Impact d'une alcoolisation in utero sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes : étude translationnelle.

Melanie Brosolo

▶ **To cite this version:**

Melanie Brosolo. Impact d'une alcoolisation in utero sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes : étude translationnelle.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR035 . tel-03926073

HAL Id: tel-03926073
https://theses.hal.science/tel-03926073

Submitted on 6 Jan 2023

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 ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Impact d'une alcoolisation in utero sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes : étude translationnelle.

Présentée et soutenue par

Mélanie BROSOLO

Thèse soutenue le 05/05/2022 devant le jury composé de		
MME GERALDINE FAVRAIS	MAITRE DE CONFERENCES – PRATICIEN HOSPITALIER, INSERM UMR 1253, CHRU DE TOUR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. OLIVIER PIERREFICHE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, LABORATOIRE GRAP, UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE, AMIENS	Rapporteur du jury
MME ANNIE LAQUERRIERE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES – PRATICIEN HOSPITALIER, CHU DE ROUEN, UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE	Examinateur
MME PASCALE MARCORELLES	PROFESSEUR DES UNIVERSITES – PRATICIEN HOSPITALIER, CHU DE BREST, UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE	Examinateur
M. STEPHANE MARRET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES – PRATICIEN HOSPITALIER, CHU DE ROUEN, UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE	Examinateur
M. BRUNO GONZALEZ	DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM U1245, UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Bruno GONZALEZ, CANCER AND BRAIN GENOMICS

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Brain Cancer genomics

À Auguste,

Tu es ma plus belle aventure

Je commence naturellement ces remerciements par mon directeur de thèse, le **Dr Bruno Gonzalez**. Avant de postuler en thèse, un conseil m'a été donné : « avant de choisir son sujet, on choisit un directeur ». Mon choix fut excellent ! Scientifique aguerri et passionné, tu allies un encadrement calme et précis avec une touche d'humour à toute épreuve, car soyons honnêtes, « qu'est-ce qu'on rigole ! ». Alors, à toi qui parles mieux italien que moi : *grazie mille per tutti questi anni, per la tua pazienza, supporto e guida*.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le **Dr Maryline Lecointre** pour ton encadrement. Accompagnée par tes soins depuis maintenant 6 ans, de mon stage de licence à mon doctorat, nous avons au fil du temps trouvé notre équilibre. Toi qui m'as vue évoluer aussi bien professionnellement que personnellement, je suis honorée d'être ton premier encadrement de thèse, et je ne doute pas une seconde que les prochains seront tout aussi bien accompagnés.

Je remercie chaleureusement le **Dr Géraldine Favrais** et le **Pr Olivier Pierrefiche** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Aux **Prs Pascale Marcorelles**, **Annie Laquerrière** et **Stéphane Marