H, Jones AR, Koch C, Lein ES (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 573(7772):61-68.

Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2015) Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nat Rev Neurosci* 16(3):133-46.

Horike SI, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T (2005) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 37:31-40.

Hu H, Gan J, Jonas P (2014) Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345(6196):1255-263.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287(5455):1056-60.

Inamura N, Kimura T, Tada S, Kurahashi T, Yanagida M, Yanagawa Y, Ikenaka K, Murakami F (2012) Intrinsic and extrinsic mechanisms control the termination of cortical interneuron migration. *J Neurosci* 32(17):6032-42.

Inan M, Welagen J, Anderson SA (2012) Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* 22(4):820-7.

Inohana M, Eguchi A, Nakamura M, Nagahara R, Onda N, Nakajima K, Saegusa Y, Yoshida T, Shibutani M (2018) Developmental Exposure to Aluminum Chloride Irreversibly Affects Postnatal Hippocampal Neurogenesis Involving Multiple Functions in Mice. *Toxicol Sci* 164(1):264-277.

Jackson IT, Hussain K (1990) Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. *Plast.Reconstr.Surg.* 85: 505-512.

Jaffer Z, Nelson M, Beighton P (1981) Bone fusion in the foetal alcohol syndrome. *J Bone Joint Surg Br* 63B(4):569-71.

Jakovcevski I, Mayer N, Zecevic N (2011) Multiple origins of human neocortical interneurons are supported by distinct expression of transcription factors. *Cereb Cortex* 21(8):1771-82.

Jarmasz JS, Basalah DA, Chudley AE, Del Bigio MR (2017) Human Brain Abnormalities Associated With Prenatal Alcohol Exposure and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *J Neuropathol Exp Neurol* 76(9):813-833.

Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, Marcorelles P, Roy V, Laquerrière A, Gonzalez BJ (2012) Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol* 72(6):952-60.

Jeret JS, Serur D, Wisniewski KE, Lubin RA (1987) Clinicopathological findings associated with agenesis of the corpus callosum. *Brain Dev* 9: 255-264.

- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS (2015) Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* 350(6264):aac9462.
- Jiang X, Nardelli J (2016) Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 92(Pt A):3-17.
- Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsáki G, Somogyi P (2007) Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci* 27(33):8790-804.
- Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302(7836):999-1001.
- Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth P (1974) Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1(7815):1267-71.
- Jones EG (2009) The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex* 19(9):1953-6.
- Karl PI, Harvey B, Fisher SE (1996) Ethanol and mitotic inhibitors promote differentiation of trophoblastic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 20(7):1269-74.
- Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, Barr M, Bonneau D, Brady AF, Carpenter NJ, Cipero KL, Frisone F, Fukuda T, Guerrini R, Iida E, Itoh M, Lewanda AF, Nanba Y, Oka A, Proud VK, Saugier-veber P, Schelley SL, Selicorni A, Shaner R, Silengo M, Stewart F, Sugiyama N, Toyama J, Toutain A, Vargas AL, Yanazawa M, Zackai EH, Dobyns WB (2004) Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 23(2):147-59.
- Kato M, Dobyns WB (2005) X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". *J Child Neurol* 20(4):392-7.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85(3):677-701.
- Kay HH, Grindle KM, Magness RR (2000) Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 182(3):682-8.
- Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ (2002) Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol* 37: 87-92.
- Kostović I, Sedmak G, Judaš M (2019) Neural histology and neurogenesis of the human fetal and infant brain. *Neuroimage* 188:743-773.

- Kulwa E, Tharakan T, Baxi L (2005) Congenital cystic adenomatoid malformation in the fetus: a hypothesis of its development. *Fetal Diagn Ther* 20: 472-474.
- Lamarche F, Carcenac C, Gonthier B, Cottet-Rousselle C, Chauvin C, Barret L, Leverve X, Savasta M, Fontaine E (2013) Mitochondrial permeability transition pore inhibitors prevent ethanol-induced neuronal death in mice. *Chem Res Toxicol* 26(1):78-88.
- Lancaster F, Delaney C, Samorajski T (1989) Synaptic density of caudate-putamen and visual cortex following exposure to ethanol in utero. *Int J Dev Neurosci* 7:581-9.
- 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(18):7881-8.
- Le TN, Zhou QP, Cobos I, Zhang S, Zagozewski J, Japoni S, Vriend J, Parkinson T, Du G, Rubenstein JL, Eisenstat DD (2017) GABAergic Interneuron Differentiation in the Basal Forebrain Is Mediated through Direct Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase Isoforms by *Dlx* Homeobox Transcription Factors. *J Neurosci* 37(36):8816-8829.
- Lebel C, Rasmussen C, Wyper K, Walker L, Andrew G, Yager J, Beaulieu C (2008) Brain diffusion abnormalities in children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 32(10):1732-40.
- Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, Lesueur C, Ramdani Y, Jégou S, Uguen A, Marcorelles P, Marret S, Gonzalez BJ (2017) PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun* 5(1):44.
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, Fishell G, Rudy B (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30(50):16796-808.
- Lee HS, Oh SJ, Lee KH, Lee YS, Ko E, Kim KE, Kim HC, Kim S, Song PH, Kim YI, Kim C, Han S (2014) Gln-362 of angiopoietin-2 mediates migration of tumor and endothelial cells through association with $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J Biol Chem* 289(45):31330-40.
- Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frebourg T, Leroux P, Vivien D, Lecointre M, Marret S, Gonzalez BJ (2020a) Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci* 77(10):1959-1986.
- Léger C, Dupré N, Laquerrière A, Lecointre M, Dumanoir M, Janin F, Hauchecorne M, Fabre M, Jégou S, Frébourg T, Cleren C, Leroux P, Marcorelles P, Brasse-Lagnel C, Marret S, Marguet F, Gonzalez BJ (2020b) In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. *Neurobiol Dis*. Epub ahead of print.
- Leicher-Duber A, Schumacher R, Spranger J (1990) Stippled epiphyses in fetal alcohol syndrome. *Pediatr Radiol* 20: 369-370.

Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC (1968) Les enfants des parents alcooliques. Anomalies observées à propos de 127 cas. *Ouest Medical* 25, 76-82.

Leong SY, Rao VT, Bin JM, Gris P, Sangaralingam M, Kennedy TE, Antel JP (2014) Heterogeneity of oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain. *Ann Clin Transl Neurol* 1(4):272-83.

Leroy B, Lefort F (1971) A propos du poids et de la taille des nouveau-nés à la naissance [The weight and size of newborn infants at birth]. *Rev Fr Gynecol Obstet* 66(6):391-6. French. PMID: 5112836.

Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417(6889):645-9.

Lewitus E, Kelava I, Huttner WB (2013) Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front Hum Neurosci* 7:424.

Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H (2011) Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* 55(4-5):467-76.

Li G, Adesnik H, Li J, Long J, Nicoll RA, Rubenstein JL, Pleasure SJ (2008) Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci* 28(5):1085-98.

Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O (2018) Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100(2):294-313.

Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V (2007) Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 27(12):3078-89.

Liu Z, Zhang Z, Lindtner S, Li Z, Xu Z, Wei S, Liang Q, Wen Y, Tao G, You Y, Chen B, Wang Y, Rubenstein JL, Yang Z (2019) Sp9 Regulates Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneuron Development. *Cereb Cortex* 29(6):2653-2667.

Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P (2011) Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69(4):763-79.

Long JE, Cobos I, Potter GB, Rubenstein JL (2009) Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1(Suppl 1):i96-106.

López-Bendito G, Luján R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnár Z (2003) Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* 13(9):932-42.

Loser H, Pfefferkorn JR, Themann H (1992) Alcohol in pregnancy and fetal heart damage. *Klin Padiatr* 204: 335-339.

- Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR (2011) Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146(1):18-36.
- Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK (2015) Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci* 16(8):445-457.
- Luo J, Miller MW (1998) Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res Brain Res Rev* 27(2):157-67.
- Lussier AA, Weinberg J, Kobor MS (2017) Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics* 9(3):291-311.
- Maden M (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209:1-77.
- Malik S, Vinukonda G, Vose LR, Diamond D, Bhimavarapu BB, Hu F, Zia MT, Hevner R, Zecevic N, Ballabh P (2013) Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J Neurosci* 33(2):411-23.
- Mangyanda MK, Mbuila C, Geniez L, Personne A, Boize P et al. (1998) Fetal alcohol syndrome and hypertrophic pyloric stenosis in two brothers. *Arch Pediatr* 5: 695-696.
- Marcorelles P, Laquerrière A, Adde-Michel C, Marret S, Saugier-Verber P, Beldjord C, Friocourt G (2010) Evidence for tangential migration disturbances in human lissencephaly resulting from a defect in LIS1, DCX and ARX genes. *Acta Neuropathol* 120(4):503-15.
- Marcorelles P, Laquerriere A (2010) Neuropathology of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(1):109-19.
- Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A (2010). Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7:4281-4304.
- Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2(11):780-90.
- Marín O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293(5531):872-5.
- Marín O, Plump AS, Flames N, Sánchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130(9):1889-901.
- Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai LH (2010) Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a001834.
- Marín O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13(2):107-20.

- Marín O (2013) Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* 38(1):2019-29.
- Marín-Padilla M, Knopman DS (2011) Developmental aspects of the intracerebral microvasculature and perivascular spaces: insights into brain response to late-life diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(12):1060-9.
- Marinou K, Christodoulides C, Antoniadou C, Koutsilieris M (2012) Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23(12), 628–636.
- Maroteaux P, Lavollay B, Bomsell F, Gautry P, Vigneron J, Walbaum R (1984) Chondrodysplasia punctata and maternal alcohol intoxication. A propos of 7 cases. *Arch Fr Pediatr* 41(8):547-50.
- Marques-Smith A, Lyngholm D, Kaufmann AK, Stacey JA, Hoerder-Suabedissen A, Becker EB, Wilson MC, Molnár Z, Butt SJ (2016) A Transient Translaminar GABAergic Interneuron Circuit Connects Thalamocortical Recipient Layers in Neonatal Somatosensory Cortex. *Neuron* 89(3):536-49.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. 302(5646):890-3.
- Mayer C, Jaglin XH, Cobbs LV, Bandler RC, Streicher C, Cepko CL, Hippenmeyer S, Fishell G (2015) Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both Functional Areas and Structural Boundaries. *Neuron* 87(5):989-98.
- McCarthy DM, Bhide PG (2012) Prenatal cocaine exposure decreases parvalbumin-immunoreactive neurons and GABA-to-projection neuron ratio in the medial prefrontal cortex. *Dev Neurosci* 34(2-3):174-83.
- McKinsey GL, Lindtner S, Trzcinski B, Visel A, Pennacchio LA, Huylebroeck D, Higashi Y, Rubenstein JL (2013) Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron* 77(1):83-98.
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE (2016) The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol* 15(3):304-16.
- Mei L, Nave KA (2014) Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron* 83(1):27-49.
- Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, Monyer H (2012) Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 335(6075):1506-10.
- Meyer G, González-Gómez M (2018) The Subpial Granular Layer and Transient Versus Persisting Cajal-Retzius Neurons of the Fetal Human Cortex. *Cereb Cortex* 28(6):2043-2058.

Miller MW (1993) Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 17:304–14.

Minarovits J, Banati F, Szenthe K, Niller HH (2016) Epigenetic Regulation. *Adv Exp Med Biol* 879:1-25.

Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G (2007) Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27(29):7786-98.

Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010) Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* (5):1582-94.

Miyoshi G, Fishell G (2011) GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex* 21(4):845-52.

Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF, Hüppi PS, Kostović I, Rakic P, Anton ES, Edwards D, Garcez P, Hoerder-Suabedissen A, Kriegstein A (2019) New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat* 235(3):432-451.

Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C (2006) Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol* 499(4):565-82.

Moore ES, Ward RE, Jamison PL, Morris CA, Bader PI, Hall BD (2001) The subtle facial signs of prenatal exposure to alcohol: an anthropometric approach. *J.Pediatr.* **139**: 215-219.

Moore ES, Ward RE, Wetherill LF, Rogers JL, Autti-Ramo I et al. (2007) Unique facial features distinguish fetal alcohol syndrome patients and controls in diverse ethnic populations. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 1707-1713.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (2013) *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 9^{ème} ed. Issy les Moulineaux: Elsevier

Muller D, Mendez P, Deroo M, Klausner P, Steen S, Poglia L (2010) Role of NCAM in spine dynamics and synaptogenesis. *Adv Exp Med Biol* 663:245-56.

Naseer MI, Ullah I, Rasool M, Ansari SA, Sheikh IA, bibi F, Chaudhary AG, Al-Qahtani MH, Kim, MOK (2014) Downregulation of dopamine D1 receptors and increased neuronal apoptosis upon ethanol and PTZ exposure in prenatal rat cortical and hippocampal neurons. *Neurological sciences* 35:1681-1688.

Nava-Ocampo AA, Velazquez-Armenta Y, Brien JF, Koren G (2004) Elimination kinetics of ethanol in pregnant women. *Reprod Toxicol* 18: 613-617.

Neddens J, Buonanno A (2010) Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus* 20(6):724-44.

- Nevo I, Hamon M (1995) Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochemistry International*. 26:305-336.
- Nickell CRG, Peng H, Hayes DM, Chen KY, McClain JA, Nixon K (2017) Type 2 Neural Progenitor Cell Activation Drives Reactive Neurogenesis after Binge-Like Alcohol Exposure in Adolescent Male Rats. *Front Psychiatry* 8:283.
- Niemelä O (2016) Biomarker-Based Approaches for Assessing Alcohol Use Disorders. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Jan 27;13(2):166.
- Nigro MJ, Hashikawa-Yamasaki Y, Rudy B (2018) Diversity and Connectivity of Layer 5 Somatostatin-Expressing Interneurons in the Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci* 38(7):1622-1633.
- Niquille M, Limoni G, Markopoulos F, Cadilhac C, Prados J, Holtmaat A, Dayer A (2018) Neurogliaform cortical interneurons derive from cells in the preoptic area. *Elife* 7:e32017.
- Nóbrega-Pereira S, Kessaris N, Du T, Kimura S, Anderson SA, Marín O (2008) Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59(5):733-45.
- Norman MG, O'Kusky JR (1986) The growth and development of microvasculature in human cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 45(3):222-32.
- Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Endo K, Oshima M, Kaneko N, Yura K, Okado H, Miyata T, Maeda N (2018) Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science* 360(6386):313-317.
- Okamoto M, Katayama T, Suzuki Y, Hoshino KY, Yamada H, Matsuoka N, Jodo E (2012) Neonatal administration of phencyclidine decreases the number of putative inhibitory interneurons and increases neural excitability to auditory paired clicks in the hippocampal CA3 region of freely moving adult mice. *Neuroscience* 224:268-81.
- Olney JW, Ishimaru MJ, Bittigau P, Ikonomidou C (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis* 5: 515-521.
- Otero NK, Thomas JD, Saski CA, Xia X, Kelly SJ (2012) Choline supplementation and DNA methylation in the hippocampus and prefrontal cortex of rats exposed to alcohol during development. *Alcohol Clin Exp Res* 36(10):1701-9.
- Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, Sandoval K, Rowitch DH, Xu D, McQuillen PS, Garcia-Verdugo JM, Huang EJ, Alvarez-Buylla A (2016) Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354(6308):aaf7073.
- Paridaen JT, Huttner WB (2014) Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 15(4):351-64.

- Park JA, Choi KS, Kim SY, Kim KW (2003) Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches. *Biochem Biophys Res Commun* 311(2):247-53.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8(4):287-99.
- Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, Kelly SJ (2013) Alcohol exposure during development: Impact on the epigenome. *Int J Dev Neurosci* 31(6):391-7.
- Petanjek Z, Judas M, Kostović I, Uylings HB (2008) Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layer-specific pattern. *Cereb Cortex* 18(4):915-29.
- Petanjek Z, Kostović I, Esclapez M (2009) Primate-specific origins and migration of cortical GABAergic neurons. *Front Neuroanat* 3:26.
- Petanjek Z, Judaš M, Šimic G, Rasin MR, Uylings HB, Rakic P, Kostovic I (2011) Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32):13281-6.
- Petryniak MA, Potter GB, Rowitch DH, Rubenstein JL (2007) Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 55(3):417-33.
- Pierce DR, Williams DK, Light KE (1999) Purkinje cell vulnerability to developmental ethanol exposure in the rat cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* 23(10):1650-9.
- Pla R, Borrell V, Flames N, Marín O (2006) Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* 26(26):6924-34.
- Pla R, Stanco A, Howard MA, Rubin AN, Vogt D, Mortimer N, Cobos I, Potter GB, Lindtner S, Price JD, Nord AS, Visel A, Schreiner CE, Baraban SC, Rowitch DH, Rubenstein JLR (2018) Dlx1 and Dlx2 Promote Interneuron GABA Synthesis, Synaptogenesis, and Dendritogenesis. *Cereb Cortex* 28(11):3797-3815.
- Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J (2017) Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 5(3):e290-e299.
- Portales-Casamar E, Lussier AA, Jones MJ, MacIsaac JL, Edgar RD, Mah SM, Barhdadi A, Provost S, Lemieux-Perreault LP, Cynader MS, Chudley AE, Dubé MP, Reynolds JN, Pavlidis P, Kobor MS (2016) DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder. *Epigenetics Chromatin* 9:25.
- Priya R, Paredes MF, Karayannis T, Yusuf N, Liu X, Jaglin X, Graef I, Alvarez-Buylla A, Fishell G (2018) Activity Regulates Cell Death within Cortical Interneurons through a Calcineurin-Dependent Mechanism. *Cell Rep* 22(7):1695-1709.

- Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Möck M, Witte M, Staiger JF (2015) Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of VIPcre/tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences. *Cereb Cortex* 25(12):4854-68.
- Radonjić NV, Ayoub AE, Memi F, Yu X, Maroof A, Jakovcevski I, Anderson SA, Rakic P, Zecevic N (2014) Diversity of cortical interneurons in primates: the role of the dorsal proliferative niche. *Cell Rep* 9(6):2139-51.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241(4862):170-6.
- Rakic S, Zecevic N (2003) Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* (10):1072-83.
- Rapanelli M, Frick LR, Pittenger C (2017) The Role of Interneurons in Autism and Tourette Syndrome. *Trends Neurosci* 40(7):397-407.
- Rash BG, Duque A, Morozov YM, Arellano JI, Micali N, Rakic P (2019) Gliogenesis in the outer subventricular zone promotes enlargement and gyrification of the primate cerebrum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(14):7089-7094.
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28(6):278-83.
- Resendiz M, Mason S, Lo CL, Zhou FC (2014) Epigenetic regulation of the neural transcriptome and alcohol interference during development. *Front Genet* 5:285.
- Reynolds GP, Beasley CL (2001) GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex--development and deficits in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 22(1-2):95-100.
- Rice PA, Nesbitt RE Jr, Cuenca VG, Zhang W, Gordon GB, Kim TJ (1986) The effect of ethanol on the production of lactate, triglycerides, phospholipids, and free fatty acids in the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 155(1):207-11.
- Richards LJ, Plachez C, Ren T (2004) Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 66(4):276-89.
- Riley EP, McGee CL (2005) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(6):357-65.
- Riley EP, Infante MA, Warren KR (2011) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev* 21(2):73-80.
- Roebuck TM, Mattson SN, Riley EP (1998) A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 22(2):339-44.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468(7321), 214–222.

- Rubert G, Miñana R, Pascual M, Guerri C (2006) Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 84(3):483-96.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71(1):45-61.
- Ruhrberg C, Bautch VL (2013) Neurovascular development and links to disease. *Cell Mol Life Sci* 70(10):1675-84.
- Saghatelyan A (2009) Role of blood vessels in the neuronal migration. *Semin Cell Dev Biol* 20(6):744-50.
- Sánchez-Alcañiz JA, Haegel S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, López-Bendito G, Stumm R, Marín O (2011) *Cxcr7* controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* 69(1):77-90.
- Sandberg M, Flandin P, Silberberg S, Su-Feher L, Price JD, Hu JS, Kim C, Visel A, Nord AS, Rubenstein JLR (2016) Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of Forebrain GABAergic Neurons. *Neuron* 91(6):1260-1275.
- Sanderson JL, Donald Partridge L, Fernando Valenzuela C (2009) Modulation of GABAergic and glutamatergic transmission by ethanol in the developing neocortex: an in vitro test of the excessive inhibition hypothesis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 56:541– 55.
- Sant'Anna LB, Tosello DO (2006) Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. *Orthod Craniofac Res* 9: 172-185.
- Sathyan P, Golden HB, Miranda RC (2007) Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *J Neurosci* 27(32):8546-57.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M (1993) Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction* 88: 791-804.
- Schilgen M, Loeser H (1994) Klippel-Feil anomaly combined with fetal alcohol syndrome. *Eur Spine J* 3: 289-290.
- Schoenwolf GC, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P (2017) *Embryologie Humaine de Larsen*. 4^{ème} ed. Paris: de Boeck.
- Seki M, Seki M, Seki M, Yoshida K, Kashimura M (2005) A case of fetal alcohol effects with orofacial cleft. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 40(2):137-43.
- Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A (2015) Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol* 38:2-6.

Silberberg G, Markram H (2007) Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53(5):735-46.

Simons M, Nave KA (2015) Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(1):a020479.

Skaper SD, Moore SE, Walsh FS (2001) Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 65(6):593-608.

Skorput AG, Yeh HH (2015) Effects of ethanol exposure in utero on Cajal-Retzius cells in the developing cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 39(5):853-62.

Skorput AG, Yeh HH (2016) Chronic gestational exposure to ethanol leads to enduring aberrances in cortical form and function in the medial prefrontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 40:1479–88.

Smith SM, Garic A, Flentke GR, Berres ME (2014) Neural crest development in fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102(3):210-20.

Somogyi P, Freund TF, Cowey A (1982) The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7(11):2577-607.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95(1):29-39.

Stumm R, Kolodziej A, Schulz S, Kohtz JD, Höllt V (2007) Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *J Comp Neurol* 502(3):382-99.

Subbanna S, Psychoyos D, Xie S, Basavarajappa BS (2015) Postnatal ethanol exposure alters levels of 2-arachidonylglycerol-metabolizing enzymes and pharmacological inhibition of monoacylglycerol lipase does not cause neurodegeneration in neonatal mice. *J Neurochem* 134(2):276-87.

Südhof TC (2018) Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron* 100(2):276-293.

Sulik KK (2005) Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(6):366-75.

Sun T, Hevner RF (2014) Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat Rev Neurosci* 15(4):217-32.

Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126(15):3359-70.

Tam SJ, Watts RJ (2010) Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 33:379-408.

Tanaka T, Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Ideta-Ohtsuka M, Woo GH, Yoshida T, Igarashi K, Shibutani M (2019) Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Toxicol Sci* (2):93-105.

Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ (2013) The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* 339(6115):70-4.

Tasic B, Yao Z, Graybiack LT, Smith KA, Nguyen TN, Bertagnolli D, Goldy J, Garren E, Economo MN, Viswanathan S, Penn O, Bakken T, Menon V, Miller J, Fong O, Hirokawa KE, Lathia K, Rimorin C, Tieu M, Larsen R, Casper T, Barkan E, Kroll M, Parry S, Shapovalova NV, Hirschstein D, Pendergraft J, Sullivan HA, Kim TK, Szafer A, Dee N, Groblewski P, Wickersham I, Cetin A, Harris JA, Levi BP, Sunkin SM, Madisen L, Daigle TL, Looger L, Bernard A, Phillips J, Lein E, Hawrylycz M, Svoboda K, Jones AR, Koch C, Zeng H (2018) Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature* 563(7729):72-78.

Tatsumi K, Isonishi A, Yamasaki M, Kawabe Y, Morita-Takemura S, Nakahara K, Terada Y, Shinjo T, Okuda H, Tanaka T, Wanaka A (2018) Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes. *Front Neuroanat* 12:8.

Tenkova T, Young C, Dikranian K, Labruyere J, Olney JW (2003) Ethanol-induced apoptosis in the developing visual system during synaptogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7):2809-17.

Terrapon M, Schneider P, Friedli B, Cox JN (1977) Aortic arch interruption type A with aortopulmonary fenestration in an offspring of a chronic alcoholic mother ("fetal alcohol syndrome"). *Helv Paediatr Acta* 32: 141-148.

Thompson DK, Warfield SK, Carlin JB, Pavlovic M, Wang HX, Bear M, Kean MJ, Doyle LW, Egan GF, Inder TE (2007) Perinatal risk factors altering regional brain structure in the preterm infant. *Brain* 130(Pt 3):667-77.

Tiveron MC, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, König N, Cremer H (2006) Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* 26(51):13273-8.

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91(2):260-92.

Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SP (2016) Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351(6271):379-84.

Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, Osakada F, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G (2016) Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron* 89(3):521-35.

Uhlhaas PJ, Singer W (2010) Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11(2):100-13.

Valles S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, Guerri C (1997) Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *J Neurochem* 69: 2484-2493.

Vallon M, Chang J, Zhang H, Kuo CJ (2014) Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 71(18):3489-506.

Vasudevan A, Long JE, Crandall JE, Rubenstein JL, Bhide PG (2008) Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. *Nat Neurosci* 11(4):429-39.

Veazey KJ, Parnell SE, Miranda RC, Golding MC (2015) Dose-dependent alcohol-induced alterations in chromatin structure persist beyond the window of exposure and correlate with fetal alcohol syndrome birth defects. *Epigenetics Chromatin* 8:39.

Vogt D, Hunt RF, Mandal S, Sandberg M, Silberberg SN, Nagasawa T, Yang Z, Baraban SC, Rubenstein JL (2014) Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position. *Neuron* 82(2):350-64.

Von Engelhardt J, Khrulev S, Eliava M, Wahlster S, Monyer H (2011) 5-HT(3A) receptor-bearing white matter interstitial GABAergic interneurons are functionally integrated into cortical and subcortical networks. *J Neurosci* 31(46):16844-54.

Vullhorst D, Neddens J, Karavanova I, Tricoire L, Petralia RS, McBain CJ, Buonanno A (2009) Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *J Neurosci* 29(39):12255-64.

Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004) Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561(Pt 1):65-90.

Wang Y, Dye CA, Sohal V, Long JE, Estrada RC, Roztocil T, Lufkin T, Deisseroth K, Baraban SC, Rubenstein JL (2010) Dlx5 and Dlx6 regulate the development of parvalbumin-expressing cortical interneurons. *J Neurosci* 30(15):5334-45.

Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, Pleasure SJ, Behrens T, Rubenstein JL (2011) CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* 69(1):61-76.

Wang B, Long JE, Flandin P, Pla R, Waclaw RR, Campbell K, Rubenstein JL (2013) Loss of Gsx1 and Gsx2 function rescues distinct phenotypes in Dlx1/2 mutants. *J Comp Neurol* 521(7):1561-84.

Watanabe Y, Murakami T, Kawashima M, Hasegawa-Baba Y, Mizukami S, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M (2017) Maternal Exposure to Valproic Acid Primarily Targets Interneurons Followed by Late Effects on Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus in Rat Offspring. *Neurotox Res* 31(1):46-62.

- Watanabe Y, Abe H, Nakajima K, Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M (2018) Aberrant Epigenetic Gene Regulation in GABAergic Interneuron Subpopulations in the Hippocampal Dentate Gyrus of Mouse Offspring Following Developmental Exposure to Hexachlorophene. *Toxicol Sci* 163(1):13-25.
- Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* 426(6965):442-6.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128(19):3759-71.
- Wilhelm CJ, Guizzetti M (2016) Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective. *Front Integr Neurosci* 9:65.
- Wilkinson G, Dennis D, Schuurmans C (2013) Proneural genes in neocortical development. *Neuroscience* 253:256-73.
- Wisniewski K, Dambaska M, Sher JH, Qazi Q (1983) A clinical neuropathological study of the fetal alcohol syndrome. *Neuropediatrics* 14(4):197-201.
- Wittko-Schneider IM, Schneider FT, Plate KH (2014) Cerebral angiogenesis during development: who is conducting the orchestra? *Methods Mol Biol* 1135:3-20.
- Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhail A, Szabó G, Vasudevan A (2013) Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun* 4:2149.
- Wong FK, Bercsenyi K, Sreenivasan V, Portalés A, Fernández-Otero M, Marín O (2018) Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* 557(7707):668-673.
- Wozniak JR, Riley EP, Charness ME (2019) Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. *Lancet Neurol* 18(8):760-770.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2006) Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J Comp Neurol* 499(1):144-60.
- Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B (2013) Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron* 77(1):155-67.
- Yau HJ, Wang HF, Lai C, Liu FC (2003) Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13(3):252-64.
- Ye Z, Mostajo-Radji MA, Brown JR, Rouaux C, Tomassy GS, Hensch TK, Arlotta P (2015) Instructing Perisomatic Inhibition by Direct Lineage Reprogramming of Neocortical Projection Neurons. *Neuron* 88(3):475-83.

Zaitsev AV. The role of cortical and hippocampal GABAergic interneurons in epilepsy (2016) *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 102(5):513-28.

Zhang H, Sun XR, Wang J, Zhang ZZ, Zhao HT, Li HH, Ji MH, Li KY, Yang JJ (2016) Reactive Oxygen Species-mediated Loss of Phenotype of Parvalbumin Interneurons Contributes to Long-term Cognitive Impairments After Repeated Neonatal Ketamine Exposures. *Neurotox Res* 30(4):593-605.

Zhang Y, Wang H, Li Y, Peng Y (2018) A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress. *Int J Dev Neurosci* 71:140-145

Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, Bolz J (2011) Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci* 31(50):18364-80.

Zorumski CF, Mennerick S, Izumi Y (2014) Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol*. 48:1-17.

ANNEXES

Girault V, Gilard V, **Marguet F**, Lesueur C, Hauchecorne M, Ramdani Y, Laquerrière A, Marret S, Jégou S, Gonzalez BJ, Brasse-Lagnel C, Bekri S (2017) Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis* 8(2):e2610.

Léger C, Dupré N, Laquerrière A, Lecointre M, Dumanoir M, Janin F, Hauchecorne M, Fabre M, Jégou S, Frébourg T, Cleren C, Leroux P, Marcorelles P, Brasse-Lagnel C, Marret S, **Marguet F**, Gonzalez BJ (2020) In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. *Neurobiol Dis*. Epub ahead of print.

Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels

Virginie Girault¹, Vianney Gilard^{1,2}, Florent Marguet^{1,3}, Cécile Lesueur^{1,4}, Michelle Hauchecorne¹, Yasmina Ramdani¹, Annie Laquerrière^{1,3}, Stéphane Marret^{1,5}, Sylvie Jégou¹, Bruno Jose Gonzalez¹, Carole Brasse-Lagnel^{1,6} and Soumeïya Bekri^{1,4,6}

Brain developmental lesions are a devastating consequence of prenatal alcohol exposure (PAE). We recently showed that PAE affects cortical vascular development with major effects on angiogenesis and endothelial cell survival. The underlying molecular mechanisms of these effects remain poorly understood. This study aimed at characterizing the ethanol exposure impact on the autophagic process in brain microvessels in human fetuses with fetal alcohol syndrome (FAS) and in a PAE mouse model. Our results indicate that PAE induces an increase of autophagic vacuole number in human fetal and neonatal mouse brain cortical microvessels. Subsequently, *ex vivo* studies using green fluorescent protein (GFP)-LC3 mouse microvessel preparations revealed that ethanol treatment alters autophagy in endothelial cells. Primary cultures of mouse brain microvascular endothelial cells were used to characterize the underlying molecular mechanisms. LC3 and p62 protein levels were significantly increased in endothelial cells treated with 50 mM ethanol. The increase of autophagic vacuole number may be due to excessive autophagosome formation associated with the partial inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway upon ethanol exposure. In addition, the progression from autophagosomes to autolysosomes, which was monitored using autophagic flux inhibitors and mRFP-EGFP vector, showed a decrease in the autolysosome number. Besides, a decrease in the Rab7 protein level was observed that may underlie the impairment of autophagosome-lysosome fusion. In addition, our results showed that ethanol-induced cell death is likely to be mediated by decreased mitochondrial integrity and release of apoptosis-inducing factor. Interestingly, incubation of cultured cells with rapamycin prevented ethanol effects on autophagic flux, ethanol-induced cell death and vascular plasticity. Taken together, these results are consistent with autophagy dysregulation in cortical microvessels upon ethanol exposure, which could contribute to the defects in angiogenesis observed in patients with FAS. Moreover, our results suggest that rapamycin represents a potential therapeutic strategy to reduce PAE-related brain developmental disorders.

Cell Death and Disease (2017) 8, e2610; doi:10.1038/cddis.2017.29; published online 9 February 2017

Prenatal alcohol exposure (PAE) causes various fetal developmental abnormalities, with the brain being particularly affected.¹ Fetal alcohol syndrome (FAS) combines severe symptoms including intrauterine growth retardation, a characteristic craniofacial dysmorphism, central nervous system developmental abnormalities and behavioral/neurocognitive disturbances. In industrialized countries, FAS is the main cause of acquired, nongenetic mental retardation.² Of note, partial FAS (pFAS) patients are usually not recognized until they present with psychosocial and often neurodevelopmental disabilities during childhood. The most devastating consequence of PAE in the developing brain is neuron loss,^{3,4} which has an age-dependent window of vulnerability.^{5,6} Neuronal loss is linked to massive apoptosis mediated by the intrinsic apoptotic pathway via caspase-3 activation.⁷ A recent study suggested that the immature brain is particularly vulnerable to ethanol because of a high expression of proapoptotic proteins and low expression of genes involved in stress response systems such as unfolded protein response or autophagy.⁸

It has also been shown that autophagy activation is a neuroprotective response that alleviates ethanol toxicity.^{9,10}

Autophagy is a process used by cells to recycle long-lived proteins and defective organelles. During this housekeeping process, the intracytoplasmic material is enclosed in double membranes to form autophagosomes that are subsequently delivered to lysosomes for degradation. The autophagic process is highly regulated; several autophagy-related genes (*Atg*) are involved in the formation and maturation of autophagosomes. Microtubule-associated protein light chain 3 (MAP-LC3 or LC3), a mammalian homolog of yeast Atg8, is a component of the autophagosomal membrane. During autophagy, the cytosolic LC3-I cytosolic form is lipidized with phosphatidylethanolamine to form LC3-II, which binds to autophagosomal membranes until its degradation in the autolysosome.¹¹ LC3-II is therefore used as a marker of autophagic vacuoles. The digestive function of autophagy contributes to cellular homeostasis through quality control for cytoplasmic components. Recent studies have implicated autophagy in cell death by demonstrating many connections

¹Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1245, NeoVasc Team, Rouen, France; ²Department of Neurosurgery, Rouen University Hospital, Rouen, France; ³Pathology Laboratory, Rouen University Hospital, Rouen, France; ⁴Department of Metabolic Biochemistry, Rouen University Hospital, Rouen, France and ⁵Department of Neonatal Pediatrics and Intensive Care and Neuropediatrics, Rouen University Hospital, Rouen, France

*Corresponding author: S Bekri, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1245, NeoVasc Team, Rouen 76000, France. Tel: +332 328 88124; Fax: +332 328 88341; E-mail: soumeiya.bekri@chu-rouen.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

Received 30.8.16; revised 31.12.16; accepted 10.1.17; Edited by M Agostini

to apoptosis, a process with which autophagy shares regulators.^{12,13} Autophagy is also an adaptive response to nutrient stress that allows for macromolecule synthesis and ATP production.¹⁴ Interest in autophagy is growing and impairment of this process has been associated with an ever-lengthening list of diseases.¹⁵ In the brain, defects in the key genes involved in autophagy lead to neurodevelopmental abnormalities.¹⁶

We recently showed that PAE affects cortical angiogenesis in both mice and FAS patients suggesting that vascular defects contribute to alcohol-induced brain abnormalities.¹⁷ Importantly, microvessels have recently been shown to have a key role in nerve cell migration.¹⁸ PAE in mice leads to a lower cortical vascular density, a loss of the microvessel radial orientation and changes in VEGF receptor expression. In humans, stage-dependent changes in the vascular network have been observed in the cortex of fetuses with FAS. No modification was noted between 20 and 22 weeks of gestation (WG), but the radial organization of cortical microvessels was clearly altered in FAS patients from 30 WG. Moreover, it has been demonstrated that alcohol affects angiogenesis in adult nonhuman primates¹⁹ and mice.^{20,21} For example, alcohol modifies wound healing and vessel generation by decreasing angiogenesis.²⁰ However, the underlying mechanisms are not yet fully understood, and the effects of ethanol on autophagic process have not been yet investigated. This study aimed to investigate the potential effects of PAE on the autophagic process in cortical microvessels from pFAS/FAS human fetuses and from mice prenatally exposed to ethanol. The underlying molecular mechanisms were also investigated in mouse primary microvascular endothelial cells (MPMVEC).

Results

PAE induces an increase of autophagic vacuoles number in human fetal and neonatal mouse cortical microvessels.

Four human fetuses at developmental stages ranging from 29 to 34 WG were analyzed by immunohistochemistry using anti-LC3 and anti-GLUT1 (endothelial cell marker) antibodies. This immunolabeling revealed strong LC3-positive staining in the cortex of pFAS/FAS fetuses compared to control cortices (Figure 1a).

Numerous LC3 puncta were observed in cortical microvessels of pFAS/FAS fetuses, whereas cortical microvessels from control fetuses displayed less intense and more diffuse LC3 staining (Figure 1b). The number of LC3-positive dots per endothelial cell was quantified. All pFAS/FAS fetal cortices displayed a significant increase in LC3-positive dots compared to control cases (Figure 1c), suggesting that the number of autophagy vacuoles increases in cortical microvessels upon PAE.

Further experiments were conducted using previously validated model;¹⁷ pregnant mice received daily s.c. injections of sodium chloride or ethanol. Microvessels were extracted from pup brains at P2 and immunolabeled with anti-LC3 antibody. Confocal microscopy showed that LC3 signal was uniformly distributed in microvessels from control mice while it was restricted to dots in microvessels from animals with PAE (Figures 2a and b).

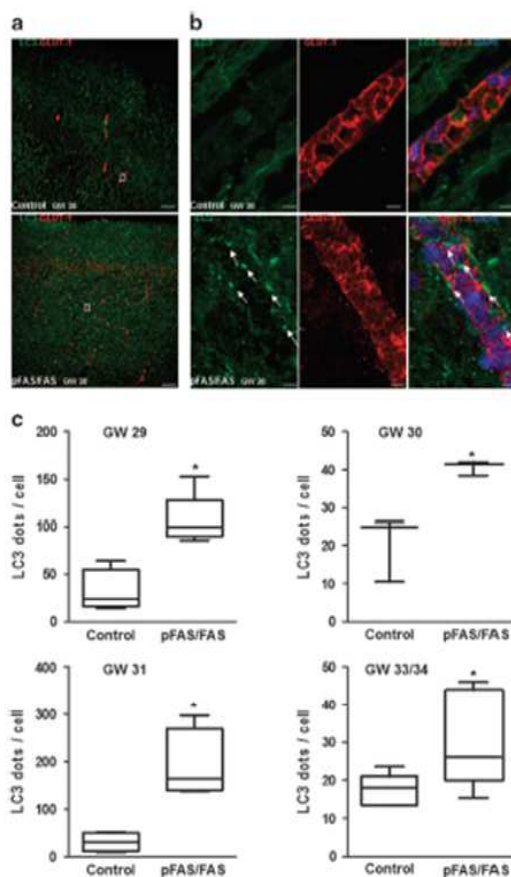


Figure 1 Autophagic vacuole content in brain microvessels of FAS human fetuses observed using confocal microscopy. (a) Example from a FAS human fetus at 30 GW with a strong LC3-positive and diffuse green staining in the superficial part of the cortex and disorganization of microvessels (red staining with GLUT1 antibody) compared to a cortical section from a control brain at the same gestational age. The scale bar represents 50 μ m. (b) At higher magnification: numerous LC3-positive dots in a cortical microvessel of FAS human fetus compared to the control fetus that displayed a less intense and more diffuse LC3 staining. The scale bar represents 5 μ m. Arrows indicate LC3-positive dots in endothelial cells. (c) Box whisker plot of LC3-positive dots per endothelial cell on confocal images for four FAS and age-matched control fetuses from 29 to 34 WG. Plot depicts the median, interquartile range and range of values of LC3 dots per cell measured in each sample. *P < 0.05 versus age-matched control, Mann-Whitney test

Besides, cortical microvessels were extracted from the neonatal cerebral cortex of green fluorescent protein (GFP)-LC3 C57BL/6 P2 mice and incubated with 50 mM ethanol for 6 h. GFP-LC3 was uniformly distributed in control conditions while this signal was limited to dots after ethanol exposure (Figures 2c and d). The number of LC3-positive dots was quantified and a significant increase in LC3-positive dots was observed in cells treated with ethanol compared to control cells (Figure 2e). Anti-GLUT1 antibody staining (Figure 2f) enabled localizing GFP-LC3 puncta within endothelial cells.

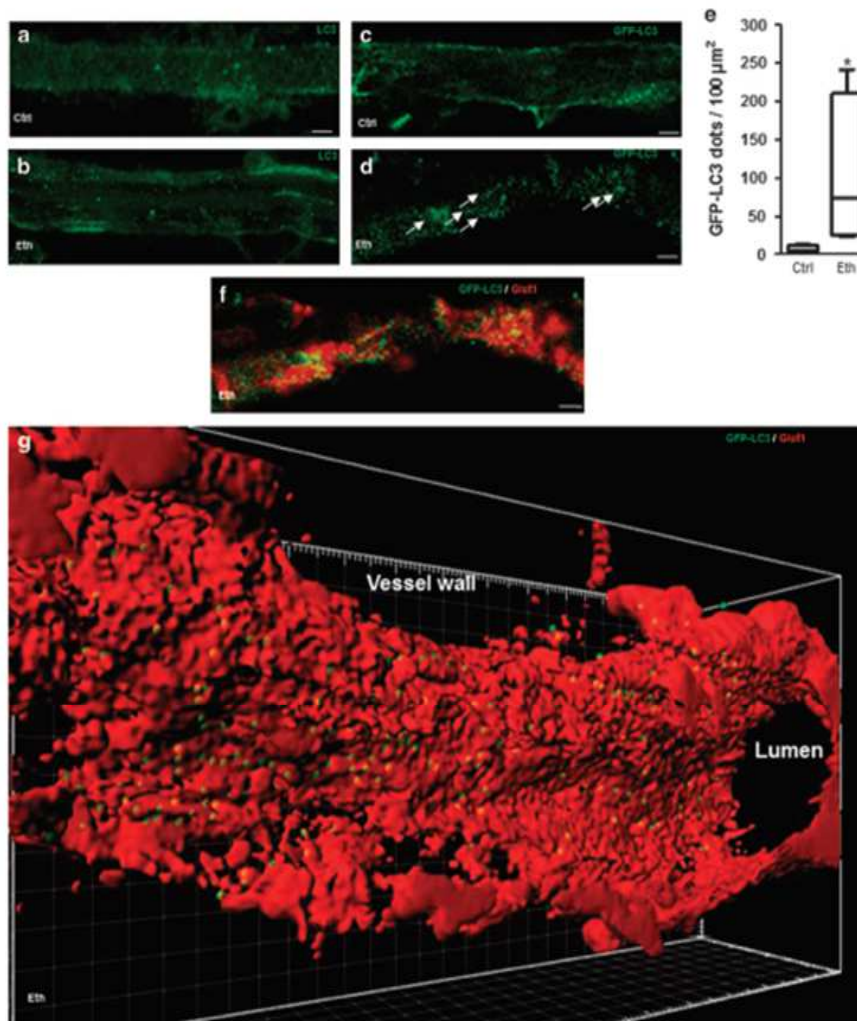


Figure 2 Autophagic vacuole content in mouse brain microvessels observed using confocal microscopy. (a and b) Daily s.c. injections of sodium chloride (0.9% NaCl) (a) or ethanol (3 g/kg, diluted 50% v/v in 0.9% NaCl) (b) were administered to pregnant NMRI mice from gestational day 13 to 1 day after parturition. Brain microvessels were extracted from P2 pups and immunolabeled with anti-LC3 antibody. (c and d) Brain cortical microvessels were extracted from P2 transgenic GFP-LC3 mice and incubated (c) without or (d) with 50 mM ethanol for 6 h. (e) Boxwhisker plot of GFP-LC3-dots per 100 μm². Plot depicts the median, interquartile range and range of values of LC3 dots measured in each sample. **P* < 0.05 versus age-matched control, Mann-Whitney test. (f) Brain microvessels extracted P2 transgenic GFP-LC3 mice incubated for 6 h with 50 mM ethanol were immunolabeled with the anti-GLUT1 antibody (red). The scale bar represents 10 μm. Arrows indicates LC3-positive dots. (g) Data were uploaded into Imaris for three-dimensional (3D) reconstitution and analysis with the Imaris MeasurementPro module

These data were then uploaded into Imaris for three-dimensional (3D) reconstitution and analyzed with the Imaris MeasurementPro module. This 3D reconstitution indicates that autophagic vacuoles were abundant and located within the microvessel endothelial cells (Figure 2g). This finding is also illustrated by the animation provided in Supplementary Material.

These data suggest that ethanol exposure impairs autophagy in brain cortical microvascular endothelial cells.

Therefore, cultured MPMVEC were used to further investigate if the LC3 puncta increase was related to excessive autophagosome production (the generated vacuole number exceeds that of the degraded vacuoles) or the inhibition of autophagic process final steps.²²

Effect of ethanol on autophagy activity in brain MPMVEC. LC3 immunoblotting using cultured primary MPMVEC derived from neonatal mouse brain allowed us to show that

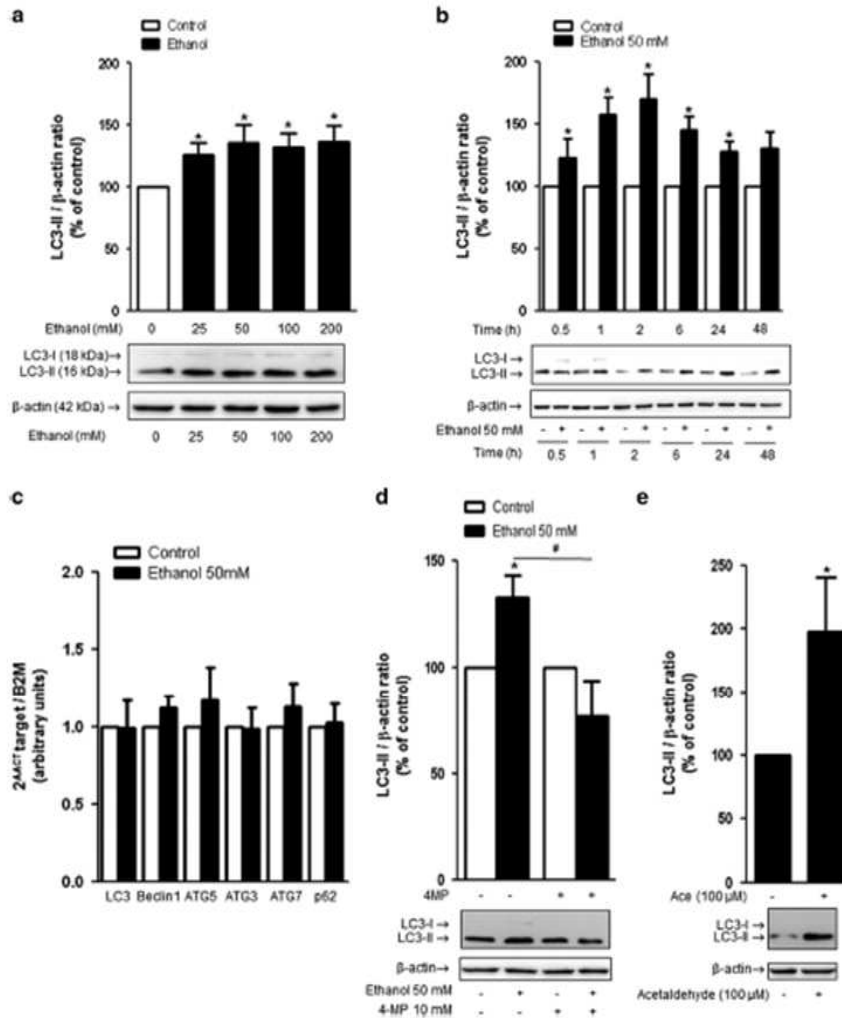


Figure 3 Effect of ethanol on autophagy activity in MPMVEC. (a) Influence of various concentrations of ethanol on LC3-II protein level. Western blot of cells incubated for 6 h in the presence or absence of 25, 50, 100 or 200 mM ethanol, showing LC3-I (18 kDa), LC3-II (16 kDa) and β-actin (42 kDa). The values are the means ± S.E.M. for six independent experiments, expressed as the LC3-II/β-actin ratio normalized to 100 for untreated cells. **P* < 0.05 versus control, *n* = 6, Student's *t*-test. (b) Time course of the effect of 50 mM ethanol on LC3-II protein levels. The values obtained for the quantification of western blots are expressed as means ± S.E.M. for the LC3-II/β-actin ratio normalized to 100 for untreated cells. **P* < 0.05 versus control at the indicated time, *n* = 4, Student's *t*-test. (c) Cells were incubated for 2 h in the presence or the absence of 50 mM ethanol, and RT-PCR analysis were performed to determine *LC3*, *Beclin1*, *ATG5*, *ATG3*, *ATG7* and *p62* mRNA levels. Results are expressed as the mean ± S.E.M. **P* < 0.05 versus the control set to 1, *n* = 5, Student's *t*-test. (d) Western blot of LC3 protein from cells cultured for 1 h with 10 mM 4-MP and then with or without 50 mM ethanol for 2 h. The shown values are means ± S.E.M. for the LC3-II/β-actin ratio normalized to 100 for untreated cells. **P* < 0.05 versus control, **P* < 0.05 versus ethanol, *n* = 7, Student's *t*-test. (e) Western blot of LC3 from cells cultured with or without 100 μM acetaldehyde for 2 h. The shown values are means ± S.E.M. for the LC3-II/β-actin ratio normalized to 100 for untreated cells. **P* < 0.05 versus control, *n* = 6, Student's *t*-test

the addition of ethanol at concentrations from 25 to 200 mM to the cultured cells led to an increase in the amount of LC3-II (the autophagosome-associated form; 16 kDa) consistent with a significant increase of autophagic vacuoles (Figure 3a). The effect of 50 mM ethanol was detected at 30 min and peaked at 2 h of ethanol incubation (Figure 3b).

The conditions used to further study the effects of ethanol on MPMVEC were 50 mM ethanol incubation for 2 h. Importantly, no significant change in *LC3*, *Beclin1*, *ATG5*, *ATG3* and *ATG7* mRNA levels was observed after 2 h of ethanol exposure (Figure 3c), suggesting that ethanol acts on the autophagic process at a post-transcriptional level.

Acetaldehyde, the major ethanol metabolite, promotes autophagy disturbances in brain MPMVEC. We investigated whether ethanol or its metabolite, the acetaldehyde, underlies the biological effect. The addition of 4-methylpyrazole (4-MP at 10 mM), which inhibits ethanol oxidation and blocks acetaldehyde formation, prior to the ethanol incubation (2 h with 50 mM ethanol), prevents the ethanol-induced increase of the LC3-II protein level (Figure 3d). In addition, incubation with 100 μ M acetaldehyde for 2 h induced a twofold significant increase in the LC3-II protein level (Figure 3e). These data indicate that ethanol, through its transformation into acetaldehyde, induces an increase in the LC3-II protein level at a post-transcriptional stage.

Influence of ethanol on the initial stages of the autophagic process in brain MPMVEC. The LC3-II level increases as a result of enhanced formation or decreased autophagosome turnover. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, a central regulator of cell metabolism, growth, proliferation and survival, activates autophagy by increasing autophagosome formation. To determine the effect of ethanol on this pathway, western blot analyses focusing on 70 kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K) and translation repressor protein 4E-BP1, which are phosphorylated by mTOR, were performed. As shown in Figures 4a and b, a significant decrease in phosphorylated p70S6K was observed after 30 min of incubation with both ethanol and Krebs medium, a starvation condition known to activate autophagy by inhibiting the mTOR pathway and decreasing p70S6K phosphorylation. However, after 1 or 2 h of incubation, ethanol had a lower effect than that observed with Krebs medium. Phosphorylation of 4E-BP1 decreased significantly after 1 h. These results indicate that mTOR inhibition could be involved, at least in part, in the ethanol-induced increase in autophagic vacuoles number.

Ethanol effect on autophagic flux in brain MPMVEC. The ethanol effect on autophagy activity was investigated by studying the level of sequestosome 1. Sequestosome 1 (p62) is a scaffolding protein that interacts with LC3 and is degraded following the fusion between autophagosomes and lysosomes.²³ Immunoblot experiments revealed a progressive and significant increase in the level of p62 protein in cells cultured with 50 mM ethanol (Figure 4c), without the p62 mRNA level being affected (Figure 3c). Thus, ethanol inhibits p62 protein degradation within the autolysosomes, suggesting that ethanol blocks or reduces the autophagic vacuole turnover.

To confirm these results, autophagic flux assays were performed by inhibiting the degradation of autolysosome content. Thus, LC3 turnover was assessed in the presence of lysosomal protease inhibitors, E64d and pepstatin A. Cells were treated with these inhibitors for 1 h, and then with 50 mM ethanol or Krebs medium for 2 h. As expected, a higher level of LC3-II protein was observed in cells cultured with protease inhibitors or with Krebs medium compared to cells cultured with the control medium. Basal autophagy is significantly higher in ethanol-treated cells compared to control cells (Figure 4d). There is a significant difference of LC3-II level between ethanol condition and ethanol plus protease

inhibitors. However, no further significant increase in the protein level was observed in cells cultured with ethanol and protease inhibitors compared to control cells treated with inhibitors alone. Besides, the induction of autophagic vacuole formation upon starvation conditions was confirmed by a significant increase in the LC3-II protein level in cells cultured with Krebs medium along with protease inhibitors compared to cells treated with inhibitors alone (Figure 4d). Treatment with Bafilomycin A1, a strong inhibitor of the vacuolar type H⁺-ATPase that blocks the fusion step of the autophagic process allows to yield similar results with no difference between cells treated with Bafilomycin and cells treated with ethanol and Bafilomycin (Figure 4e).

LC3 immunofluorescence assay revealed that the LC3-positive puncta density was two fold higher in cells incubated with 50 mM ethanol for 2 h compared to control cells (Figure 5a). In these experiments, a significant increase was also observed in cells cultured with ethanol and protease inhibitor or Bafilomycin A1 compared to cells treated with ethanol alone. However, the number of LC3-positive dots was not significantly higher in cells cultured with ethanol and protease inhibitors or Bafilomycin A1 compared to cells cultured with protease inhibitors alone or Bafilomycin A1. These data suggest that ethanol induces a partial block in autophagic flux.

Ethanol impairs autophagosome-lysosome fusion in brain MPMVEC. Tandem fluorescence-tagged LC3 reporters (TagRFP-EmGFP-LC3) is used for monitoring autophagic flux in living cells to enable differentiating autophagosomes from autolysosomes.²⁴ The acidic environment within the lysosome quenches EmGFP green fluorescent signal, but has no effect on that of TagRFP. On merged images, yellow dots (i.e., RFP⁺GFP⁺) correspond to autophagosomes, whereas red dots (i.e., RFP⁺GFP⁻) indicate autolysosomes. In these experiments, MPMVEC were incubated for 2 h with or without 50 mM ethanol, then overnight with protease inhibitors to prevent the degradation of autophagic vacuoles allowing, thus, their visualization. The number of red dots was significantly lower in the presence of ethanol (Figure 5a), with a significant decrease of the red/green dot ratio compared to control cells (Figure 5b). The smaller number of autolysosomes (red dots) in ethanol-treated cells compared to control cells suggests that ethanol exposure impairs autophagic flux by decreasing the rate of fusion between autophagosomes and lysosomes. Interestingly, when rapamycin, an mTOR inhibitor that activates the autophagic process, was added to endothelial cell cultures after 2 h of ethanol incubation, some red dots were observed anew indicating that rapamycin can restore autophagic flux and promote the formation of autolysosomes that was impaired by ethanol. Of note, the number of red dots in the presence of rapamycin alone was similar to that of control cells (Figure 5b).

We then studied the expression of the lysosomal proteins Rab7 and LAMP2 involved in the autolysosome formation. Western blotting showed that in cells exposed to ethanol, the level of Rab7 was mildly but significantly reduced compared to that of cells cultured in control conditions. No differences in the LAMP2 protein level

(Figure 5c) or the *Rab7* or *LAMP2* mRNA levels (Figure 5d) were observed. Thus, in endothelial cells, Rab7 could be specifically targeted upon ethanol-induced inhibition.

Modulation of autophagy prevents cortical microvessel damages and MPMVEC death induced by ethanol exposure. Since ethanol has previously been shown to affect vascular plasticity and to promote microvessel cell death,¹⁷ we

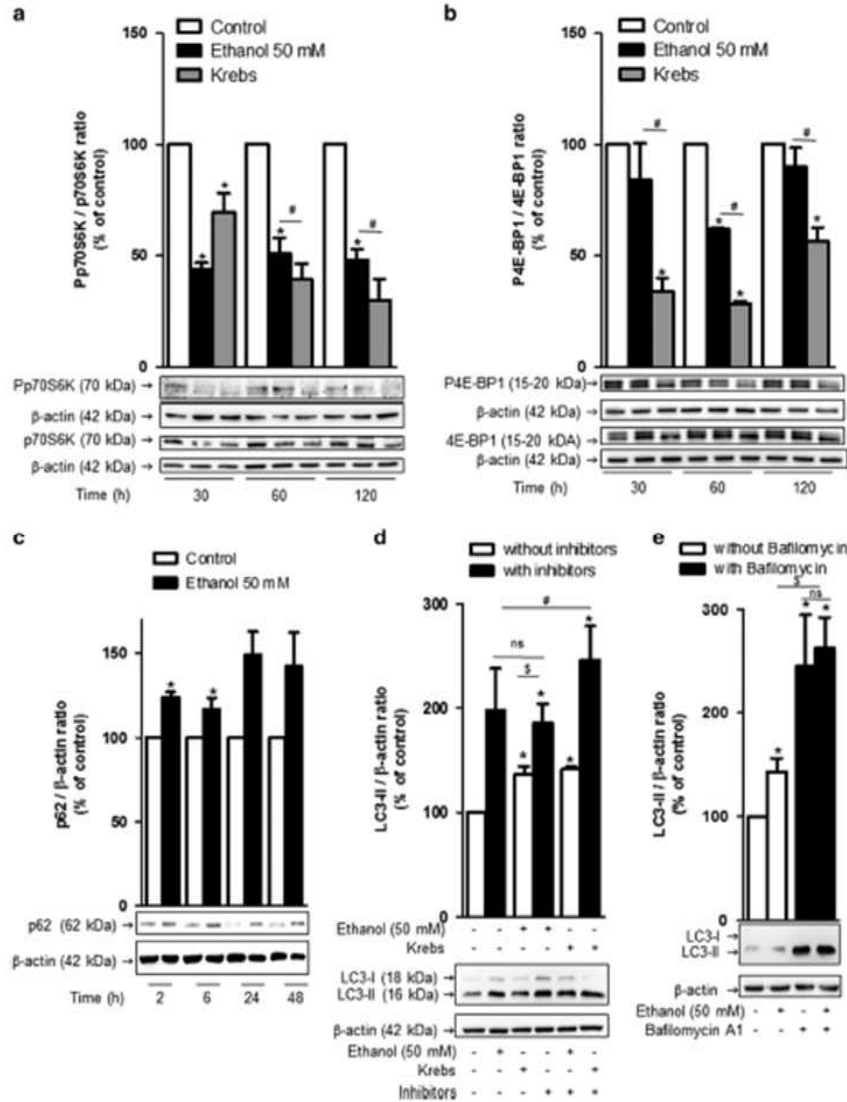


Figure 4 Ethanol impact on autophagic flux in brain microvascular endothelial cells. (a and b) Western blot analysis of p70S6K and phosphorylated p70S6K (Pp70S6K) or 4E-BP1 and phosphorylated 4E-BP1 (P4E-BP1) protein expression. Cells were incubated upon 0.5, 1 or 2 h with ethanol or Krebs medium, and western blot analyses were performed. Values are means \pm S.E.M. for three independent experiments and expressed as Pp70S6K/p70S6K or P4E-BP1/4E-BP1 ratio normalized to 100 for untreated cells. * $P < 0.05$ compared with control, Student's *t*-test. # $P < 0.05$ compared with Krebs medium at the same time analyzed, Student's *t*-test. (c) Western blot analysis was performed to determine p62 protein levels after 2, 6, 24 or 48 h of ethanol exposure; the values shown are means \pm S.E.M. for four independent experiments and are expressed as the p62/ β -actin ratio normalized to 100 for untreated cells, for the indicated times. * $P < 0.05$ versus control, $n = 4$, Student's *t*-test. (d and e) Analysis of the autophagic flux. Cells were incubated for 1 h with protease inhibitors (d) or Bafilomycin A1 (e) and then with or without 50 mM ethanol or Krebs medium for 2 h. Western blot analysis were performed to determine LC3-II protein level. The values shown are means \pm S.E.M. for four independent experiments and are expressed as the LC3-II/ β -actin ratio normalized to 100 for untreated cells. * $P < 0.05$ versus control; # $P < 0.05$ versus ethanol alone; * $P < 0.05$ versus the control with protease inhibitors; NS, nonsignificant; $n = 4$ or $n = 5$ with ethanol, Student's *t*-test

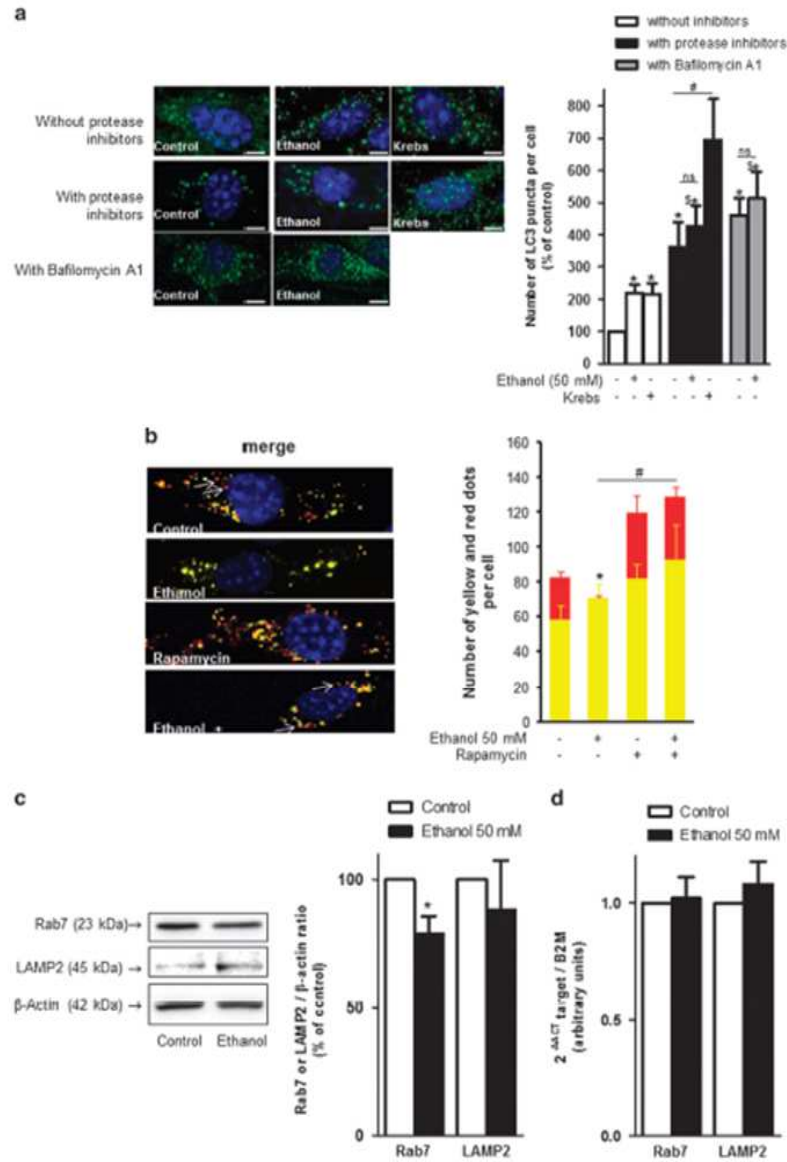


Figure 5 (a) Confocal microscopy of mouse primary brain microvascular endothelial cells cultured with or without protease inhibitors or Bafilomycin A1, and then with or without ethanol (50 mM) or Krebs medium for 2 h. Immunolabeling was then performed with the LC3 antibody (green) and nuclei were stained with Hoechst (blue). The scale bar represents 5 μ m. The number of green dots (LC3 staining) per cell is normalized to 100 for untreated cells and is presented as the mean \pm S.E.M. * P < 0.05 versus control, # P < 0.05 versus control with protease inhibitors, * P < 0.05 versus ethanol alone, NS, nonsignificant, n = 4, Student's *t*-test. (b) Confocal microscopy of mouse primary brain microvascular endothelial cells transfected with the TagRFP-EmGFP-LC3 vector; 48 h after transfection, cells were cultured with or without ethanol (50 mM) for 2 h, and then overnight with protease inhibitors with or without rapamycin 200 nM. Red dots indicate autolysosomes, whereas yellow dots indicate autophagosomes. The scale bar represents 10 μ m. The number of green dots (LC3 staining) per cell is presented as the means \pm S.E.M. for three independent experiments and are expressed as the number of red and yellow dots per cell. * P < 0.05 versus control, n = 3, Student's *t*-test. (c) Mouse primary brain microvascular endothelial cells were incubated for 2 h with or without ethanol (50 mM), and western blot analysis was performed to determine the Rab7 and LAMP2 protein levels. Representative autoradiograms are presented and the values are the means \pm S.E.M. for five independent experiments, and are expressed as the Rab7 or LAMP2/ β -actin ratio normalized to 100 for untreated cells. * P < 0.05 versus control, n = 5, Student's *t*-test. (d) RT-PCR analyses were performed to determine Rab7 and LAMP2 mRNA levels after 2 h of ethanol incubation. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. * P < 0.05 versus the control, set to 1, n = 4, Student's *t*-test

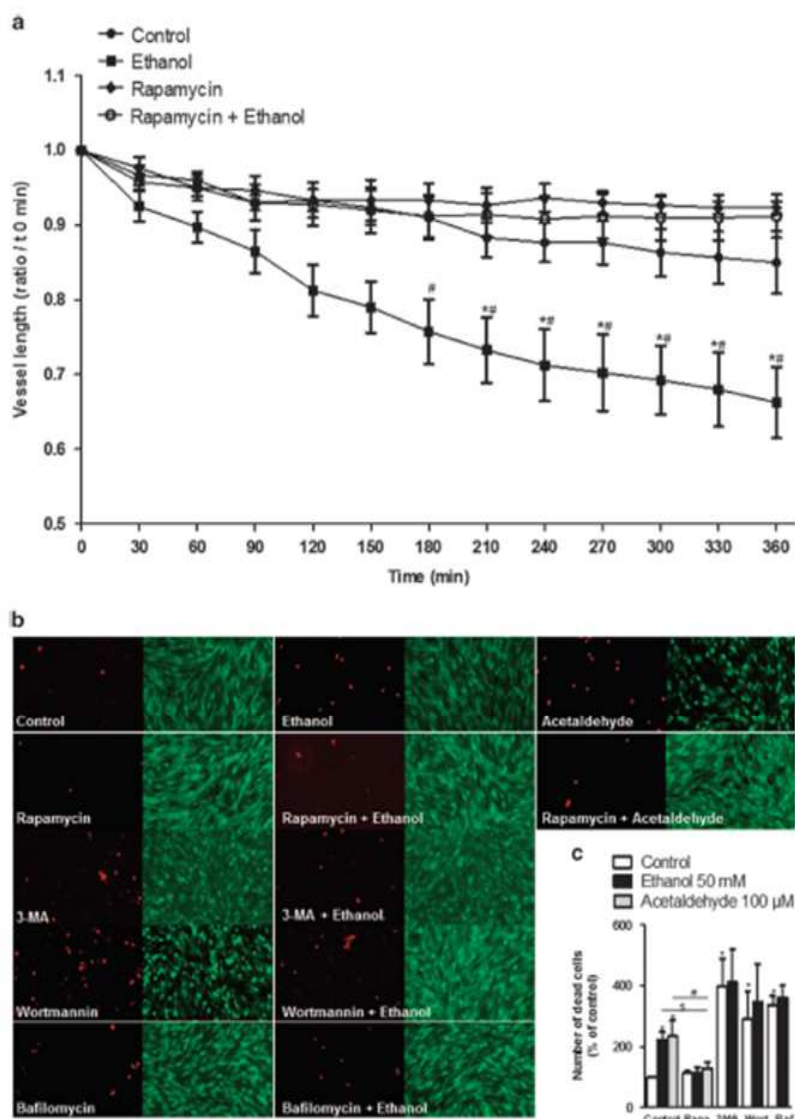


Figure 6 Effect of ethanol on endothelial cell death and brain cortical microvessel plasticity. (a) Effect of ethanol on microvessel plasticity in cultured brain slices from P2 animals. Time course of the effect of 50 mM ethanol on brain microvessel length in the presence or absence of 200 nM rapamycin. * $P < 0.05$ versus control at the indicated time; [#] $P < 0.05$ versus rapamycin+ethanol at the indicated time; two-way ANOVA; $n = 4$. (b) The endothelial cells were labeled with calcein AM (green) and ethidium D1 (red) after 6 h of exposure to 50 mM ethanol or acetaldehyde 100 μ M, in the presence or absence of 200 nM rapamycin, 30 mM 3-methyladenine (3-MA), 75 nM wortmannin (Wort) or 100 nM Bafilomycin A1 (Baf). Scale bar: 40 μ m. (c) Quantification of ethidium labeling cells with ImageJ software. * $P < 0.05$ versus control; [#] $P < 0.05$ versus ethanol 50 mM; [§] $P < 0.05$ versus acetaldehyde 100 μ M, Student's *t* test, $n = 4$

investigated the effect of different modulators of autophagy on ethanol-related damages. As expected, time-lapse acquisition showed that ethanol exposure reduces the vascular plasticity and thus vessel length, while the treatment with rapamycin prevented this effect (Figure 6a). Of note, no effect was observed with rapamycin alone. In addition, rapamycin

decreased the rate of cell death induced by either ethanol or acetaldehyde (Figures 6b and c). Bafilomycin A1 and two inhibitors of autophagy initiation steps (3-methyladenine and wortmannin) induced a very significant increase in the number of dead cells. No further increase upon ethanol exposure was observed in the presence of these inhibitors (Figures 6b and c).

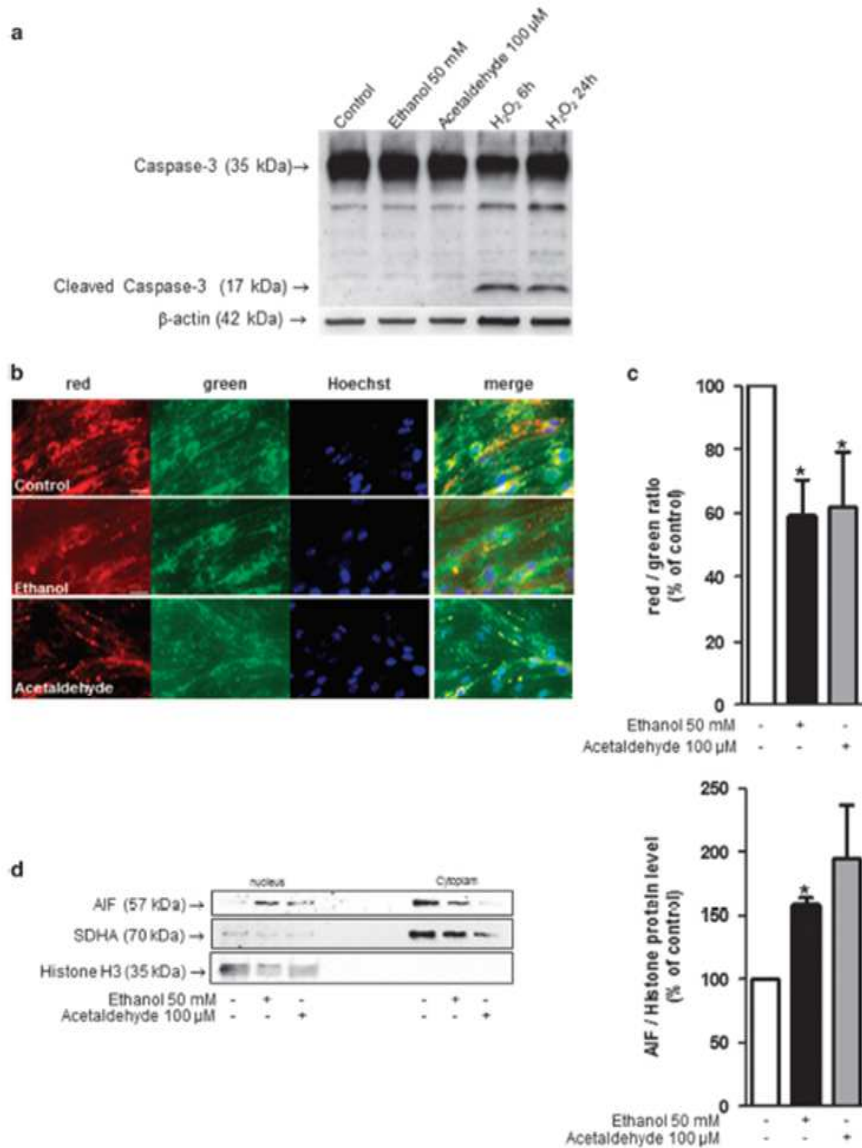


Figure 7 Effect of ethanol on caspase-independent apoptosis in endothelial cells. (a) Western blot analysis of cleaved caspase-3 after 6 h of exposure to 50 mM ethanol, $n=3$. H_2O_2 (1 mM) was used as a positive control after 6 and 24 h of exposure. (b) Integrity of mitochondrial membrane potential was investigated by a mitochondrial potential-sensitive dye, JC-1. When this dye enters mitochondria, the color changes from red to green. Hoechst was used to label nuclei (blue). Scale bar: 20 μ m. (c) The values are the means \pm S.E.M. for three independent experiments and are expressed as red/green ratio. * $P < 0.05$ versus control, Student's *t*-test. (d) Western blot analysis of AIF protein expression in the nucleus and cytoplasm. Cells were incubated 2 h with or without 50 mM ethanol or 100 μ M acetaldehyde, nuclear and cytoplasm protein were extracted, and western blot performed. Mitochondrial contamination of nuclear extract is checked by western blot analysis using anti-succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) antibody. Values are means \pm S.E.M. for three independent experiments and expressed as AIF/histone ratio normalized to 100 for untreated cells. * $P < 0.05$ compared with control, Student's *t*-test

Taken together, these results showed that endothelial cells are very sensitive to autophagosome accumulation and that the ethanol toxicity may be prevented by rapamycin.

Ethanol enhances the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor. To clarify the mechanisms of ethanol toxicity, we investigated apoptosis pathways. Ethanol-induced cell death is likely to be caspase-3

independent since the level of cleaved caspase-3 protein was not higher in ethanol-treated cells for 6 h compared to control cells (Figure 7a). JC-1, a cationic dye, selectively enters mitochondria upon a decrease of membrane potential, causing a reversible change of their color from red to green.²⁵ A decrease of red puncta dots was observed in cells incubated with either ethanol or acetaldehyde (Figures 7b and c). Apoptosis-inducing factor (AIF) is a caspase-independent death effector that induces chromatin condensation and DNA fragmentation when translocated into the nuclei.²⁶ A significant increase in AIF nuclear translocation was observed in cells that were incubated with either ethanol or acetaldehyde (Figure 7d). Ethanol or acetaldehyde conceivably induces endothelial cell death through a caspase-independent pathway mediated by mitochondrial release of AIF and its nuclear translocation.

Discussion

In this study, we investigated whether the observed ethanol-related damages of microvessel endothelial cells in the developing brain was associated with impaired autophagy.

A significant autophagic vacuole accumulation was observed in pFAS/FAS human and mouse brain cortical microvessels following PAE. This accumulation may favor the formation of intracellular aggregates and likely hastens cell injury and death. The accumulation of autophagic vacuoles may contribute to the vascular network disturbances observed in both humans and mice upon PAE. However, little is currently known about the role of autophagy in vascular biology, particularly in the brain.²⁷ In the human brain, arterial and venous development starts at 6 WG, at the same time as neurogenesis and both processes require tight regulation.²⁸ From the initial meningeal vascular plexus, which covers the entire surface of the embryonic brain, six groups of vessels perforate the glia limitans and develop radially and perpendicularly to the surface. The length of these vessels increases as the cortex increases in thickness. Blood supply to the white matter is provided by group 6 from 15 WG, whereas group 1 vascularizes the superficial 27 WG onward. The other groups form an intracortical microvascular network between 20 and 27 WG, by means of divisions, branching or coiling. We have previously shown that this network was disrupted in pFAS/FAS fetuses during the third trimester.¹⁷

Several lines of evidence link autophagy and angiogenesis. Autophagy has been identified as a novel target for enhancing the therapeutic efficacy of angiogenesis inhibitors.^{29–31} Angiogenesis plays a critical role in the pathology of various diseases including cancer, and a number of strategies are being developed to inhibit tumoral angiogenesis. However, a complex relationship exists between autophagy and angiogenesis. Some studies have suggested that autophagy inhibits angiogenesis,^{29,32} whereas others have suggested that autophagy promotes it.^{30,33} Currently, the involvement of disrupted autophagy in the effect of ethanol on angiogenesis remains unknown. In pFAS/FAS children, it could be hypothesized that PAE impairs the autophagic process in endothelial cells and modifies the vascular network, which could in turn contribute to the neurodevelopmental abnormalities by interfering with neuronal migration.

The molecular mechanisms involved in ethanol-induced autophagy vacuole accumulation in brain cortical microvessels were characterized. Ethanol effects are mediated by its metabolite, acetaldehyde. Thus, the inhibition of ethanol oxidation by 4-MP completely prevents the LC3-II increase. Moreover, acetaldehyde addition mimics LC3-II protein accumulation induced by ethanol. Ethanol is predominantly metabolized in the liver, and previous studies demonstrated that acetaldehyde is involved in hepatic injury and impaired autophagy.³⁴ Several steps of the autophagic process are targeted in endothelial cells following ethanol exposure. The initial step is altered through a partial inhibition of the mTOR pathway. This protein is a 289 kDa serine–threonine kinase, which forms at least two distinct multi-protein complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2).³⁵ mTORC1 is known to regulate autophagy by modulating specific proteins that control the autophagy machinery. The phosphorylations of P70S6K and 4E-BP1 have been used as a hallmark of mTORC1 activation and are correlated with autophagy inhibition in various situations. The ethanol-related inhibition of P70S6K and 4E-BP1 phosphorylation in endothelial cells indicates that ethanol suppresses mTORC1 activity. The ethanol effect on mTOR pathway had previously been demonstrated in neuronal cells and in other cell types such as hepatocytes and cardiomyocytes.^{36–38} It has been demonstrated in neurons that ethanol toxicity is mediated by reactive oxygen species (ROS) production and that autophagy is activated to reduce the subsequent oxidative stress.⁹ We demonstrated, in this study, that in MPMVEC, ethanol impairs mitochondrial integrity and induces AIF protein release as well as its nuclear translocation, which may induce programmed cell death.

The final autophagy steps allowing for autolysosome formation are also impaired, with a decrease in Rab7 level, a protein that is required for the autophagosome–lysosome fusion. The late endosomal compartment proteins Rab7 and LAMP2 have been shown to be involved in the late stages of autophagosome maturation, presumably facilitating the fusion of autophagosomes with late endosomes.³⁹ Previous studies have shown that impaired autolysosome formation was correlated with LAMP2 depletion and a relative paucity in autolysosomes.^{40,41} In hepatocytes, it has recently been shown that ethanol increases the LC3-II level and decreases LAMP2 and Rab7 levels, potentially contributing to ethanol-induced liver injury.⁴² However, in neonatal cortical endothelial cells, we observed no effect of ethanol exposure on LAMP2 level. Thus, in this cell type, the specific decrease in the Rab7 protein level may contribute to the accumulation of autophagic vacuoles, but the mechanism underlying the decrease of this protein, which occurs at a post-transcriptional level, remains to be elucidated. Altogether, the mechanisms involved at different steps of autophagy very likely contribute to the accumulation of autophagic vacuoles in endothelial cells.

We have shown that autophagy activation using rapamycin, an mTOR inhibitor, decreases ethanol-induced endothelial cell death and restores the vascular plasticity. This finding appears to be contradictory to the mTOR partial inhibition observed upon ethanol exposure. However, the effect of ethanol on p70S6K and 4E-BP1 phosphorylation does not last as long as the inhibition observed in the starvation condition. The mTOR

subcellular localization has been reported to enable its effects on the spatial and temporal control of cell homeostasis.⁴³ Thus, mTOR modulation of autophagy is not fully understood, and its kinetics and the subcellular localization of its targets can have a great impact. One may hypothesize that this partial activation of the initial steps of autophagy upon ethanol treatment may be related to a protective cellular response to ethanol injury. The protective effect of autophagy observed in endothelial cells was previously reported in neurons in which autophagy acted as a protective response against ethanol neurotoxicity.¹⁰ In SH-SY5Y cells, the autophagy inhibition promotes ROS generation and leads to higher levels of ethanol-induced cell death. In addition, ethanol exposure activates mitophagy, suggesting that the neuroprotection provided by autophagy may result from the removal of damaged mitochondria.⁹ Moreover, Pla *et al.*⁴⁴ showed that autophagy protects against ethanol toxicity in mouse astrocytes and neurons. Thus, autophagic flux activation by rapamycin may be hypothesized to protect both neurons and endothelial cells against ethanol-induced death. More recently, peritoneal injection of rapamycin was proposed to prevent neuroinflammation and neuronal death in a mouse model of cerebral palsy.⁴⁵ Further experiments are needed to characterize the involvement of autophagy in brain angiogenesis and the *in vivo* protective effect of rapamycin after PAE.

To summarize, we have shown for the first time that PAE impairs autophagy in brain endothelial cells, thereby contributing to alterations in angiogenesis and to the subsequent brain abnormalities observed in pFAS/FAS patients. Our results strongly suggest that rapamycin represents a potential therapeutic strategy to reduce brain developmental disorders related to PAE.

Materials and Methods

LC3/Glut1 confocal microscopy in human cerebral cortices. Eight fetal brains ranging from 29 to 34 WG were subdivided in two groups. Four brains belonging to the control group were obtained from fetuses whose brain was macroscopically and microscopically free of detectable abnormalities. Four brains from pFAS/FAS fetuses were obtained after spontaneous *in utero* death (Supplementary Tables 1 and 2).

Seven micrometer tissue sections from the frontal cortex were deparaffinized in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Antigen retrieval was performed by heating the sections in 10 mM boiling sodium citrate buffer (pH 6.0) for 15 min. Then, sections were incubated overnight at 4 °C with anti-GLUT1; 1/200 (sc-1605, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and anti-LC3; 1/200 (PM036, MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) as previously described.¹⁷ Afterwards, sections were incubated with fluorescent-conjugated antibodies (Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-goat; 1/400 [A11058, Life Technologies, Waltham, MA, USA], Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit; 1/400 [A21206, Life Technologies]). Confocal images were acquired with the Leica laser scanning confocal microscope TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Animals. NMRI (Navel Medical Research Institute) mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), and GFP-LC3 transgenic mice, reporter mice systemically expressing GFP fused to LC3, were obtained from the RIKEN BioResource Center (Ibaraki, Japan).⁴⁶ The mice were reared in controlled temperature rooms (21 ± 1 °C) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. Pups were killed at 2 days of age (P2) and their brain cortical microvessels were extracted. Animal manipulations were performed according to the recommendations of the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National legislation (ethical approval no. 01680.02), and were supervised by authorized investigators (BJG, authorization no. 7687 from the French Ministry of Agriculture and Fisheries).

***In vivo* treatment of pregnant mice and newborns.** Pregnant NMRI mice received a daily s.c. injection of sodium chloride (0.9% NaCl) or ethanol

(3 g/kg, VWR, 83813.360) diluted (50% v/v) in 0.9% NaCl, as previously described.¹⁷ Injections were performed from gestational day 13 (GD13) to GD19. Mothers received a single injection of the same treatment at parturition (P0) and 1 day after parturition (P1). The pups were killed on P2.¹⁷

Isolation of brain cortical microvessels in mice. The heads of P2 NMRI mice prenatally exposed to ethanol or those of P2 transgenic GFP-LC3 transgenic mice were washed in 70% ethanol, and the cortices were extracted in culture medium (endothelial basal medium supplemented with 2% FBS [CVSVF00-01, Eurobio, Courtabouf, France] and 1% antibiotics and antifungals [P11-002, PAA, Vélizy-Villacoublay, France]). The meninges were removed, and the cortices were lysed in 7 ml of culture medium, in a Dounce tissue homogenizer. The lysate was centrifuged (420 × g, 15 min, 4 °C), and the pellet was suspended in 18% (w/v) dextran solution. This suspension was centrifuged (30 min, 2000 × g, 4 °C), and the pellet was suspended in the culture medium and then filtered through a 70 μm cell strainer (352350, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The resulting suspension of microvessels was centrifuged (7 min, 550 × g, 4 °C), the pellet was washed in PBS (BP3994, Fisher Bioagents, Illkirch, France) and the resulting suspension was centrifuged again (7 min, 550 × g, 4 °C). The cortical microvessels extracted from P2 NMRI mice were cytopsin on a glass slide and fixed by overnight incubation in 4% PFA (so-281692, Santa Cruz Biotechnology) for immunohistochemistry. Before the cytopsin, the cortical microvessels extracted from P2 transgenic mice were tested for 6 h at 37 °C with artificial cerebrospinal fluid medium (aCSF) containing 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 26.2 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose, pH 7.4. The aCSF was used alone or together with 50 mM ethanol.

Endothelial cell culture. C57BL/6 mouse primary brain microvascular endothelial cells isolated from brain tissue of P2 pups were purchased from Cell Biologics (Chicago, IL, USA). Cells were cultured at 37 °C, in a humidified environment, in the presence of 5% CO₂. They were fed every 2 days with a complete mouse endothelial cell culture medium, on 60 mm diameter dishes or 12-well slides. Two days after confluence was reached, the cells were incubated for 24 h with serum-free medium. The cells were then treated with various pharmacological agents, including 50 mM ethanol, 100 μM acetaldehyde, lysosomal protease inhibitors 10 μg/ml pepstatin A (P-5318, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 10 μg/ml E64D (sc-201280 A, Santa Cruz Biotechnology), 200 nM rapamycin (R0305, Sigma-Aldrich), 100 nM Bafilomycin A1 (B-1793, Sigma-Aldrich), 10 mM 4-methylpyrazole (4-MP, M-1387, Sigma-Aldrich), 30 mM 3-methyladenine (M9281, Sigma-Aldrich), 75 nM wortmannin (W3144, Sigma-Aldrich), Krebs medium [145 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄ hydrate, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4] – this medium is commonly used for starvation condition, and ethanol (25 to 200 mM).

Transfection with the tandem sensor mRFP-EGFP-LC3 probe. We used the autophagy tandem sensor mRFP-EGFP-LC3 probe (P36269, Life Technologies) to determine the localization of the LC3 protein and thus the autophagic flux in cultured endothelial cells. This probe contains an acid-sensitive GFP and an acid-insensitive RFP. Since the autophagosome has a neutral pH and the autolysosome is acidic, the maturation of autophagosomes into autolysosomes is accompanied by a loss of GFP fluorescence. The endothelial cells were cultured to 80–90% confluence for transfection. Single-cell suspensions were prepared at a density of 1.0 × 10⁵/ml and used to seed 12-well slides containing 1 ml of medium per well. Transfection was performed in accordance with the kit manufacturer's instructions. In brief, 6 μl of lipofectamine LTX (15338-100, Life Technologies) was added together with 2 μl of Plus Reagent and 14 μl of the tandem sensor mRFP-EGFP-LC3 probe, to 200 μl of opti-MEM reduced-serum medium (31985-062, Life Technologies). The resulting transfection mixture was mixed gently and incubated for 5 min at room temperature. The mRFP-EGFP-LC3 probe-Lipofectamine LTX mix was added to the wells containing the cells and opti-MEM. The cells were incubated for 4 h at 37 °C. Subsequently, complete endothelial cell medium was added for a further 48 h incubation. The cells were incubated with serum-free medium for a final 24 h. Cells were then treated for 2 h with 50 mM ethanol and overnight with lysosomal protease inhibitors (10 μg/ml E64D+10 μg/ml pepstatin A).

Endothelial cell immunolabelings. Endothelial cells or brain cortical microvessels were washed three times with PBS and fixed by incubation in 4% PFA in PBS for 1 h at room temperature. After incubation with 1% BSA/0.3% Triton X-100 in PBS to block nonspecific sites, primary antibodies (anti-LC3; 1/200 [PM036, MBL International Corporation], anti-GLUT1; 1/200 [sc-1605, Santa Cruz

Biotechnology)) were added, and the preparations were incubated overnight at 4 °C. Secondary antibodies in blocking solution were then incubated with the preparations for 1 h at room temperature (Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-goat; 1/400 (A11058, Life Technologies), Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit; 1/400 (A21206 Life Technologies)).

Laser scanning confocal microscopy and reconstitution 3D images. The confocal images were collected with a TCS SP2 AOBS laser scanning confocal imaging system (Leica Microsystems) equipped with x40 and x63 high numerical-aperture oil immersion objective lenses. Image size was set to 1024 x 1024 pixels. Multitrack sequential acquisition settings were used to prevent interference between channels. A 561 nm diode solid-state laser and the 488 nm line of an argon ion laser were used for excitation. Emission detection bandwidths were optimized with Leica software. The confocal pinhole was set to 1 Airy unit. Z-stack acquisition intervals were selected so as to satisfy Nyquist sampling criteria. As described in the Imaaris version 7.6 reference manual (Biplane, South Windsor, CT, USA), Imaaris software provides eight different viewing functions for the generation and visualization of high-quality confocal images. In this project, confocal Z-stacks comprising up to 40 images were reconstituted into 3D animations with the aid of Imaaris software in the Slice and Easy 3D modes. The Spot function of Imaaris automatically locates autophagosomes on the basis of size and intensity thresholds. Each autophagosome is represented by a sphere of arbitrary size determined by the user. The sphere is displayed at the center of mass of the identified autophagosome.

Subfractionation of cellular proteins. Total protein content was extracted using the endothelial cells. After treatment, the cells were washed three times on ice with PBS and their protein content was extracted in lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM glycerophosphate, 100 mM NaF, 0.25% NP40, 1/100 PMSF, 1/100 phosphatase and protease inhibitors). Nuclear and cytosolic extracts were obtained as previously described.⁴⁷ In brief, cells were lysed in buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KOAc, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25% Igepal CA-630, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), and phosphatase inhibitor cocktail 2 and 3 (P5726 and P0044, Sigma-Aldrich). After centrifugation (10 min at 600 x g), the supernatant was saved as the cytoplasm extract, and the nuclear pellet was then suspended on ice in nuclear extract buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glycerol, 1 mM PMSF, P8340, and P2850. Samples were then incubated for 15 min at 4 °C and centrifuged at 10 000 x g for 10 min and the supernatant was saved as the nuclear extract.

Western blot analysis. Proteins were loaded onto SDS-PAGE gels containing 15% (LC3, caspase-3) or 10% (p62, Pp70S6K or AIF) acrylamide. After migration, the proteins were blotted onto Protran nitrocellulose membranes (1060003, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The membranes were blocked by incubation for 1 h with 5% non-fat dried milk or BSA/TBS Tween-20 (0.1%), and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: LC3 (1/1000, NB100-2220, MBL International Corporation), p62 (1/1000, sc-28359, Santa Cruz Biotechnology), caspase-3 (1/1000, 9662, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Pp70S6K (1/1000, 9205 S, Cell Signaling), p70S6K (1/1000, 9202 S, Cell Signaling), 4E-BP1 (1/1000, 9452, Cell Signaling), P4E-BP1 (1/1000, 2855, Cell Signaling), succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) (1/1000, 5838, Cell Signaling), AIF (1/1000, sc-55519, Santa Cruz Biotechnology), and Histone H3 (1/1000, (1/1000, sc 56616, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then incubated with the corresponding secondary antibody, either goat anti-rabbit IgG-HRP (1/5000, sc-2030, Santa Cruz Biotechnology) or goat anti-mouse IgG-HRP (1/5000, sc-2031, Santa Cruz Biotechnology), for 1 h at room temperature. Secondary antibody binding was then detected by electrochemiluminescence. We checked for equal protein loading, by stripping the membranes and reprobing them with β -actin antibody (1/5000, A-5441, Sigma-Aldrich). The intensity of the immunoreactive bands was quantified by densitometry with Quantity one software from Bio-Rad (Hercules, CA, USA), and the results were expressed as a ratio with respect to β -actin immunoreactivity intensity.

RNA extraction and reverse transcription-quantitative PCR. Total RNA was extracted from endothelial cells with the Nucleospin RNA/protein kit (740933, Macherey-Nagel, Hoerd, France), according to the manufacturer's recommendations. We generated cDNA by the reverse transcription of 0.5 μ g of total RNA in a final volume of 20 μ l with the A3500 reverse transcription system

(Promega, Charbonnières Les Bains, France). Quantitative PCR was then performed in duplicate with the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) and the IQ SYBR Green supermix (170-8882, Bio-Rad), according to the manufacturer's protocol. The amplification of specific transcripts was confirmed by melting curve profiles generated at the end of the PCR program. The primers were designed with Primer Express software from Life Technologies (Supplementary Table 3). The values for each target gene were normalized with respect to the Ct value for rRNA β 2M (Δ Ct = Ct target gene - Ct β 2M). The relative amount of target mRNA is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ of target}) - (\Delta Ct \text{ of control})$. Relative gene expression was normalized with respect to control levels, arbitrarily set to 1.0.

Viability assay. Cell viability was assessed by calcein/ethidium labeling (L-3224, Life Technologies). Calcein is retained in living cells, which display esterase activity converting the almost nonfluorescent cell-permanent calcein AM into the highly fluorescent calcein. Ethidium homodimer-1 can enter cells and bind nucleic acids when the membranes are damaged. After treatment, the cells were washed three times with PBS and incubated for 45 min with calcein AM (1 μ M) and ethidium D1 (2 μ M) in PBS at room temperature. They were then observed under a Leica DMI-6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems), excitation/emission: 530/580 nm. In each experiment, we obtained six images for each set of conditions, from similar locations, and the results for these images were averaged for statistical analysis. Living cells were identified as displaying green fluorescence due to calcein AM only. Any cell displaying red fluorescence due to EthD-1 staining was considered to be dead or dying. The number of ethidium-labeled cells was determined from photomicrographs by image segmentation with ImageJ analysis software (Bethesda, MD, USA).

Real-time videomicroscopy. Pups were killed by decapitation, and their brains were rapidly dissected for isolation of the cerebral hemispheres. The meninges covering the brains were carefully removed and the brains were immediately placed in aCSF. Transverse slices (250 μ m) were cut at 4 °C with a VT1000S vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). They were transferred to 24-well Costar plates containing aCSF and incubated for 30 min at 37 °C, in a humidified incubator, under an atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. The slices were washed with fresh aCSF and incubated for 6 h at a constant temperature (37 °C), under a controlled atmosphere containing 5% CO₂, on an inverted microscope (Leica Microsystems) equipped with an incubation chamber (PeCon GmbH, Erbach, Germany), computer-controlled illumination shutters and filter wheels (Roper Scientific, Lisses, France). Slices were continuously perfused with aCSF with or without 50 mM ethanol and 200 nM rapamycin. Images were acquired with a x10 objective at 30 min intervals over a 6 h period. Microvessel length was then determined from the acquired images with MetaMorph software (Sunnyvale, CA, USA).

Mitochondrial membrane potential analysis. JC-1 stain from (Life Technologies) was used for labeling brain MPMVEC at 2 μ M concentration followed by incubation for 20 min at 37 °C. Labeled cells were imaged using a Leica DMI-6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems). Each group of cells (cells incubated with control, ethanol or acetaldehyde medium) were imaged using 488 nm excitation wavelength, and the emission signals were obtained through 525 and 590 emission channels at the same parameters of pinhole aperture and detector voltage.

Statistical analyses. Data obtained from human brains were expressed as median interquartile range, and range of values and Mann-Whitney test was used to compare the number of immune-positive dots per cell and between pFAS/FAS and control groups. Data obtained *in vitro* and *ex vivo* were expressed as mean \pm S.E.M. The overall significance of the results obtained was examined using Student's paired *t*-test. Statistically significant differences between multiple comparisons were determined by a two-way analysis of variance with the appropriate Bonferroni correction for multiple comparisons test. Significance was defined by *P*-values <0.05. The statistical analyses were carried out with the biostatistical Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by the University of Rouen, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Conseil Régional de Haute-Normandie, the Fonds Européen de Développement Régional


(FEDER), the LARC-Neuroscience Network, the Fondation pour la Recherche en Alcoologie (FRA) and the Regional Platform for Cell Imaging. VG held a fellowship from the FEDER.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: CB-L, SB and BJG. Performed the experiments: VG, VG, FM, CL, MH, SJ and YR. Analyzed the data: CB-L, SB, VG, VG, FM, CL, YR, SM, SJ, AL and BJG. Contributed reagents/materials/analysis tools: SB and BJG. Wrote the manuscript: CB-L and SB. Critical and helpful comments and review of the manuscript: AL and SM.

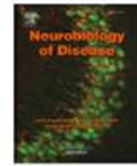
1. Archibald SL, Renna-Ndesine C, Garnet A, Riley EP, Mattson SN, Jernigan TL. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev Med Child Neurol* 2001; **43**: 148-154.
2. Bard L, Martoff JT, Klug MG, Kebedishian J. Diagnosis of FAS: a comparison of the Fetal Alcohol Syndrome Diagnostic Checklist and the Institute of Medicine Criteria for Fetal Alcohol Syndrome. *Neurotoxicol Teratol* 2003; **25**: 719-724.
3. Hamilton GF, Whitner LT, Kintova AY. Postnatal binge-like alcohol exposure decreases dendritic complexity while increasing the density of mature spines in mPFC layer II/III pyramidal neurons. *Synapse* 2010; **64**: 127-135.
4. Ward RJ, Colvetti MA, Allen R, Schol F, Lafermand F, de Witte P et al. Neuro-inflammation induced in the hippocampus of binge drinking rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J Neurochem* 2009; **111**: 1119-1128.
5. Mier SE, Mier JA, West JR. Prenatal binge-like alcohol exposure in the rat results in region-specific deficits in brain growth. *Neurotoxicol Teratol* 1999; **21**: 285-291.
6. Sies-Mansiglo KI, Madorsky L, Pan Q, Palka M, Nedley AW, Shaw G et al. Effects of acute ethanol exposure on regulatory mechanisms of Bcl-2-associated apoptosis promoter, bcl-2, in neonatal rat cerebellum: differential effects during vulnerable and resistant developmental periods. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; **30**: 1031-1038.
7. Young C, Klocke BJ, Terkova T, Choi J, Labuyere J, Qin YQ et al. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ* 2005; **10**: 1149-1155.
8. Almor A, Wang H, Liu M, Frank JA, Xu M, Ou X et al. Expression of autophagy and UPR genes in the developing brain during ethanol-sensitive and resistant periods. *Metab Brain Dis* 2013; **28**: 667-676.
9. Chen G, Ke Z, Xu M, Liao M, Wang X, Qi Y et al. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. *Autophagy* 2012; **8**: 1577-1589.
10. Wang H, Bower KA, Frank JA, Xu M, Luo J. Hypoxic preconditioning alleviates ethanol neurotoxicity: the involvement of autophagy. *Neurotox Res* 2013; **24**: 472-477.
11. Feng Y, He D, Yao Z, Kinsky DJ. The machinery of neuroautophagy. *Cell Res* 2014; **24**: 24-41.
12. Yousef S, Porozzo R, Schmidt L, Ziemiecki A, Schaffner T, Szapocznik L et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1124-1132.
13. Roux C, Aligry C, Lesueur C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y et al. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: an *in vivo* and *in vitro* study in *Gad67-GFP* mice. *Exp Neurol* 2015; **267**: 177-193.
14. Codogno P, Majer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2006; **12**(Suppl 2): 1509-1515.
15. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Kwon JY. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; **451**: 1069-1075.
16. Cecconi F, Rapolanti M, Fimia GM. The involvement of cell death and survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis and autophagy? *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1170-1177.
17. Jegou S, El Ghazi F, de Lencastre PK, Maréchal S, Laudenbach V, Uguen A et al. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol* 2012; **72**: 962-969.
18. Won C, Lin Z, Kumar TP, Li S, Ding L, Bikhal A et al. Autonomous vascular network synchronizes GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun* 2013; **4**: 2149.
19. Williams JK, Baptista PM, Duanis JB, Szaliga KT, Friedman DP, Soler S. The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; **32**: 156-161.
20. Radik KA, Mathies AM, Burns AL, Heinrich SA, Kovacs EJ, Dipietro LA. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H1084-H1090.
21. Radik KA, Kovacs EJ, Gallo RL, DiPietro LA. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **295**: H174-H184.
22. Rubinstein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S et al. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; **5**: 585-589.
23. Zhang Z, Singh R, Ashner M. Methods for the detection of autophagy in mammalian cells. *Curr Protoc Toxicol* 2016; **89**: 20.12.1-20.12.26.

24. Zhou C, Zhong W, Zhou J, Sheng F, Fang Z, Wei Y et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy* 2012; **8**: 1215-1226.
25. Smiley ST, Rees M, Motola-Hartstrom C, Lin M, Chen A, Smith TW et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3671-3675.
26. Dauges E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Linopoulos T, Larochette N et al. Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000; **14**: 729-739.
27. Nussenzweig SC, Verma S, Finkel T. The role of autophagy in vascular biology. *Circ Res* 2015; **116**: 480-488.
28. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005; **436**: 193-200.
29. Ramakrishnan S, Nguyen TM, Subramanian M, Kelekar A. Autophagy and angiogenesis inhibition. *Autophagy* 2007; **3**: 512-515.
30. Du J, Teng RJ, Guan T, Els A, Kaul S, Kondratyev GG et al. Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; **302**: C383-C391.
31. Pathanis AS, Wari ZA, Gatu SK, Kumar S, Bhushan S, Korfays H et al. The anti-angiogenic and cytotoxic effects of the boswellic acid analog BA145 are potentiated by autophagy inhibitors. *Mol Cancer* 2015; **14**: 6.
32. Nguyen TM, Subramanian IV, Kelekar A, Ramakrishnan S. Kringe 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells. *Blood* 2007; **109**: 4793-4802.
33. Shen W, Tian C, Chen H, Yang Y, Zhu D, Gao P et al. Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2013; **55**: 75-82.
34. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 17756-17772.
35. Guerin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007; **12**: 9-22.
36. Guo R, Hu N, Kandath MR, Ren J. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. *Autophagy* 2012; **8**: 580-608.
37. Pis A, Pascual M, Renu-Piqueres J, Guertl C. TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1065.
38. Thomas PG, Ehlers RA, Trambly CS, Clement DL, Fox HS, Turra DJ et al. Multilevel regulation of autophagosome content by ethanol oxidation in HepG2 cells. *Autophagy* 2013; **9**: 63-73.
39. Longilli A, Toozé SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 956-966.
40. Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Melvanen A, Saito P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 2007; **26**: 313-324.
41. Fortunato F, Burgers H, Bergmann F, Plegier P, Budker MW, Koerner G et al. Impaired autophagosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; **137**: 330-340.
42. Cho HI, Choi JW, Lee SM. Impairment of autophagosome-lysosome fusion contributes to chronic ethanol-induced liver injury. *Alcohol* 2014; **48**: 717-725.
43. Betz C, Hall MN. Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol* 2013; **203**: 560-574.
44. Pis A, Pascual M, Guertl C. Autophagy constitutes a protective mechanism against ethanol toxicity in mouse astrocytes and neurons. *PLoS ONE* 2016; **11**: e0153057.
45. Srivastava IN, Shpertheja J, Baylis M, Ferguson T, Cirno PB. mTOR pathway inhibition prevents neuroinflammation and neuronal death in a mouse model of cerebral palsy. *Neurobiol Dis* 2016; **86**: 144-154.
46. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 1101-1111.
47. Brasse-Lagnel C, Lavoigne A, Rainard A, Vasseur K, Huisson A. IL-1beta stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through NF-kappaB in Caco-2 cells. *Biochimie* 2005; **87**: 403-409.

 *Cell Death and Disease* is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning



Cécile Léger^a, Nicolas Dupré^a, Annie Laquerrière^a, Maryline Lecointre^a, Marion Dumanoir^a, François Janin^a, Michelle Hauchecorne^a, Maëlle Fabre^a, Sylvie Jégou^a, Thierry Frébourg^a, Carine Cleren^a, Philippe Leroux^a, Pascale Marcorelles^b, Carole Brasse-Lagnel^a, Stéphane Marret^a, Florent Marguet^a, Bruno J. Gonzalez^{a,*}

^a Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Pediatrics and Intensive Care, F 76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

^b Department of Pathology, Morvan Hospital, Brest, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fetal alcohol spectrum disorder
Neurovascular
Endothelial cells
GABA interneurons
Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)
Tissue plasminogen activator (tPA)

ABSTRACT

In utero alcohol exposure can induce severe neurodevelopmental disabilities leading to long-term behavioral deficits. Because alcohol induces brain defects, many studies have focused on nervous cells. However, recent reports have shown that alcohol markedly affects cortical angiogenesis in both animal models and infants with fetal alcohol spectrum disorder (FASD). In addition, the vascular system is known to contribute to controlling gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic interneuron migration in the developing neocortex. Thus, alcohol-induced vascular dysfunction may contribute to the neurodevelopmental defects in FASD. The present study aimed at investigating the effects of alcohol on endothelial activity of pial microvessels. *Ex vivo* experiments on cortical slices from mouse neonates revealed that in endothelial cells from pial microvessels acute alcohol exposure inhibits both glutamate-induced calcium mobilization and activities of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue plasminogen activator (tPA). The inhibitory effect of alcohol on glutamate-induced MMP-9 activity was abrogated in tPA-knockout and Grin1^{fl/fl}/VesCad^{fl/fl} mice suggesting that alcohol interacts through the endothelial NMDAR/tPA/MMP-9 vascular pathway. Contrasting with the effects from acute alcohol exposure, in mouse neonates exposed to alcohol *in utero* during the last gestational week, glutamate exacerbated both calcium mobilization and endothelial protease activities from pial microvessels. This alcohol-induced vascular dysfunction was associated with strong overexpression of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit GluN1 and mispositioning of the Gad67-GFP interneurons that normally populate the superficial cortical layers. By comparing several human control fetuses with a fetus chronically exposed to alcohol revealed that alcohol exposure led to mispositioning of the calretinin-positive interneurons, whose density was decreased in the superficial cortical layers II-III and increased in deepest layers. This study provides the first mechanistic and functional evidence that alcohol impairs glutamate-regulated activity of pial microvessels. Endothelial dysfunction is characterized by altered metalloproteinase activity and interneuron mispositioning, which was also observed in a fetus with fetal alcohol syndrome. These data suggest that alcohol-induced endothelial dysfunction may contribute in ectopic cortical GABAergic interneurons, that has previously been described in infants with FASD.

1. Introduction

Alcohol consumption during pregnancy can severely impair infant neurodevelopment, leading to long-term behavioral deficits (Andreu-Fernández et al., 2019; Bakoyiannis et al., 2014). Fetal alcohol syndrome (FAS), which is characterized by intrauterine growth retardation, typical craniofacial dysmorphism, central nervous system

malformations and behavioral and neurocognitive deficits, is the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorder (FASD) (Jones and Smith, 1973; Riley et al., 2011). Because fetal alcohol exposure induces neurodevelopmental defects (Wozniak et al., 2019), most studies have focused on nerve cells, i.e., neurons (Korpi et al., 2015), oligodendrocytes and astrocytes (Wilhelm and Guizzetti, 2015), to study the mechanisms involved in the deleterious effects of alcohol on brain

* Corresponding author.

E-mail address: bruno.gonzales@univ-rouen.fr (B.J. Gonzalez).

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105074>

Received 8 April 2020; Received in revised form 28 August 2020; Accepted 31 August 2020

Available online 03 September 2020

0969-9961/© 2020 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

development. However, several studies recently reported that *in utero* alcohol exposure markedly affects brain angiogenesis in both animal and human neonates (Girault et al., 2017; Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017; Wang et al., 2016). Specifically, alcohol induces cortical microvascular disorganization (Lecuyer et al., 2017).

Over the last decade, several major publications have reported that some nerve cell types, including gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic interneurons, require brain microvessels to migrate from the ganglionic eminences to their final cortical destination (Won et al., 2013; Luhmann et al., 2015). Moreover, migrating GABAergic interneurons arising from the superficial marginal zone enter the cortical plate following radial cortical microvessels (Léger et al., 2020). This outside-in vessel-associated migration of GABA interneurons is controlled by glutamate through an N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R)-dependent mechanism (Léger et al., 2020). Consistent with this neurovascular pathway, evidence has indicated that neonatal endothelial cells, including those from pial microvessels, express functional NMDA-R (Léger et al., 2020; Legros et al., 2009; Henry et al., 2013) and that glutamate, released by excitatory cells, can guide the migrating GABAergic neurons (Bartolini et al., 2017). These data suggest that the proper positioning of GABA interneurons within the developing cortex requires correct angiogenesis.

Several studies have reported that matrix metalloproteinase (MMP)-9 plays a major functional role in neurodevelopment (Ould-Yahoui et al., 2013). MMP-9 has been shown to contribute to controlling neuronal migration by regulating the pericellular environment (Ayoub et al., 2005; Vaillant et al., 2003). In addition, using cultured cortical endothelial cells, *in vitro* studies have revealed that glutamate promotes MMP-9 and tissue plasminogen activator (tPA) secretion and activation in the developing cortex through an NMDA-R-dependent mechanism (Legros et al., 2009). Interestingly, endothelial expression of NMDA-R occurs during perinatal life (Legros et al., 2009; Léger et al., 2020) and coincides with late migration of GABA interneurons arising from the superficial marginal zone (Xu et al., 2011). Because ethanol acts as an NMDA-R antagonist (Zhao et al., 2015), alcohol exposure during late gestation may impact the endothelial activity of pial microvessels in the developing cortex.

Knowing that i) *in utero* alcohol exposure impairs cortical angiogenesis in both animal models and FASD infants, ii) immature GABA interneurons use microvessels as migration guides to reach and enter the neocortex, and iii) glutamate has been shown to control endothelial protease activity through a NMDA-R mechanism, we hypothesized that alcohol would impair the activity of pial microvessels, and may coincide with a mispositioning of the GABAergic interneurons populating the superficial cortical layers.

2. Methods

2.1. Wild-type and transgenic animals

Naval Medical Research Institute (NMRI) mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). FVB-Tg(GadGFP)45704Swn transgenic mice (# 003718) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). In this mouse strain developed by Oliva et al. (2000), GABAergic interneurons arising from the ganglionic eminences express enhanced green fluorescent protein under the control of the mouse *Gad1* gene promoter. tPA-knockout (tPA^{-/-}) C57Bl6/129 mice (tPA^{-/-} in 87.5/12.5% ratio) were developed and provided by the Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Belgium (Carmeliet et al., 1993). Floxed *Grin1* mice (B6.129S4-*Grin1*^{tm2Stl}/J; # 005246) were from The Jackson Laboratory. Floxed *Grin1* mice allow deletion of the *GluN1* subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in Cre recombinase expressing cells/tissues (Léger et al., 2020). VE-Cadherin-Cre (B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J; # 006137) were from The Jackson Laboratory. Cre expression can be seen in the embryo and in adult endothelium of developing and quiescent

vessels. All mice were housed in a temperature-controlled room (21 ± 1 °C) with a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) with free access to food and tap water. Animal care and manipulation complied with recommendations issued by the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 2010/63/EU, decree 2013-118, license no. 21CAE035) under the supervision of authorized investigators (B.J.G., authorization no. 7687, from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

2.2. Chemicals

Glutamate, Coomassie blue, isolectin-B4-TRITC/FITC, phosphate-buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), Triton X-100, hematoxylin and β -actin primary antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) Tris-glycine gel (containing 0.1% gelatin as a gelatinase substrate), renaturing buffer, developing buffer, DQ-gelatin-FITC, and DQ-casein-FITC were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Paraformaldehyde (PFA) was obtained from Labonord (Templemars, France). The GFP primary antibody was from Abcam (Cambridge, UK). The somatostatin primary antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The cleaved caspase-3 primary antibody was from Cell Signaling (MA, USA). The secondary antibody, Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (A-21206) used for immunohistochemistry, was from Invitrogen. The Apo-ONE homogeneous caspase 3/7 kit was obtained from Promega (Fitchburg, WI, USA). Ketamine (Ketalar®) was obtained from Parke-Davis (Berlin, Germany). MK801 was obtained from Tocris (R&D, Lille, France).

2.3. *In utero* ethanol exposure

Absolute ethanol (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was diluted in 0.09% sodium chloride (NaCl). Pregnant mice were subcutaneously injected with 3 g/kg ethanol or NaCl 0.09% per day from gestational day (GD)15 to GD20 at 11 a.m. The administered ethanol dose was determined based on a previous study (Jégou et al., 2012) and resulted in a blood alcohol level (BAL) of 1.5 g/L 30 min postinjection. This BAL value represents a drunken state in humans and dropped below 0.5 g/L after 3 h. Treatments were performed on both wild-type and *Gad67-GFP* mice.

2.4. Preparation and treatment of cultured cerebral slices from mouse embryos and neonates

Cultured cerebral slices from wild-type and transgenic mice were used to demonstrate that glutamate could modify endothelial protease activities via the NMDA receptor and that ethanol can block this effect. Cortex brain slices were obtained from the mice on embryonic day (E) 15 or postnatal day (P)2. Previous studies have demonstrated that at this stage, numerous immature GABAergic interneurons are still migrating along the superficial marginal zone (Inada et al., 2011). Mice were humanely killed via decapitation, and their brains were rapidly dissected to isolate the hemispheres. The neocortex was immediately placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl, 125; KCl, 3; CaCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 26; and D-glucose, 10 at pH 7.4. Transverse slices (250 μ m) were cut at 4 °C using a Leica vibratome VT1000S (Reuil-Malmaison, France), then transferred into 24-well Costar plates (Cambridge, MA, USA) containing aCSF and incubated for 30 min to recover at 37 °C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO₂/95% air. The slices were then washed with fresh aCSF and treated for 3 h at 37 °C with glutamate (100 μ M) and ethanol (50 mM) alone or in combination.

2.5. Measurement of caspase-3 activity

To measure caspase-3 activity, E15 brain hemislices from NMRI mice were treated with aCSF, ethanol (50 mM) for several periods ranging from 3 to 24 h. Ketamine (100 μ M) was used as an internal proapoptotic control (Aligny et al., 2014). For each condition the ipsilateral side of the slice was used as a control. Afterwards, cortices were microdissected and homogenized in 500 μ L of hypotonic lysis buffer. Proteins (20 μ g) were incubated at 30 °C with 100 μ L of caspase-3 buffer containing 1 μ L of the caspase-3 substrate Z-DEVD-R110 provided with the Apo-ONE homogeneous caspase-3/7 kit (Promega). Fluorescence intensity was quantified every 5 min for 2 h under excitation on emission wavelengths of 485 nm and 520 nm using a chameleon plate reader (Mustionkatu, Turku, Finland).

2.6. Mouse brain immunohistochemistry

Brain slices were fixed in 4% PFA in PBS, then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100; Supplementary Table 1). The slices were then rinsed twice with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing secondary antibody. Cell nuclei were visualized by incubating slices for 5 min in 1 μ g/mL Hoechst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed under a Leica DMI 6000B microscope. The primary antibodies were omitted to control for nonspecific binding of the secondary antibody.

2.7. SDS-PAGE gelatin zymography

Gelatin zymograms revealed MMP-2 and MMP-9 activities in the P2 microdissected cortices. Cultured brain slices were incubated for 3 h under the different treatments. Cortices were microdissected from the slices, washed in fresh aCSF, and homogenized in 50 μ L of lysis buffer (50 μ M Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM glycerophosphate, 100 mM sodium fluoride, and 1% Triton X100). After centrifuging the homogenates (20,000 g \times 15 min), the supernatants were collected, and protein concentrations were determined via Bradford assays. Proteins were loaded (30 μ g/well) and separated by electrophoresis, then the gels were incubated in renaturing buffer for 30 min at room temperature and in developing buffer for another 30 min at room temperature. After transfer into fresh developing buffer, the gels were incubated for 5 days at 37 °C, stained in 0.5% Coomassie blue for 1 h, and rinsed for 1 h in distilled water. Light stripes on blue background indicated that the gelatinases digested the gelatin in the gel. Digital images of the gels were acquired, and digestion stripes were quantified using Explora Nova Mercator software (La Rochelle, France). Experiments were performed in cultured slices from wild-type and tPA^{-/-} mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol-exposure model.

2.8. *In situ* gelatinase zymography

In situ MMP zymography was performed on 250- μ m brain slices previously stained with isolectin-B4-TRITC to visualize the pial microvessels. Slices were incubated for 30 min in aCSF containing isolectin-B4-TRITC (1/50) at 37 °C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO₂/95% air. After 2 washes for 10 min each with aCSF, slices were incubated for 3 h with the quenched gelatinase substrate DQ-gelatin-FITC (1/50) in the presence of glutamate (100 μ M) and 50 mM alcohol alone or in combination. FITC fluorescence, indicative of cell-specific gelatinase activity in the slices, was quantified from time-lapse recordings using a fluorescence video-microscope system (DMI 6000B, Leica, Reuil-Malmaison, France) coupled with Explora Nova Mercator software. Microphotographs were acquired at 488 nm and 540 nm every 15 min for 3 h to follow the DQ-gelatin-FITC degradation kinetics and to visualize the pial microvessels, respectively.

A background level was defined in a negative region of the slice. Experiments were performed on cultured slices from wild-type and tPA^{-/-} mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol-exposure model.

2.9. SDS-PAGE casein zymography

Casein zymograms were used to reveal tPA activity in P2 cortical extracts. Cultured brain slices were incubated for 3 h in different treatments. Cortices were microdissected, washed in fresh aCSF, and homogenized in 50 μ L of lysis buffer. After centrifuging the homogenates (20,000 g \times 15 min), the supernatants were collected, and protein concentrations were determined via Bradford assay. Proteins were loaded (15 μ g/well) and separated by electrophoresis. The gels, containing plasminogen, were incubated in renaturing buffer (Triton X-100, 12.5 mL; H₂O, 487.5 mL) at 4 °C overnight and rinsed in water for 30 min at 4 °C. Next, the gels were transferred in developing buffer (glycine, 3.75 mM; EDTA, 1.45 mM) for 3.5 h at 37 °C, then stained with 0.5% Coomassie blue for 1 h and finally destained in 40% methanol and 10% acetic acid for 30 min at room temperature. Light stripes on blue background indicated casein digestion in the gel by tPA-activated plasmin. Digital images of the gels were acquired, and digestion stripes were quantified using Explora Nova Mercator software (La Rochelle, France). Experiments were performed on cultured slices from P2 wild-type (WT) and tPA^{-/-} mice for acute treatments and from *in vivo* alcohol-exposed mice.

2.10. *In situ* casein zymography

In situ casein zymography was performed on 250- μ m brain slices previously stained with isolectin-B4-TRITC to localize the pial vascular network. After 2 washes for 10 min each with aCSF, slices were incubated for 3 h with DQ-casein-FITC (1/125) in the presence of glutamate (100 μ M) and alcohol (50 mM) alone or in combination. FITC fluorescence indicating cell-specific digestion of the substrate was quantified via video microscopy using a DMI 6000B fluorescence video-microscope system Leica (Reuil-Malmaison, France) as described for *in situ* gelatinase zymography. Experiments were performed on cultured slices from P2 wild-type and tPA^{-/-} mice for acute treatments and from *in vivo* alcohol-exposed mice.

2.11. Cultures of P2 cortical endothelial cells

Cultured neonatal endothelial cells were used in order to demonstrate that glutamate and ethanol could directly interact with this cell type. Primary endothelial cells isolated from brain microvessels of P2 C57BL/6 mouse neonates were purchased from Cell Biologics (Chicago, IL, USA). Cells were cultured at 37 °C, in a humidified environment with 5% CO₂. The cells were fed every 2 days with a complete mouse endothelial cell culture medium on 60-mm-diameter dishes or 12-well slides. The cells were incubated for 24 h with serum-free medium 2 days after reaching confluence. The cells were then treated with 50 mM ethanol or aCSF for 30 min before calcium experiments.

2.12. Measurement of intracellular calcium levels

Endothelial cell cultures or organotypic brain slices obtained from P2 mice were incubated for 15 min in aCSF containing 10 μ M fura-2 AM and 0.03% pluronic F-127. The endothelial cultures or slices were then washed twice for 5 min in aCSF at 37 °C, then the slices were transferred to a 35-mm dish containing 1 mL of aCSF and immobilized using nylon mesh. The aCSF temperature was kept at 37 °C, and the cultured cells or slices were rinsed with aCSF. One volume of 400 μ M glutamate alone or combined with 100 mM ethanol was perfused into an equal volume of aCSF, bathing the slice to the final 200- μ M and 50-mM concentrations, respectively. The fluorescent signals associated with calcium-free and calcium-bound Fura-2 were measured by alternately exciting the slices

at 340 and 380 nm using a Leica DM Fluorescence microscope equipped with a rapid shutter wheel. The emitted fluorescence was collected at 510 nm, and the ratio of the two signals was calculated using Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France). Data were exported to GraphPad Prism software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA), which was used to compute the maximal fluorescence intensity and the area under the curve (AUC). Experiments were performed in cultured slices from wild-type mice for acute treatments and from *in vivo* alcohol-exposed mice.

2.13. Western blot

Microdissected cortices from Gad67-GFP mice were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer. After centrifugation, supernatants were collected, and protein concentrations were determined via Bradford assay. Pellets were denatured at 100 °C for 5 min in 50 µL of Tris/HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue and 3% (w/v) SDS, then electrophoresed on 10% SDS-PAGE. After separation, the proteins were electrically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA). The membrane was incubated with blocking solution (1% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h, then incubated overnight with primary antibodies against somatostatin, GluN1, GluN2A, GluN2B, cleaved-caspase3, GFP, Dlx1 and actin (Supplementary Table 1). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) plus immunoblotting detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). The immunoreactive band intensities were quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories, Mame la coquette, France), and β-actin was used as a loading control. Commercial markers (Seebueh pre-stained standard, Invitrogen) were used as molecular weight standards.

2.14. Quantification of GFP-positive interneurons in Gad67-GFP mice

To measure the GFP-positive cell densities in the P15 Gad67-GFP mice, images were acquired and saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope. Images were subsequently opened in Mercator software, and regions of interest (ROIs) were drawn. Counting frames were defined within the ROIs, and a threshold was set to differentiate FITC-positive cells from the background. The number and cumulated areas of the objects within the ROI were calculated via a computer segmentation process, yielding cell numbers and cell densities, respectively.

Table 1
Gestational age and cause of death of control patients and the FAS case.

Control cases				
Case number	Term	Gender	Brain biometry and maturation ^a	Cause of death
1	35 WG	Female	25th percentile	Non immune fetal hydrops Caesarean section Death after 27 min of resuscitation
2	36 WG	Male	50th percentile	Dilated cardiomyopathy Death at day 2
3	36 WG	Male	50th percentile	Bilateral renal agenesis Fallot tetralogy Immediate postpartum death
4	37 WG	Male	50th percentile	Normal pregnancy Death despite resuscitation
5	39 WG	Male	50th percentile	No autopsy and placental abnormalities Peripartum <i>in utero</i> death Placental membrane praevia vessel rupture
FAS case^b				
1	37 WG	Male	< 3rd percentile	<i>In utero</i> fetal death confirmed after induction of delivery

^a According to the morphometric criteria of Guihard-Costa and Larroche, 1987; 1990 and Guihard-Costa et al., 2002. WG: weeks'gestation.

^b Alcohol consumption by the mother during pregnancy was established and the fetus presented indistinct philtrum and microretrognathism.

2.15. Quantification of spine morphology and density in transgenic Gad67-GFP mice

The fine network of the secondary and tertiary dendrites was acquired for the Gad67-GFP mice using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning imaging system (Leica Microsystems AG). Z-stack image series were later deconvolved using AutoQuant X3 software and loaded into IMARIS imaging software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D reconstruction. The Filament Tracer function was used to assign and classify spines, yielding spine densities and categories (stubby, filopodia or mushroom-shaped). For each slice, 2 ROIs were defined, 2–3 dendrites were quantified per ROI, and the total number of quantified neurites was fixed at 20 per group.

2.16. Control and alcohol-exposed human brains

Clinical characteristics and cause of death of five control patients and a FAS case are presented in Table 1. Fetal brains were obtained with the written consent of the parents, in agreement with the local ethic committee and in accordance with the French law. Autopsy procedures were performed according to standardized protocols including X-rays, photographs, macroscopical and microscopical examination of all viscerae. Visceral biometric data were evaluated according to Guihard-Costa et al. (2002). The control brains aged 35 to 39 WG were macroscopically and microscopically free of detectable abnormalities and biometric and maturation data were normal for the term according to Guihard-Costa and Larroche (1990) and Feess-Higgins and Larroche (1987). The brains were fixed in a 10% formalin-zinc buffer solution for two months. Multiple seven-micrometer sections obtained from paraffin-embedded tissue were stained using hematoxylin-eosin, which allows for recognizing the microscopic level of maturity of all neuroanatomical structures and for identifying potential lesions. All brain samples used in this study belong to a collection declared to the French Ministry of Health (collection number DC-2015-2468, accession number AC-2015-2467) located in the Pathology Department (Prof. Annie Laquerrière) of Rouen University Hospital.

2.17. Human brain immunohistochemistry

In all cases, 6-µm paraffin-embedded sections were obtained from the superior frontal cortex and processed for routine immunohistochemistry according to standardized protocols using an antibody against calretinin (rabbit monoclonal, diluted 1/100; Life Technology Invitrogen, Villebon sur Yvette, France; Supplementary

Table 2
Statistical analysis.

Experiments	Test	n independents experiments	p-value *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001
Gel zymography, effect of EtOH on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 1A)	One-way ANOVA Tukey's post-test	n = 8	ANOVA F 7.84 p = 0.0006*** Tukey's post-test Ctrl vs. Glut p = 0.0011** Glut vs. Glut + EtOH p = 0.0022**
In situ zymography, effect of glutamate and EtOH on MMPs activity on P2 slices (Fig. 1D)	Two-way ANOVA Tukey's post-test	n = 13 (Ctrl and Glut) n = 4 (EtOH) n = 5 (Glut + EtOH)	ANOVA Treatment F 29.92 p < 0.0001**** Time F 21.81 p < 0.0001**** Tukey's post-test For t = 180 min Glut vs. Ctrl p = 0.0003*** Glut + EtOH vs. Glut p = 0.0001###
In situ zymography, effect of glutamate and EtOH on MMPs activity on P2 slices from Grin1 ^{fl/fl} /VcCad ^{Cre} mice (Fig. 1E)	Two-way ANOVA Tukey's post-test	n = 3 (Ctrl, Glut + EtOH and Glut) n = 4 (EtOH)	ANOVA Treatment F 1.199, p = 0.2920, ns Time F 0.8875 p = 0.4498, ns Tukey's post-test ns for all comparisons Ctrl vs. Glut, p = 0.0006***
Gel zymography, effect of glutamate on MMP9 activity in WT mice (Fig. 2B, left panel)	Unpaired t-test	n = 3	
Gel zymography, effect of glutamate on MMP9 activity in KO tPA mice (Fig. 2B, right panel)	Unpaired t-test	n = 3	Ctrl vs. Glut, p = 0.5114, ns
In situ zymography, effect of glutamate and EtOH on casein activity on WT mice (Fig. 2F)	Two-way ANOVA Bonferroni's post-test	n = 7 (Ctrl) n = 8 (Glut) n = 5 (EtOH, EtOH + Glut)	ANOVA Treatment F 52.62 p < 0.0001**** Time F 8.300 p < 0.0001**** Bonferroni's post-test For t = 180 min Glut vs. Glut + EtOH p < 0.001###
In situ zymography, effect of glutamate and EtOH on MMP activity on KO tPA mice (Fig. 2G)	Two-way ANOVA Bonferroni's post-test	n = 5 (Ctrl, EtOH) n = 6 (Glut, EtOH + Glut)	ANOVA Treatment F 2.055 p = 0.1069, ns Time F 4.668 p < 0.0001**** Bonferroni's post-test No statistical differences
Calciometry on endothelial cells (Fig. 3E)	One-way ANOVA Tukey's post-test	n = 3 mean value of 30 cells (10 cells per experiment from 3 independent experiments)	ANOVA F 1695 p < 0.0001*** Tukey's post-test Ctrl vs. Glut p < 0.0001**** Glut vs. Glut + EtOH p < 0.0001**** Ctrl vs. <i>in utero</i> EtOH p = 0.0054**
Calciometry on P2 slices, nervous cells (Fig. 4E)	Unpaired t-test	n = 10 (Ctrl) n = 7 (<i>in utero</i> EtOH)	Ctrl vs. <i>in utero</i> EtOH p = 0.0134*
Calciometry on P2 slices, endothelial cells	Unpaired t-test	n = 10 (Ctrl) n = 10 (<i>in utero</i> EtOH)	
Western blot GluN1 P2 (Fig. 5A)	Unpaired t-test	n = 3 (11 samples from 3 independent offspring)	Ctrl vs. EtOH p = 0.0051 **
Western blot GluN2A P2 (Fig. 5B)	Unpaired t-test	n = 3 (11 samples from 3 independent offspring)	Ctrl vs. EtOH p = 0.3553, ns
Western blot GluN2B P2 (Fig. 5C)	Unpaired t-test	n = 3 (11 samples from 3 independent offspring)	Ctrl vs. EtOH p = 0.17, ns
In situ zymography, effect of glutamate on kinetics of MMPs activation (No alcohol exposure <i>in utero</i>) (Fig. 5D, upper panel)	Two-way ANOVA Bonferroni's post-test	n = 14 (Ctrl) n = 16 (Glut)	ANOVA Treatment F 136 p < 0.0001**** Time F 59.65 p < 0.0001**** Bonferroni's post-test For t = 180 min Ctrl vs. Glut p < 0.001***
In situ zymography, effect of glutamate on kinetics of MMP activation (<i>In utero</i> alcohol exposure) (Fig. 5D, lower panel)	Two-way ANOVA Bonferroni's post-test	n = 6 (Ctrl) n = 5 (Glut)	ANOVA Treatment F 49.54 p < 0.0001**** Time F 1.69 p = 0.0774, ns Bonferroni's post-test For t = 180 min Ctrl vs. Glut p = 0.0195*

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Experiments	Test	n independents experiments	p-value *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001
Compared effects of glutamate on MMP activity (Fig. 5E)	One-way ANOVA Tukey's post-test	<u>Group 1</u> : Neonates not exposed to alcohol in utero n = 14 (Ctrl) n = 16 (Glut) <u>Group 2</u> : Neonates exposed to alcohol in utero n = 6 n = 5	ANOVA F 25.11 p < 0.0001**** Tukey's post-test Basal vs. Glut p = 0.0369* Basal vs. Glut p < 0.0001**** Glut (group 1) vs. Glut (group 2) p < 0.0001####
Density of GFP-positive cells in Gad67-GFP mice (Fig. 6D)	Unpaired t-test	n = 8 (males) n = 9 (females)	Ctrl males vs. EtOH males p = 0.0485* Ctrl females vs. EtOH females p = 0.0283* Ctrl vs. EtOH p = 0.006**
Western blot GFP in Gad67-GFP mice (Fig. 6E)	Unpaired t-test	n = 9 (males) n = 10 (females)	Ctrl males vs. EtOH males p = 0.0273* Ctrl females vs. EtOH females p = 0.0394* Ctrl vs. EtOH p = 0.0025**
Western blot of Dix1 in Gad67-GFP mice (Fig. 6F)	Unpaired t-test	n = 6 (males) n = 7 (females)	Ctrl males vs. EtOH males p = 0.0246* Ctrl females vs. EtOH females p = 0.0533, ns Ctrl vs. EtOH p = 0.011*
Western blot of Somatostatin in Gad67-GFP mice (Fig. 6G)	Unpaired t-test	n = 18 (males) n = 16 (females)	Ctrl males vs. EtOH males p = 0.9754, ns Ctrl females vs. EtOH females p = 0.1822, ns Ctrl vs. EtOH p = 0.2808, ns
Spine distribution (Fig. 6H)	Chi-square	Number of neurites analyzed Ctrl n = 8 (males) n = 7 (females) Alcohol n = 12 (males) n = 10 (females)	Chi-square, df = 2.135, 2 p = 0.3438, ns
Spine density in Gad67-GFP mice (Fig. 6I)	Unpaired t-test	from 3 independent neonates n = 20 fibers analyzed from 3 animals	Ctrl vs. EtOH p = 0.0013**
Cortical distribution of calretinin neurons in Ctrl and FAS fetuses (Fig. 7E)	Chi-square	3 ROIs quantified by cortical layer from 5 Ctrl cases (GW35-39) and 1 FAS case at GW37	Chi-square, df = 32.19, 5 p < 0.0001****
Effect of ethanol and MK801 on MMP-9-like activity in P2 cortical slices (Supplementary Fig. 1A)	One-way ANOVA Tukey's post-test	n = 13 for Ctrl and Glut n = 5 for the other groups	ANOVA F 5.147 p = 0.0010** Tukey's post-test Ctrl vs. Glut p = 0.0109* Glut vs. Glut + Eth p = 0.0482 [†] Glut vs. MK801 p = 0.0029** Glut vs. Glut + MK801 p = 0.0208 [†]
Effect of ethanol and MK801 on tPA-like activity in P2 cortical slices (Supplementary Fig. 1B)	One-way ANOVA Tukey's post-test	n = 10 for Ctrl and Glut n = 5 for the other groups	ANOVA F 18.94 p < 0.0001**** Tukey's post-test Ctrl vs. Glut p = 0.0359* Ctrl vs. Eth p = 0.0408* Ctrl vs. Glut + Eth p = 0.0002*** Ctrl vs. MK801 p = 0.0025** Ctrl vs. Glut + MK801 p = 0.0268* Glut vs. Eth p < 0.0001**** Glut vs. Glut + Eth p < 0.0001**** Glut vs. MK801 p < 0.0001**** Glut vs. Glut + MK801 p < 0.0001****
Effect of glutamate on tPA activity (Supplementary Fig. 2B)	Unpaired t-test	n = 3	Ctrl vs. Glutamate p = 0.012*
Time-effect of ethanol and ketamine on caspase-3 cleavage analyzed by Western blot (Supplementary Fig. 3A)	Unpaired t-test	n = 5 for Ctrl and ethanol conditions n = 4 for Ctrl and ketamine conditions	Ctrl vs. ethanol ns for each incubation time Ctrl vs. ketamine p = 0.0007***
Effect of ethanol on caspase-3-like activity (Supplementary Fig. 3B)	Unpaired t-test	n = 8 for all conditions	Ctrl vs. ethanol ns for each incubation time Ctrl vs. ketamine p = 0.0417*

Table 1), a GABAergic marker of human cortical interneuron subpopulations present in superficial cortical layers. Immunohistochemical procedures included microwave pretreatment to aid antigen retrieval (pretreatment CCl kit, Ventana Medical Systems Inc., Tucson AZ, USA). Sections were incubated for 32 min at room temperature using the Ventana Benchmark XT system. After incubation, slides were processed

using the Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana) and counterstained with hematoxylin.

2.18. Quantification of calretinin interneurons in the human cortex

To measure the calretinin-positive cell densities in the 37 WG

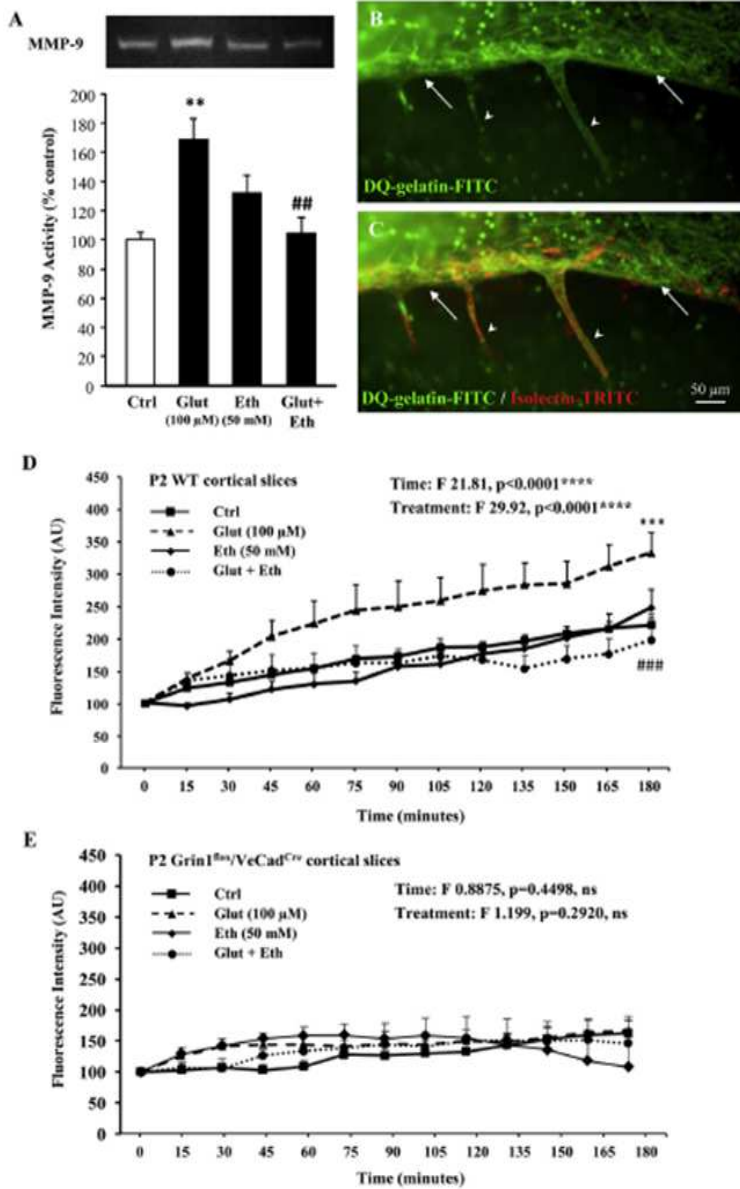


Fig. 1. Effects of acute ethanol exposure on MMP-9 activity in P2 cortical slices. **A:** Gel zymography quantification of MMP-9 activity in extracts from microdissected cortices exposed for 3 h to aCSF (Ctrl), glutamate (100 μM; Glut) or ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. **B, C:** DQ-gelatin-FITC activity *via in situ* zymography performed on cultured cortical slices at P2 (**B**). Endothelial cells labelled with Isolectin-B4-FITC (**C**) indicate that gelatinase activity is closely associated with radial cortical microvessels (arrowheads) and tangential vessels from the pia migratory route (arrows). **D:** Time-lapse quantification of DQ-gelatin-FITC proteolysis in P2 cortical slices from wild-type mice exposed for 3 h to aCSF (Ctrl), glutamate (100 μM; Glut) or ethanol (50 mM; Eth) alone or cocubated. **E:** Time-lapse quantification of DQ-gelatin-FITC proteolysis in P2 cortical slices from Grin1^{flax}/VcCad^{Cre} mice exposed for 3 h to aCSF (Ctrl), glutamate (100 μM; Glut) or ethanol (50 mM; Eth) alone or cocubated. For gel zymography experiments, ***p* < 0.01 vs. control and ##*p* < 0.01 vs. glutamate using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. For *in situ* zymography experiments, ****p* < 0.001 vs. control and *****p* < 0.0001 vs. glutamate vs. glutamate + ethanol. Details of the statistical analysis are provided in Table 2.

cortices, images were acquired and saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope. Images were subsequently opened in Mercator software, and ROIs were drawn. Counting frames were defined within the ROIs, and a threshold was set to differentiate calretinin-positive cells from the background. Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France) generated an Excel file providing the number of objects (calretinin-positive cells) and ROI areas, yielding the cell densities.

2.19. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Table 2 summarizes the tests used for each experiment, the number of

independent experiments, and the *p*-values. Data are provided as mean values ± the standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Alcohol inhibits glutamate-induced endothelial MMP-9 activity in cultured cortical slices from mouse neonates

Because i) migrating GABA interneurons arising from the superficial marginal zone enter the neocortex using radial vessels as guides (Léger et al., 2020; Won et al., 2013), ii) neonatal endothelial cells express functional NMDA receptors (Henry et al., 2013), and iii) alcohol, which

inhibits the NMDA-R (Zhao et al., 2015), impairs cortical angiogenesis (Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017), we hypothesized that alcohol would impact the endothelial cell activity of pial and radial cortical microvessels. Gel zymography experiments performed at P2, when GABA interneurons arising from the superficial marginal zone are still

entering the cortical plate (Miyoshi and Fishell, 2011; Xu et al., 2011) revealed that treating cortical slices with glutamate (100 μM) greatly increased the MMP-9 activity ($p < 0.01$; Fig. 1A). Coincubating the slices with 50 mM alcohol significantly prevented glutamate from affecting the MMP-9 activity ($p < 0.01$; Fig. 1A). Cleavage of the

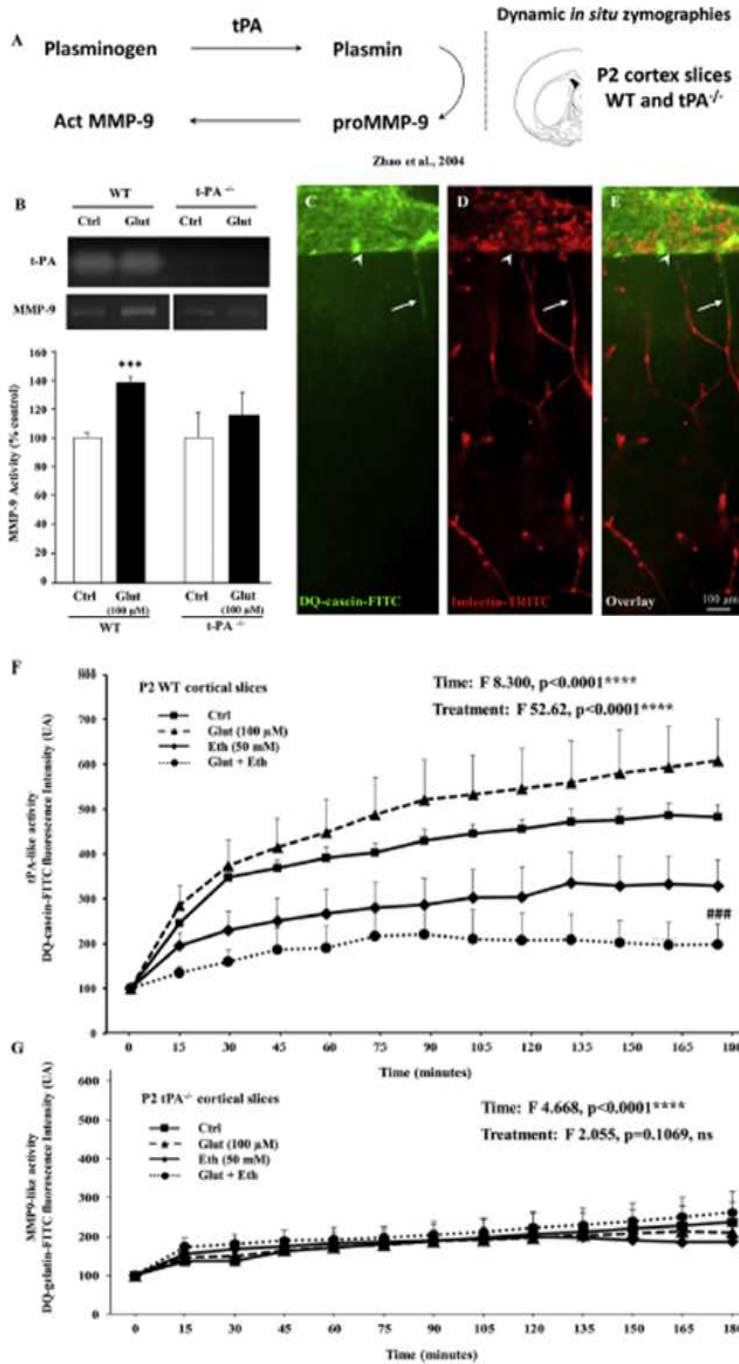


Fig. 2. Effects of glutamate and acute ethanol exposure on tPA and MMP-9 activities in P2 cortical slices from wild-type and tPA-knockout mice. **A:** Graphical illustration of the tPA-dependent mechanism leading to MMP-9 activation and animal strains used for *in situ* transposition to cultured cortical slices. **B:** Gel zymography quantification of the effect of glutamate (100 μM; Glut) on MMP-9 activity in wild-type (WT) and tPA^{-/-} mice. tPA zymography blots were used as a negative control. **C-E:** DQ-casein-FITC activity by *in situ* zymography on a cultured cortical slice at P2 (C). Isolectin-TRITC labeling (D) indicates that the tPA-like protease activity is closely associated with the pial vasculature (arrowheads) and radial microvessels from the superficial cortical layers (arrows; E). **F,G:** Time-lapse quantification of the DQ-casein-FITC proteolysis in P2 cortical slices from WT (F) and tPA^{-/-} (G) mice exposed for 3 h to aCSF (Ctrl), glutamate (100 μM; Glut) or ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. For the gel zymography experiments, *** $p < 0.001$ vs. WT control using an unpaired t-test. For the *in situ* zymography experiments: ## $p < 0.001$ glutamate vs. glutamate + ethanol using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Details of the statistical analysis are provided in Table 2.

quenched MMP-like substrate DQ-gelatin-FITC appearing in the *in situ* zymographies performed on cultured cortical slices at P2 showed that the gelatinase activity was located at the tangential microvessels (Fig. 1B, C; arrows) and along the radial microvessels from the cortical superficial layers (Fig. 1B, C; arrowheads). *In situ* zymographies revealed that incubating the cultured slices with glutamate (100 μ M) significantly increased the endothelial-associated MMP-like activity (treatment effect $p < 0.0001$; Fig. 1D). Ethanol (50 mM; Fig. 1D) and MK801 (20 μ M; Supplementary Fig. 1A) significantly blocked the stimulatory effect of glutamate on the MMP-like activity. In P2 cortical slices from *Grin1^{lox}/VeCad^{Cre}* mice, neither glutamate (100 μ M) nor ethanol (50 mM) were able to modify the basal MMP-9 activity (Fig. 1E).

3.2. Alcohol inhibits the glutamate-induced endothelial MMP-9 activity through a tPA-dependent process

Because a functional link exists between MMP-9 and the endothelial protease, tPA (Zhao et al., 2004; Omouendze et al., 2013; Fig. 2A), we investigated the effect of glutamate and alcohol on tPA activity. Gel zymography experiments performed on wild-type P2 cortical extracts showed that glutamate (100 μ M) increased both tPA (Supplementary Fig. 2) and MMP-9 activities (Fig. 2B). Conversely, in *tPA^{-/-}* mice, glutamate (100 μ M) failed to stimulate the MMP-9 activity, and no tPA activity was detected (Fig. 2B). As with MMP-9, the tPA-like activity

was visualized by *in situ* zymography on cultured P2 cortical slices using the DQ-casein-FITC substrate (Fig. 2C–E). Colabelling the cortical microvessels with isolectin-TRITC indicated that the tPA-like proteolytic activity colocalized with both pial (Fig. 2C–E; arrows) and radial cortical microvessels (Fig. 2C–E; arrowheads). In addition, kinetics of the DQ-casein-FITC proteolysis showed that alcohol (50 mM; Fig. 2F; treatment effect $p < 0.0001$) and MK801 (20 μ M; Supplementary Fig. 1B) significantly inhibited the glutamate-induced tPA-like activity. In slices from *tPA^{-/-}* neonates, neither glutamate (100 μ M) nor alcohol (50 mM) modified the endothelial MMP-9 activity, thus supporting tPA-dependent MMP-9 activation (Fig. 2G).

3.3. Acute alcohol exposure inhibits glutamate-induced calcium mobilization in neonatal endothelial cells

Glutamate-induced stimulation of MMP-9 and tPA activities on cortical microvessels is NMDA-R-dependent (Omouendze et al., 2013; Léger et al., 2020). However, because several cell types express NMDA-Rs in the developing cortex, we used calcimetry to investigate a direct effect of glutamate and ethanol on cultured dissociated endothelial cells from P2 cortices (Fig. 3). Immunohistochemistry showed characteristic GluN1-positive puncta in both isolated microvessels and dissociated endothelial cells colabelled with CD31 antibody (Fig. 3A, B). After loading the endothelial cells with the ratiometric probe FURA2 (Fig. 3C), glutamate perfusion (100 μ M) markedly increased

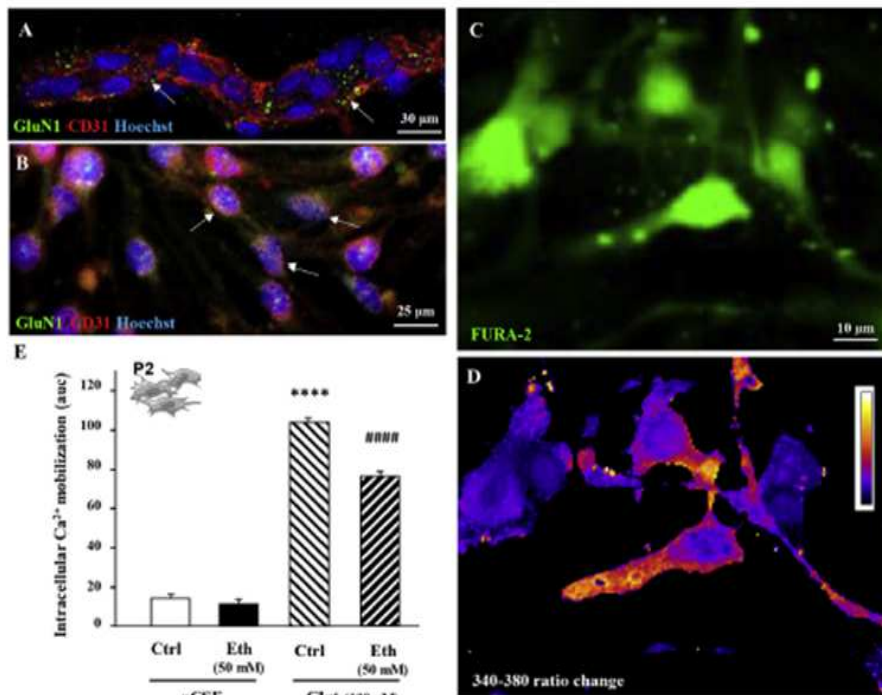


Fig. 3. Effects of glutamate and alcohol on intracellular calcium mobilization in cultured dissociated endothelial cells from neonatal cortical microvessels. **A:** Triple fluorescent labeling showing GluN1 subunit immunoreactivity (green puncta) in an isolated cortical microvessel from a P2 neonate. Endothelial cells are labelled with a CD31 antibody. Nuclei are labelled with Hoechst. **B:** Triple fluorescent labeling showing GluN1 subunit immunoreactivity (green puncta) in cultured dissociated endothelial cells from P2 cortical microvessels. Endothelial cells are labelled with CD31 antibody. Nuclei are stained with Hoechst. **C:** Cultured endothelial cells from P2 cortical microvessels loaded with the ratiometric probe Fura-2. **D:** False color of the 340/380 ratio changes representing intracellular calcium mobilization after exposure to glutamate (100 μ M). The color scale shows the absent (black) and maximal (white) ratio changes. **E:** Quantification of the 340/380 ratio changes in under basal conditions (Ctrl) or after perfusion with glutamate (100 μ M; Glut) and ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. **** $p < 0.0001$ vs. control and #### $p < 0.0001$ vs. glutamate using one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Details of the statistical analysis are provided in Table 2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$; $p < 0.0001$; Fig. 3D, E). Administering alcohol alone in the culture medium yielded no apparent mobilization of intracellular calcium (Fig. 3E). Conversely, coadministering alcohol with glutamate (100 μ M) significantly reduced the stimulatory effect of the excitatory neurotransmitter on $[Ca^{2+}]_i$ mobilization ($p < 0.0001$; Fig. 3E). Thus, acute alcohol exposure can directly interact with cultured neonatal endothelial cells to inhibit glutamate-induced activation.

3.4. *In utero* alcohol exposure exacerbates glutamate-induced activation of neonatal endothelial cells

The inhibitory effect of alcohol on glutamate-induced $[Ca^{2+}]_i$ activation in dissociated endothelial cells is consistent with findings from previous studies on other cultured cell types, including neurons (Lovinger et al., 1989; Zhao et al., 2015). However, to transpose these *in vitro* data into more integrated models, we investigated the effect of *in utero* alcohol exposure on glutamate-induced neonatal endothelial cell activation (Fig. 4). Cortical slices were labelled using FURA-2 (calcium probe) and isolectin-TRITC to quantify $[Ca^{2+}]_i$ in both nerve and endothelial cells from the superficial cortical layers (Fig. 4A–C). In the nerve cells (isolectin-negative), glutamate perfusion (100 μ M) increased the $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4D). In contrast to what observed in the dissociated cells, *in utero* alcohol exposure exacerbated the effect of glutamate on $[Ca^{2+}]_i$ ($p < 0.01$; Fig. 4D, E). Similarly, $[Ca^{2+}]_i$ quantification of endothelial cells (isolectin-TRITC-positive) revealed that glutamate exacerbated the effects in animals previously exposed to alcohol *in utero* ($p < 0.05$; Fig. 4F, G). Thus, alcohol impaired the glutamate-induced activation of neonatal endothelial cells in the developing cortex and evidenced differential effects of alcohol dependent on the experimental model used (i.e., acute *in vitro* administration or *in vivo* exposure during fetal life).

3.5. *In utero* alcohol exposure exacerbates both NMDA-R subunit expression and endothelial MMP-9 activity

To clarify the effect of *in utero* alcohol exposure on glutamate-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization, we performed Western blot experiments targeting several NMDA-R subunits in the cortical extracts from the control and *in utero* alcohol-exposed neonates (Fig. 5A–C). The GluN1 subunit was significantly overexpressed in the cortex of neonates exposed to alcohol *in utero* from GD15–GD20, ($p < 0.01$; Fig. 5A). The GluN2A and GluN2B subunits were also increased but not significantly (Fig. 5B, C).

Alcohol-induced GluN1 overexpression may explain the exacerbated effect of glutamate on $[Ca^{2+}]_i$ mobilization observed in both nerve and endothelial cells. To focus on endothelial activity, we quantified the effect of glutamate on *in utero* alcohol-exposed neonates by *in situ* zymography (Fig. 5D). Kinetics analysis showed that in the cortical microvessels, 100 μ M glutamate significantly increased the MMP-9-like activity in both control (Fig. 5D; upper panel) and *in utero* alcohol-exposed neonates (Fig. 5D; lower panel). However, the stimulatory effect of 100 μ M glutamate on the MMP-9-like activity was much more important in the P2 cortical slices from the *in utero* alcohol-exposed neonates ($p < 0.001$; Fig. 5E). Conversely, basal MMP-9 activities did not differ between the control and *in utero* alcohol-exposed neonates. Thus, 5 days of *in utero* alcohol exposure induced both an adaptive overexpression of the NMDA-R subunits in the fetal cortex and an exacerbation of the glutamate-evoked MMP-9 endothelial activity.

3.6. *In utero* alcohol exposure impairs the positioning and density of cortical Gad67-GFP interneurons in the developing mouse cortex

Because GABAergic interneurons migrating from the superficial marginal zone preferentially populate the cortical superficial layers (Miyoshi and Fishell, 2011), we investigated the effect of *in utero*

alcohol exposure on Gad67-GFP interneuron positioning using FVB-Tg (GadGFP)45704Swm transgenic mice. Actually, Oliva and colleagues previously reported that these interneurons were preferentially located in cortical layers II–IV (Oliva et al., 2000; Fig. 6A–C). As Nunez and McCarthy reported that the GABAergic system may mature differently between sexes during perinatal life, we considered females and males separately (Fig. 6D; Nunez and McCarthy, 2007). Although the effects of alcohol appear to be more pronounced in males, no sex-related differences were observed, and data were consequently collapsed. Morphometric analyses indicated that at P15, a developmental stage at which Gad67-GFP neuron positioning in the superficial cortical layers is almost achieved (Southwell et al., 2012), *in utero* alcohol exposure induced a significant increase in Gad67-GFP interneuron density ($+18.4\% \pm 3.9$; $p < 0.05$; Fig. 6B–D) with a mispositioning imbalanced towards layer IV (Fig. 6B, C). Western blot assays supported histological data and showed increased eGFP protein expression in cortical extracts from the alcohol-exposed neonates ($p < 0.01$; Fig. 6E). Western blots performed using two cell markers of the GABAergic lineage, Dlx1 and somatostatin (Sst; Fig. 6F, G), revealed that *in utero* alcohol exposure significantly increased Dlx1 expression ($p < 0.05$; Fig. 6F), while Sst expression decreased without reaching significance (Fig. 6G). As dendritic spine morphology may be an indicator of ongoing neuronal differentiation (Bourne and Harris, 2008), we also investigated the effects of *in utero* alcohol exposure on this parameter (Fig. 6H, I). Visualization and quantification of different spine subtypes showed that *in utero* alcohol exposure did not modify the distribution of filipodia, stubbies or mushrooms (Fig. 6H) but significantly increased the spine density ($p < 0.01$; Fig. 6I).

3.7. *In utero* alcohol exposure alters the density and positioning of cortical calretinin interneurons in the fetal human cortex

In the FAS brain, frontal cortex calretinin immunohistochemistry revealed two major types of lesions compared with the age-matched control brains (Fig. 7A,B; Supplementary Fig. 5). First, the distribution of cortical interneurons was drastically impaired. In the control brain, calretinin-positive interneurons were mainly located in layers II and III (Fig. 7A; arrows), whereas the FAS brain contained few immunoreactive cells in these layers (Fig. 7B; arrows). Conversely, numerous calretinin-positive neurons were detected in the deepest part of layer III and in deepest layers (Fig. 7B; arrows). Quantitative analysis of interneuron density in the whole cortical plate confirmed that the calretinin-positive interneuron density was drastically decreased in the superficial layers II and III and increased in deepest layers (Fig. 7C). Second, the calretinin-positive cell density was globally unchanged in all layers taken together (Fig. 7D). A chi-square comparison of the intrinsic distribution of calretinin-positive cells in the cortex of the FAS case showed that this patient significantly differed ($\chi^2 = 32.19$, df 5, $p < 0.0001$) from the control brains (Fig. 7E).

4. Discussion

The present study revealed the following results. i) Ethanol directly inhibited glutamate-induced calcium mobilization in dissociated neonatal endothelial cells, ii) In cultured cortical slices from mouse neonates, the effect of alcohol on MMP-9 and tPA was closely associated with pial microvessels bordering the superficial marginal zone, iii) The effect of alcohol on endothelial MMP-9 is dependent of the endothelial NMDA receptor, iv) In contrast to *in vitro* experiments, *in utero* alcohol exposure exacerbated glutamate-induced MMP-9 activation along these microvessels, v) *In utero* alcohol exposure induced an overexpression of NMDA-R subunits in the developing cortex, and vi) These functional and molecular effects of *in utero* alcohol exposure were associated with mispositioning of interneurons populating the superficial cortical layers in both mouse and human neonates/fetuses. Highlights have been synthesized in a graphical abstract (Fig. 8).

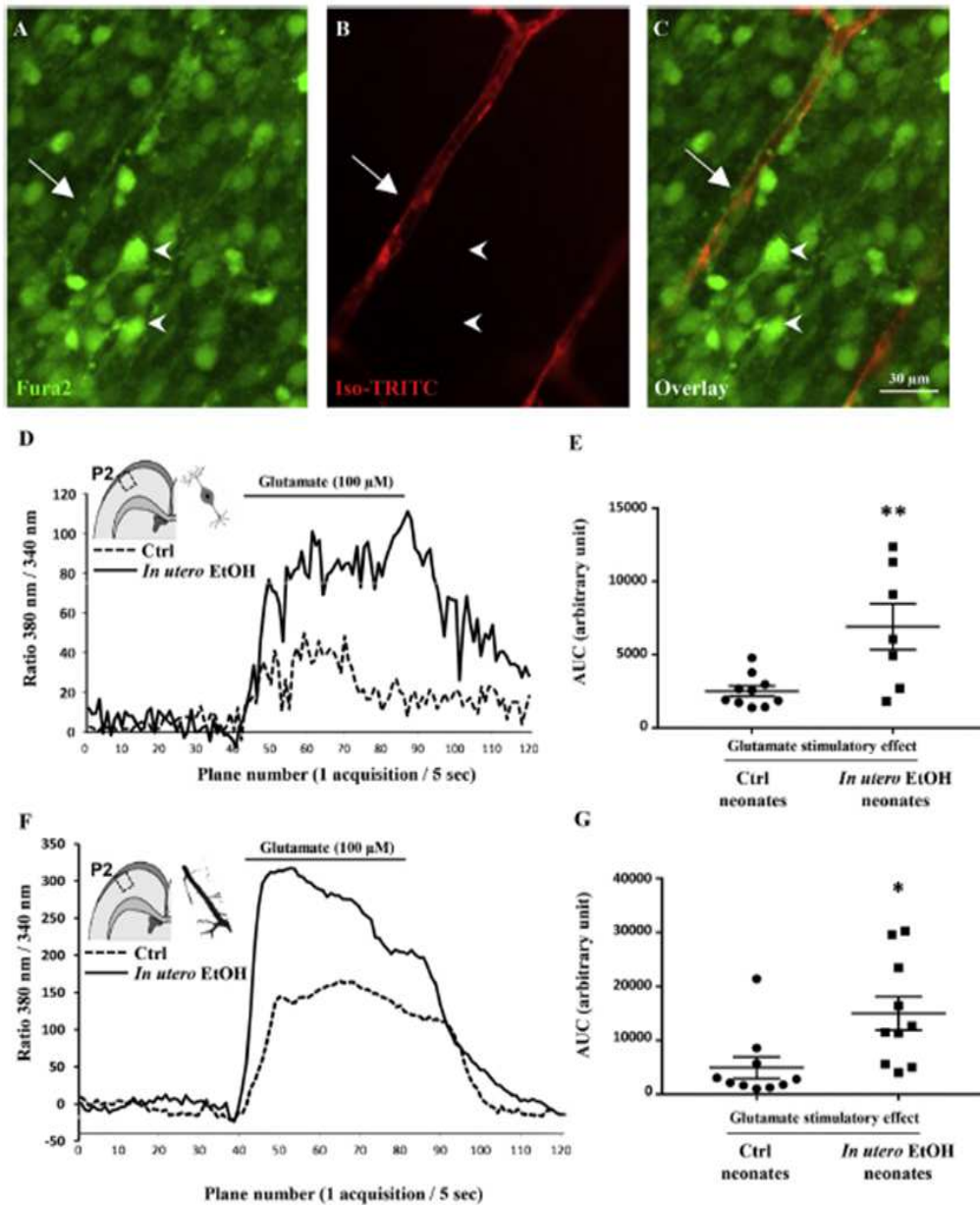


Fig. 4. Effects of glutamate on intracellular calcium mobilization in nervous and endothelial cells on cortical slices from P2 *in utero* alcohol-exposed neonates. **A:** Fura2-loaded nervous (arrow heads) and endothelial (arrows) cells. **B:** Endothelial cells labeled with isolectin-TRITC in cortical radial microvessels. **C:** Overlay of isolectin-TRITC-positive endothelial cells loaded with the Fura2 probe (arrow). Nervous cells negative for isolectin-TRITC. **D:** Effect of glutamate (100 μ M) on intracellular calcium mobilization in nervous cells from P2 control and *in utero* alcohol-exposed neonates quantified in the superficial cortical layers of cultured brain slices (graphical insert). In the “Ethanol” group, pregnant mice received a daily injection of alcohol (3 g/kg) from GD15–GD20. **E:** Statistical analysis of the effect of glutamate (100 μ M) on intracellular calcium mobilization in nervous cells from P2 cortical slices of control and *in utero* alcohol-exposed neonates. *In utero* alcohol exposure exacerbated glutamate-induced calcium mobilization. AUC: area under the curve. **F:** Effect of glutamate (100 μ M) on intracellular calcium mobilization in endothelial cells from P2 cortical slices of control and *in utero* alcohol-exposed neonates quantified in both tangential pial microvessels and radial microvessels from the superficial cortical layers (graphical insert). **G:** Statistical analysis of the effect of glutamate (100 μ M) on intracellular calcium mobilization in endothelial cells from P2 cortical slices of control and *in utero* alcohol-exposed neonates. *In utero* alcohol exposure exacerbated glutamate-induced calcium mobilization. AUC: area under the curve. For calcimetry experiments, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control using an unpaired *t*-test. Details of the statistical analysis are provided in Table 2.

In utero alcohol exposure has damaging effects on brain development and can lead to behavioral and cognitive disabilities (Riley et al., 2011; Bakoyiannis et al., 2014). Unsurprisingly, most studies of the mechanisms involved have focused on nervous cells and have reported

that alcohol alters neural tube formation (Haghighi Poodeh et al., 2014), neurogenesis (Rubert et al., 2006), cell migration (Shenoda, 2017), apoptosis (Ikonomidou et al., 2000), astroglialogenesis (Vemuri and Chetty, 2005) and myelination (Cao et al., 2014). Furthermore,

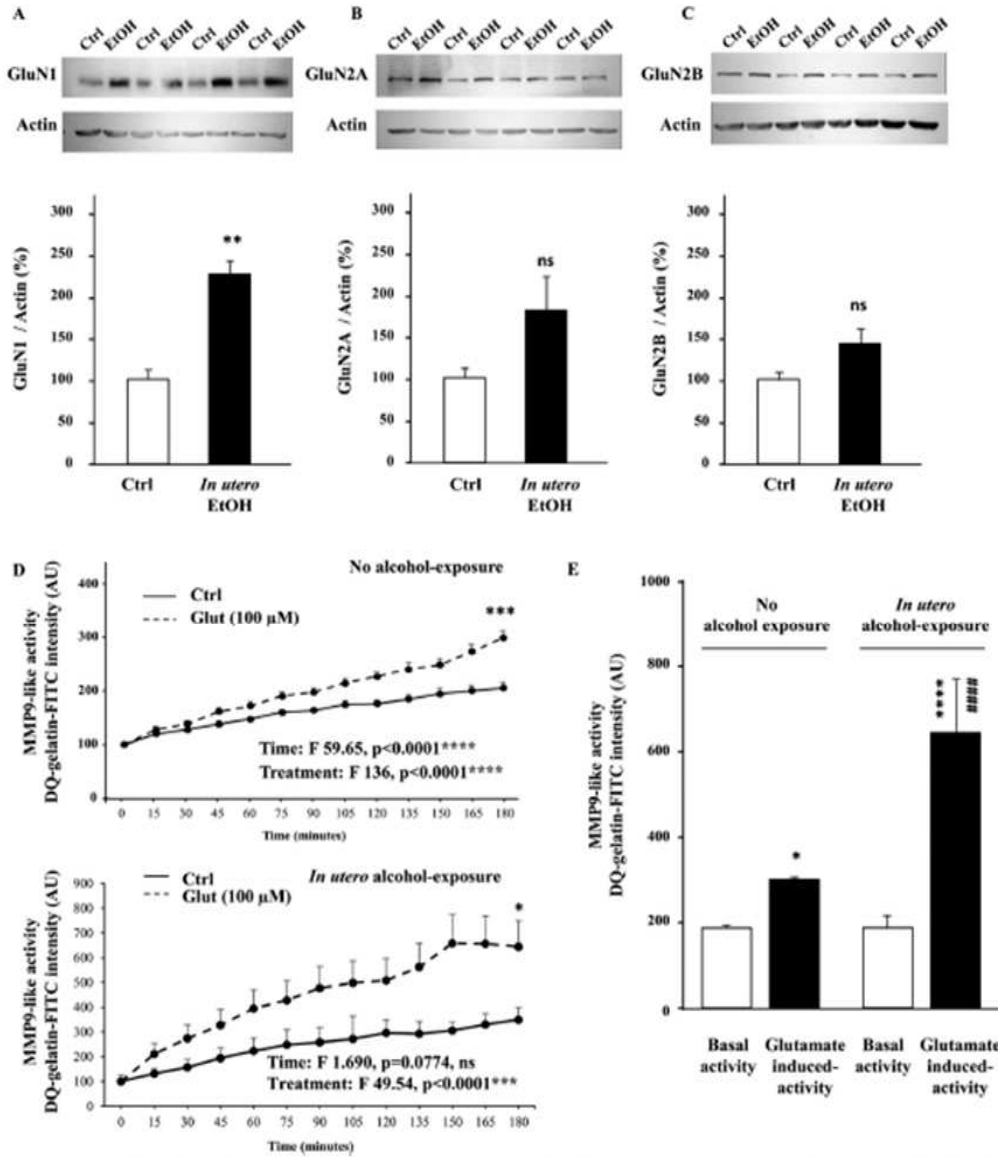


Fig. 5. Effects of *in utero* alcohol exposure on expression of cortical NMDA-R subunits and endothelial calcium mobilization. **A–C:** Western blot quantified the effect of *in utero* alcohol exposure on cortical expressions of GluN1 (A), GluN2A (B) and GluN2B (C) subunits in microdissected cortices from P2 neonates. **D:** *In situ* zymography quantification of the effect of glutamate (100 μM) on endothelial MMP9-like activity in microvessels from the pial migratory route in the control (upper panel) and *in utero* alcohol-exposed (lower panel) neonates. **E:** Statistical analysis of a 3-h treatment of P2 cortical slices to glutamate (100 μM) on endothelial MMP9-like activity in control (no alcohol exposure during pregnancy) and *in utero* alcohol-exposed mice. For the Western blot assays, ***p* < 0.01 vs. control using an unpaired *t*-test. For kinetics analysis via *in situ* zymography, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test, **p* < 0.05; ****p* < 0.001 vs. control. MMP-9 activity was compared between the four groups via one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. **p* < 0.05; *****p* < 0.0001 vs. basal activity; ####*p* < 0.0001 vs. glutamate from neonates unexposed to alcohol during pregnancy. Details of the statistical analysis are provided in Table 2.

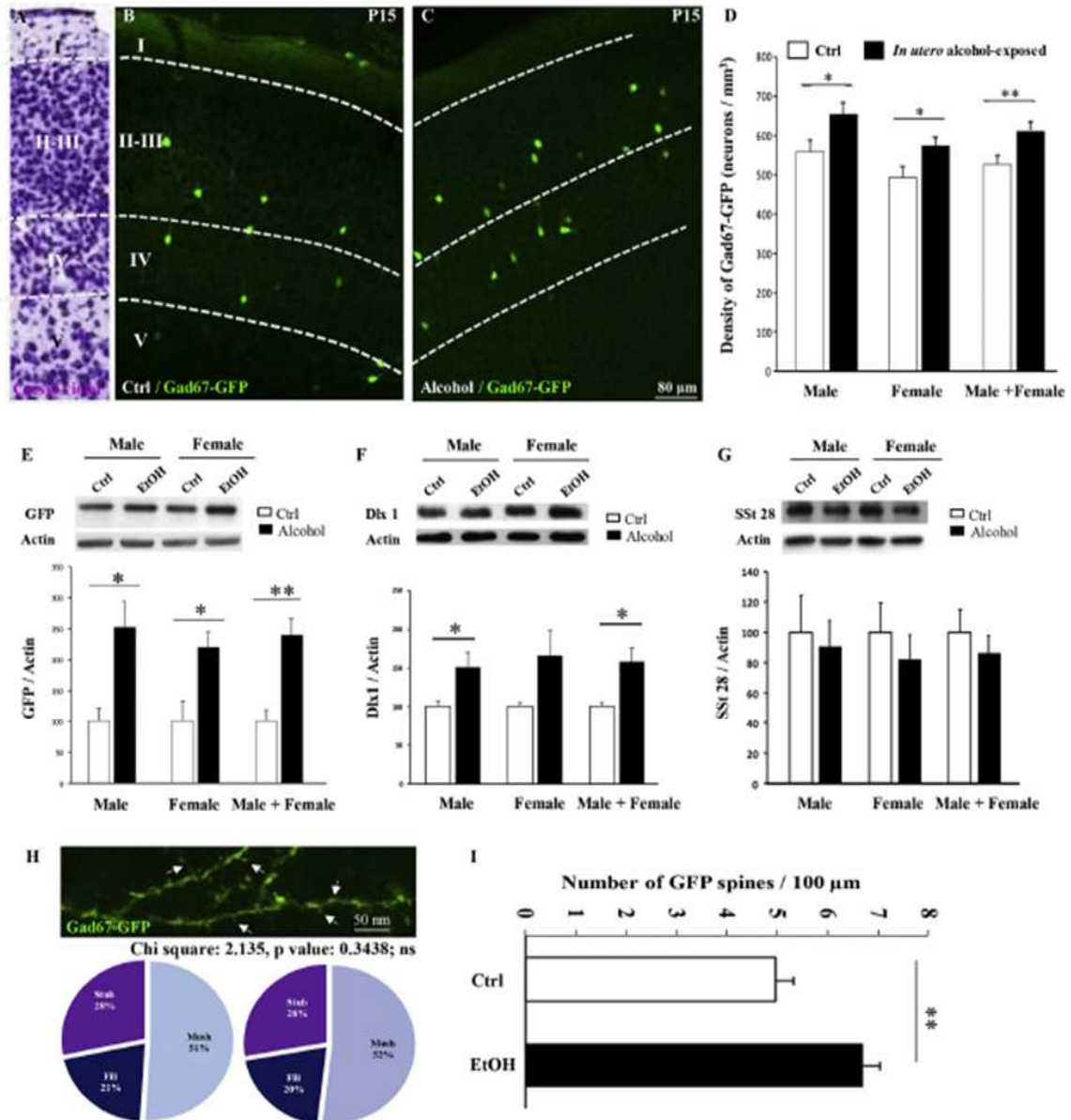


Fig. 6. Effects of *in utero* alcohol exposure on Gad67-GFP interneuron positioning and morphometric characteristics. **A–C**: Nissl-stained section indicating the superficial cortical layers in a developing mouse brain at P15 (**A**); positioning of Gad67-GFP neurons in the superficial cortical layers of the control (**B**) and *in utero* alcohol-exposed mice. Alcohol increased the GFP-positive cell density in layer IV. **D**: Quantification of the effect of *in utero* alcohol exposure on the density of Gad67-GFP neurons populating superficial cortical layer IV in P15 neonates. **E–G**: Western blot quantification of GFP (**E**), Dlx-1 (**F**) and SST (**G**) protein levels in microdissected cortices from P15 neonates exposed (EtOH) or not (Ctrl) to alcohol during gestation. **H, I**: Distribution of spine subtypes (**H**) and quantification of spine density (**I**) in superficial cortical layers from P15 neonates exposed or not to alcohol during gestation. Morphometric analysis was performed after confocal acquisition. For density analyses and western blots, **p* < 0.05; ***p* < 0.01 vs. control using an unpaired *t*-test. For spine distribution, chi-square analysis, ns: not significant. Details of the statistical analysis are provided in Table 2.

postmortem histopathological studies revealed impaired cortical layering associated with altered neuronal and glial cell positioning (de la Monte and Kril, 2014). More recent studies have revealed that brain microvessels are major contributors in controlling migration and positioning of GABAergic interneurons (Won et al., 2013) and

oligodendrocytes (Tsai et al., 2016). Alcohol has been shown to impair cortical angiogenesis in fetal brains in both animal models and humans (Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017). Recent studies have shown that neonatal endothelial cells from the pial microvessels express functional NMDA receptors (Léger et al., 2020). Glutamate controls

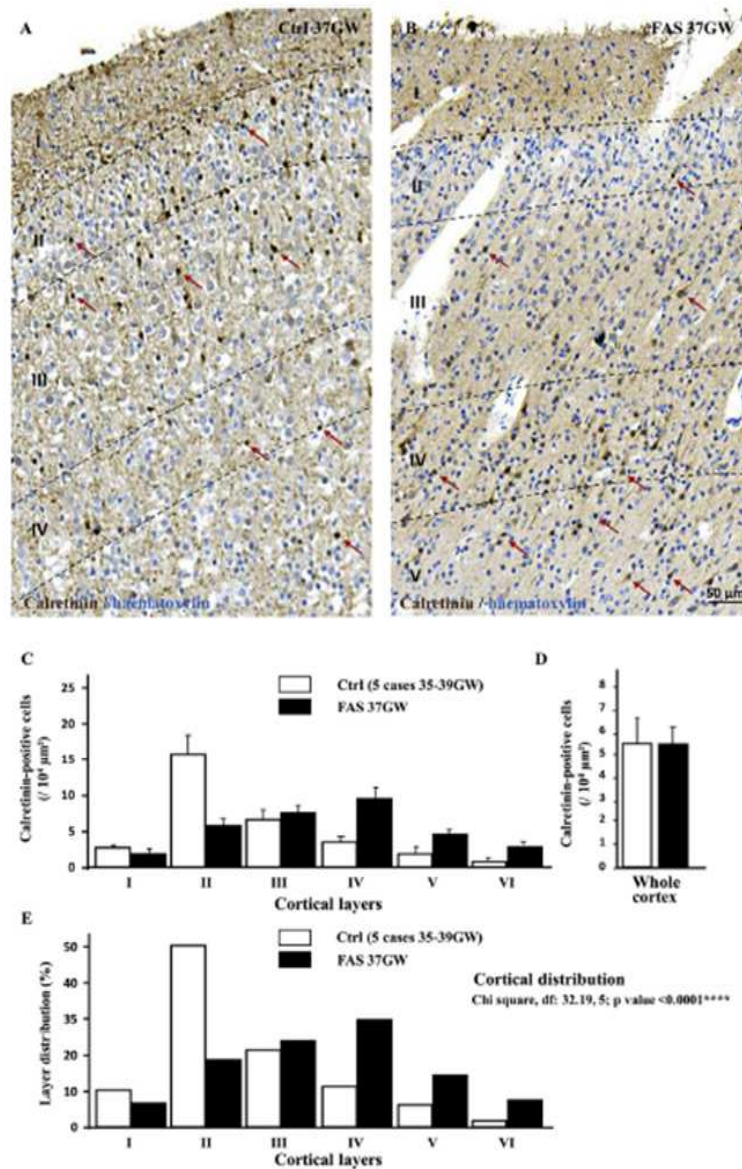


Fig. 7. Effect of *in utero* alcohol exposure on the density and positioning of GABAergic calretinin-positive interneurons in the human cortex. **A, B:** Visualization of the positioning of calretinin-immunoreactive interneurons in the neocortex of 37WG control (A) and FAS (B) fetuses. Note that in the control fetus, immunoreactive cells (red arrows) are mainly located in layers II and III while in the 37WG FAS fetal brain, numerous immunoreactive cells are present in layers IV and V (red arrows). **C:** Quantification of the calretinin-positive cell density in cortical layers I–VI from five control fetuses (35–39GW; Table 1) and a 37GW FAS case. **D:** Calretinin-positive cell density was quantified in the whole cortical layers of the five 37WG control and the FAS fetal brain. **E:** Intrinsic distributions of calretinin-positive cells were compared in cortical layers I–VI from five control fetuses (35–39GW; Table 1) and a 37GW FAS case. Chi-square analysis indicated that the cortical distributions significantly differed between the control group (5 cases) and the FAS case. Details of the statistical analysis are provided in Table 2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

endothelial MMP-9 and tPA activity under NMDA-R activation (Léger et al., 2020). Since ethanol is a NMDA antagonist (Zhao et al., 2015), and MMP-9 is required for correct neuronal migration (Vaillant et al., 2003), we investigated the effects of alcohol on endothelial MMP-9 activity along pial microvessels to clarify the not yet determined mechanisms sustaining the GABA interneuron mispositioning described in FAS neonates.

4.1. Effects of acute alcohol treatment on intracellular calcium mobilization in dissociated neonatal endothelial cells

Alcohol toxicity during neurodevelopment is a complex process resulting from indirect and direct actions on lipid membranes (Yalcin

et al., 2017), metabolite-induced effects (Matsushita and Higuchi, 2017), and altered neurotransmission. Ethanol is an NMDA-R antagonist (Zhao et al., 2015) and GABA-receptor agonist (Chandler et al., 2018). Previous studies have demonstrated that neonatal endothelial cells express functional NMDA-R, suggesting that alcohol could directly affect their activity (Legros et al., 2009). Immunohistochemistry confirmed GluN1 subunit expression in cortical microvessels and in dissociated neonatal endothelial cells, and glutamate significantly increased intracellular calcium mobilization. Co-administering alcohol significantly reduced the effect of glutamate, giving a first evidence that alcohol directly interacts with cortical neonatal endothelial cells to impair glutamate-evoked activity.

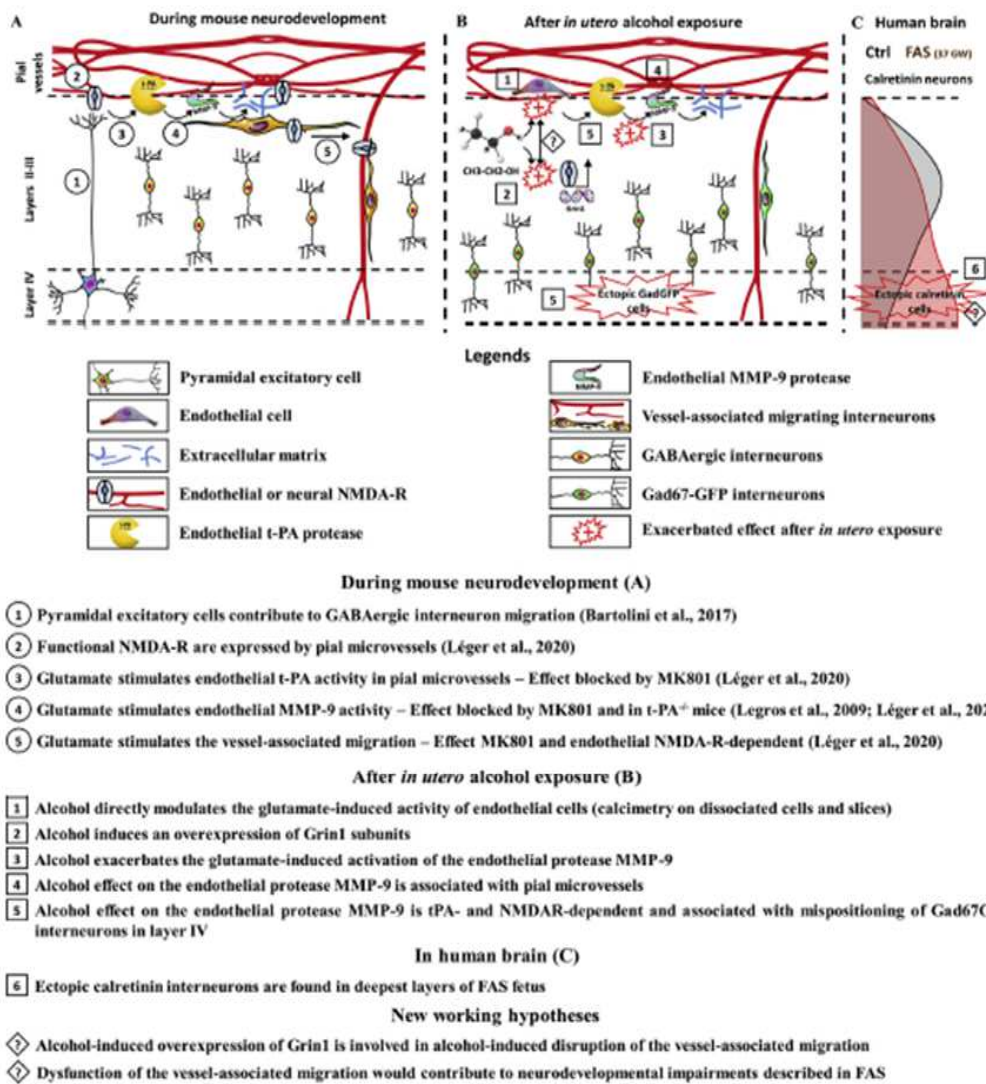


Fig. 8. Graphical abstract integrating neurodevelopmental data from the literature on the vessel-associated migration of GABA interneurons in the superficial marginal zone and highlights from the present study in a context of *in utero* alcohol exposure. Data from the literature (A) and highlights (B, C) are symbolized into the graph by circled and squared numbers, respectively. Each symbol is indicative of a research milestone described in the graph legend. Question marks indicate new working hypotheses.

4.2. Effects of acute alcohol exposure on endothelial protease activation in cortical slices

During neurodevelopment, glutamate controls endothelial MMP-9 and tPA activation in pial microvessels through an NMDA-R-dependent mechanism (Léger et al., 2020). Previous studies have shown that these two proteases are major contributors in controlling physiological (Ould-Yahoui et al., 2013; Pasquet et al., 2019) and pathological (Yeh et al., 2016) cell migration by degrading the extracellular matrix. We performed gel and *in situ* zymographies to test how alcohol affects MMP-9 and tPA activity along the pial microvessels. Previous gel zymographies confirmed that glutamate significantly increased MMP-9 and tPA activity in extracts of microdissected cortices from mouse neonates (Léger et al., 2020). The present data also revealed that acute ethanol

incubation significantly reduced the effect of glutamate on MMP-9 and tPA activities. In addition, *in situ* zymography experiments performed on organotypic slices revealed that both the MMP-9 and tPA-like activities closely overlapped tangential pial and radial cortical microvessels. Interestingly, the effects of glutamate and alcohol on MMP-9 activity were abrogated in tPA-knockout mice and in Grin1^{lox}/Ve-Cad^{Cre} mice, reinforcing the functional link associating endothelial NMDA receptor, MMP-9, tPA and alcohol (Zhao et al., 2004; Omouendze et al., 2013). In agreement with these results, Noel et al. (2011) found that tPA is required for FAS development in mice and a recent study from Guizzetti's group reported that *in vivo* alcohol exposure increased tPA expression (*plac* gene) and activity in the developing brain (Wülfelm et al., 2018). Meanwhile the endothelial NMDA receptor constitutes a molecular target of ethanol (Zhao et al., 2015)

and seems to play a pivotal role on the alcohol-induced microvessel dysfunction, ethanol also interacts with several cellular and molecular processes (Ehrhart et al., 2019) suggesting that the NMDA receptor probably contributes only for a part on the wider pathophysiological effects of alcohol on brain development. Altogether, these data constitute the first evidence that alcohol exposure alters the MMP-9 activity along pial microvessels through a tPA and endothelial NMDA receptor-dependent mechanism.

4.3. Distinct effects of *in vitro* and *in vivo* alcohol exposure on endothelial cell activity

In vitro experiments showed that glutamate interacts with neonatal microvessels and dissociated endothelial cells and that ethanol is able to block its effects. To transpose *in vivo* the effects of alcohol observed *in vitro* on endothelial activity, we used an *in utero* alcohol-exposure protocol (Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017). Both *in vitro* and *in vivo* data clearly showed that *in utero* alcohol exposure impaired the endothelial activity of microvessels along the vessel-associated migration route of the GABAergic interneurons. However, the alcohol-induced endothelial dysfunction was differently evidenced between *in vitro* and *in vivo* models. While *in vitro*, ethanol inhibited the glutamate-induced activation of MMP-9, the effect of glutamate was exacerbated in neonates previously exposed *in utero* to alcohol. Similar effects of alcohol were also reported on neuronal cells (Baculis et al., 2015; Nimitvilai et al., 2017). For example, a study showed that in contrast to acute treatment, chronic *in utero* ethanol exposure enhanced cortical neuron excitability (Nimitvilai et al., 2017). Western blot experiments targeting the NMDA-R, revealed that *in utero* alcohol exposure resulted in marked overexpression of the GluN1 subunit. In line with these data, Xiang et al. (2015) found that exposing human embryonic stem cell-derived cortical neurons to ethanol for 7 days highly upregulated the expression of genes encoding four NMDA-R subunits: Grin1, Grin2A, Grin2B and Grin2D. The diversity of murine models for the study of FASD, their respective advantages and disadvantages have been recently reviewed (Almeida et al., 2020).

Altogether, these results were the first to demonstrate that *in utero* alcohol exposure induces endothelial dysfunction in pial microvessels, resulting in exacerbated endothelial MMP-9 activity. Because migrating GABAergic interneurons and cortical microvessels share functional interactions (Li et al., 2013; Won et al., 2013; Léger et al., 2020), we investigated the effects of *in utero* alcohol exposure on the positioning of GABA interneurons migrating along the superficial marginal zone.

4.4. *In utero* alcohol exposure impaired the positioning of GABAergic interneurons populating the superficial cortical layers

To determine whether the effects of *in utero* alcohol exposure on endothelial protease dysfunction along pial microvessels were associated with impaired neuronal migration, we analyzed in FVB-Tg (GadGFP)45704Sw transgenic mice the location and density of GFP-expressing interneurons which have shown to preferentially populate the superficial cortical layers by migrating along the superficial marginal zone through an endothelial NMDA-dependent mechanism (Oliva et al., 2000; Léger et al., 2020). Morphometric analyses revealed that in alcohol-exposed mouse neonates, both Gad67-GFP cell density in layer IV and the spine densities were increased. In recent studies, it has been shown that i) MK801, an NMDA-R antagonist, inhibits the vessel-associated migration of GABA interneurons along the superficial marginal zone (Léger et al., 2020), ii) *in utero* exposure of neonates to GM6001, a large-spectrum metalloproteinase inhibitor, decreased Gad67-GFP neuronal densities in cortical layers II–IV (Léger et al., 2020), and iii) in Grin1^{fllox}/VeCad^{Cre} mice, invalidating endothelial NMDA-R induced a lack of interneurons in the superficial cortical layers (Léger et al., 2020). Thus, the present results support that the exacerbated effect of *in utero* alcohol exposure on both NMDA-R subunit expression and

endothelial MMP-9 activation contributed to the GABA interneuron mispositioning in the cortical layers of mouse neonates. In agreement, Skorput et al. (2015) showed that *in utero* alcohol exposure increased the cortical density of Nkx2/ Tomato-fluorescent interneurons originating from the medial ganglionic eminences while Cuzon and co-workers showed that alcohol promoted premature migration of primordial GABAergic interneurons (Cuzon et al., 2008). In addition, comparing the distribution profiles of calretinin-positive interneurons between a control case and a 37WG alcohol-exposed human brain, we also identified a mispositioning of interneurons which are normally located within the superficial cortical layers with an increased density in the deepest layers IV–V. In contrast, experiments performed regarding caspase-3 activation didn't revealed, at the dose which induced endothelial dysfunction, a significant effect of alcohol on apoptosis (Supplementary Fig. 3).

In conclusion, it is now well recognized that alcohol consumption during pregnancy can lead to neurodevelopmental defects. However, most of the studies on the effects of *in utero* alcohol exposure have focused on nerve cells. We had previously shown that alcohol consumption during pregnancy can impair brain vasculature in both mouse and human fetuses. The present study provides new mechanistic and functional evidence that alcohol alters cortical endothelial cell activity in mouse neonates. *In vivo*, these effects include exacerbated glutamate-induced activation of the endothelial protease MMP-9 from pial microvessels and mispositioned interneurons arising from the superficial marginal zone. These data support that a microvessel integrity is required for adequate location of cortical neuron populations and provide new insights into an unexplored neurovascular mechanism of alcohol-induced impairments on brain development in FAS.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105074>.

Acknowledgments

This work was supported by the Rouen University, the Normandy University, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM; UMR1245), the Fondation de France, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Fondation pour la Recherche en Alcoolologie, the Fondation Paralysie Cérébrale, the Conseil Régional de Normandie, the Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN) and the Fonds Européens de Développement Régional. CL was a recipient of a fellowship from the Région Normandie.

The following are the supplementary data related to this article.

References

- Aligny, C., Roux, C., Dourmap, N., Ramdani, Y., Do-Rego, J.C., Jégou, S., Leroux, P., Leroux-Nicollet, I., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2014. Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. *Cell Death Dis.* 5, e1311.
- Almeida, L., Andreu-Fernández, V., Navarro-Tapia, E., Aras-López, R., Serra-Delgado, M., Martínez, L., García-Algar, O., Gómez-Rotg, M.D., 2020. Murine models for the study of fetal alcohol spectrum disorders: An overview. *Front. Pediatr.* 8, 359.
- Andreu-Fernández, V., Bastons-Gomptis, A., Navarro-Tapia, E., Sailer, S., García-Algar, O., 2019. Serum concentrations of IGF-1/IGF-II as biomarkers of alcohol damage during foetal development and diagnostic markers of Fetal Alcohol Syndrome. *Sci. Rep.* 9, 1562.
- Ayoub, A.E., Cai, T.Q., Kaplan, R.A., Luo, J., 2005. Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 481, 403–415.
- Baculis, B.C., Diaz, M.R., Valenzuela, C.F., 2015. Third trimester-equivalent ethanol exposure increases anxiety-like behavior and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 137, 78–85.
- Bakoyannis, I., Gkioka, E., Pergialiotis, V., Mastroleon, I., Prodromidou, A., Vlachos, G.D., Perrea, D., 2014. Fetal alcohol spectrum disorders and cognitive functions of young children. *Rev. Neurosci.* 25, 631–639.
- Bartolini, G., Sánchez-Alicáiz, J.A., Odóro, C., Valente, M., García-Frigola, C., Marín, O., 2017. Neuregulin 3 mediates cortical plate invasion and laminar allocation of GABAergic interneurons. *Cell Rep.* 18, 1157–1170.
- Bourne, J.N., Harris, K.M., 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47–67.

- Cao, W., Li, W., Han, H., O'Leary-Moore, S.K., Sulik, K.K., Allan Johnson, G., Liu, G., 2014. Prenatal alcohol exposure reduces magnetic susceptibility contrast and anisotropy in the white matter of mouse brains. *NeuroImage* 102 (Pt 2), 748–755.
- Carmeliet, P., Kleckers, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Gollen, D., Mulligan, R.C., 1993. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J. Clin. Invest.* 92, 2746–2755.
- Chandler, C.M., Overton, J.S., Rödel-Betsch, D., Platt, D.M., 2018. GABA_A receptor subtype mechanisms and the abuse-related effects of ethanol: Genetic and pharmacological evidence. *Handb. Exp. Pharmacol.* 248, 3–27.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Yanagawa, Y., Ohata, K., Yeh, H.H., 2008. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J. Neurosci.* 28, 1854–1864.
- de la Monte, S.M., Kri, J.J., 2014. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 127, 71–90.
- Ehrhart, F., Roozén, S., Verbeek, J., Koek, G., Kok, G., van Kranen, H., Evelo, C.T., Curfs, L.M.G., 2019. Review and gap analysis: Molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* 24, 10–17.
- Feess-Higgins, A., Larroche, J.C., 1987. In: Masson Paris (Ed.), *Development of the Human Fetal Brain: Anatomical Atlas*.
- Giraudo, V., Gilard, V., Marguet, F., Lesueur, C., Hauchecorne, M., Ramdani, Y., Laquerrière, A., Marret, S., Jégou, S., Gonzalez, B.J., 2017. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis.* 8, e2610.
- Guthard-Costa, A.M., Larroche, J.C., 1990. Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. *Early Hum. Dev.* 23, 27–40.
- Guthard-Costa, A.M., Ménez, F., Delzot, A.L., 2002. Organ weights in human fetuses after formalin fixation: Standards by gestational age and body weight. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5, 559–578.
- Haghighi Poodeh, S., Ahonen, I., Salonen, M., Savolainen, M.J., 2014. Ethanol-induced impairment of polyamine homeostasis – A potential cause of neural tube defect and intrauterine growth restriction in fetal alcohol syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 173–178.
- Henry, V.J., Lecointre, M., Laudenbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., Berezowski, V., Carmeliet, P., Vivien, D., Marret, S., Gonzalez, B.J., Leroux, P., 2013. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiol. Dis.* 50, 201–208.
- Ikonomidou, C., Bittigou, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, G., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hötter, F., Tenkova, T., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
- Inada, H., Watanabe, M., Uchida, T., Ishihashi, H., Wake, H., Nemoto, T., Yanagawa, Y., Fukuda, A., Nabekura, J., 2011. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PLoS One* 6, e27048.
- Jégou, S., El Ghazi, F., de Lencó, P.K., Marret, S., Laudenbach, V., Uguen, A., Marcocelles, P., Roy, V., Laquerrière, A., Gonzalez, B.J., 2012. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann. Neurol.* 72, 952–960.
- Jones, K.L., Smith, D.W., 1973. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet Lond. Engl.* 302, 999–1001.
- Kerp, E.R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D.J., Hyttia, P., Dawe, G.S., 2015. Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004.
- Lesueur, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcocelles, P., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2017. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 44.
- Léger, C., Dupré, N., Aligny, C., Bénard, M., Lebon, A., Henry, V., Hauchecorne, M., Galas, L., Frebourg, T., Leroux, P., Vivien, D., Lecointre, M., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2020. Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03248-5>.
- Legros, H., launay, S., Rousset, B.D., Marcou-Labarre, A., Calbo, S., Cateau, J., Leroux, P., Boyer, O., Ali, C., Marret, S., 2009. Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1146–1158.
- Li, S., Haigh, K., Haigh, J.J., Vasudevan, A., 2013. Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. *J. Neurosci.* 33, 14809–14815.
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F., 1989. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243, 1721–1724.
- Luhmann, H.J., Fukuda, A., Kilb, W., 2015. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 4.
- Matsushita, S., Higuchi, S., 2017. Review: use of asian samples in genetic research of alcohol use disorders: Genetic variation of alcohol metabolizing enzymes and the effects of acetaldehyde. *Am. J. Addict.* 26, 469–476.
- Miyoshi, G., Fishell, G., 2011. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb. Cortex* 21, 845–852.
- Nimrivilat, S., Lopez, M.F., Mulholland, P.J., Woodward, J.J., 2017. Ethanol dependence abolishes monoamine and GIRK (Kir3) channel inhibition of orbitofrontal cortex excitability. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1800–1812.
- Neel, M., Norris, E.H., Strickland, S., 2011. Tissue plasminogen activator is required for the development of fetal alcohol syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5069–5074.
- Nuñez, J.L., McCarthy, M.M., 2007. Evidence for an extended duration of GABA-mediated excitation in the developing male versus female hippocampus. *Dev. Neurobiol.* 67, 1879–1890.
- Olive, A.A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., Swann, J.W., 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J. Neurosci.* 20, 3354–3368.
- Omeuendze, P.L., Henry, V.J., Porte, B., Dupré, N., Carmeliet, P., Gonzalez, B.J., Marret, S., Leroux, P., 2013. Hypoxia-ischemia or excitotoxin-induced tissue plasminogen activator-dependent gelatinase activation in mice neonate brain microvessels. *PLoS One* 8, e71263.
- Ould-Yahout, A., Sbat, O., Baranger, K., Bernard, A., Gueye, Y., Charraf, F., Clément, B., Gygnes, D., Dive, V., Girard, S.D., 2013. Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant.* 22, 993–1010.
- Pasquet, N., Doucrau, S., Navau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebovieur, L., Hommet, Y., Vivien, D., Bardou, I., 2019. Tissue-type plasminogen activator controlled corticogenesis through a mechanism dependent of NMDA receptors expressed on radial glial cells. *Cereb. Cortex* 29, 2482–2498.
- Riley, E.P., Infante, M.A., Warren, K.R., 2011. Fetal alcohol spectrum disorders: An overview. *Neuropsychol. Rev.* 21, 73–80.
- Rubert, G., Miñana, R., Pascual, M., Guert, C., 2006. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 84, 483–496.
- Shenoda, B.B., 2017. An overview of the mechanisms of abnormal GABAergic interneuronal cortical migration associated with prenatal ethanol exposure. *Neurochem. Res.* 42, 1279–1287.
- Skorput, A.G.J., Gupta, V.P., Yeh, P.W.L., Yeh, H.H., 2015. Persistent interneuronopathy in the prefrontal cortex of young adult offspring exposed to ethanol in utero. *J. Neurosci.* 35, 10977–10988.
- Southwell, D.G., Paredes, M.F., Galvao, R.P., Jones, D.J., Froemke, R.C., Sebe, J.Y., Alfaro-Cervello, G., Tang, Y., Garcia-Verdugo, J.M., Rubenstein, J.L., 2012. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491, 109–113.
- Tsai, H.H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A.-C., Kuo, G.J., Chan, J.R., Daneman, R., 2016. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379–384.
- Valliani, C., Meisstell, C., Muttin, M., Belin, M.-F., Lund, L.R., Thomasset, N., 2003. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 395–408.
- Vemuri, M.C., Chetty, C.S., 2005. Alcohol impairs astrocytogenesis by stem cells in rodent neurospheres. *Neurochem. Int.* 47, 129–135.
- Wang, G., Zhong, S., Zhang, S., Ma, Z., Chen, J., Lu, W., Cheng, X., Chuat, M., Lee, K.K.H., Lu, D., 2016. Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J. Appl. Toxicol.* JAT 36, 692–701.
- Wilhelm, C.J., Gutzetti, M., 2015. Fetal alcohol spectrum disorders: An overview from the glia perspective. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 65.
- Wilhelm, C.J., Hashimoto, J.G., Roberts, M.L., Zhang, X., Goeke, C.M., Bloom, S.H., Gutzetti, M., 2018. Plasminogen activator system homeostasis and its dysregulation by ethanol in astrocyte cultures and the developing brain. *Neuropharmacology* 138, 193–209.
- Won, C., Lin, Z., Kumar, T.P., Li, S., Ding, L., Elkhali, A., Szabó, G., Vasudevan, A., 2013. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat. Commun.* 4, 2149.
- Wozniak, J.R., Riley, E.P., Charness, M.E., 2019. Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. *Lancet Neurol.* 18, 760–770.
- Xiang, Y., Kim, K.-Y., Geleertier, J., Park, L.-H., Zhang, H., 2015. Ethanol upregulates NMDA receptor subunit gene expression in human embryonic stem cell-derived cortical neurons. *PLoS One* 10, e0134907.
- Xu, G., Broadbelt, K.G., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Belliveau, R.A., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., Kinney, H.C., 2011. Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 841–858.
- Yalcin, E.B., McLean, T., Tong, M., de la Monte, S.M., 2017. Progressive white matter atrophy with altered lipid profiles is partially reversed by short-term abstinence in an experimental model of alcohol-related neurodegeneration. *Alcohol Fayettev. N* 65, 51–62.
- Yeh, C.-M., Lin, C.-W., Yang, J.-S., Yang, W.-E., Su, S.-C., Yang, S.-F., 2016. Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. *Oncotarget* 7, 21952–21967.
- Zhao, B.Q., Ikeda, Y., Ihara, H., Urano, T., Fan, W., Mikawa, S., Suzuki, Y., Kondo, K., Sato, K., Nagai, N., Umemura, K., 2004. Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice. *Blood* 103, 2610–2616.
- Zhao, Y., Ren, H., Dwyer, D.S., Peoples, R.W., 2015. Different sites of alcohol action in the NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunits. *Neuropharmacology* 97, 240–250.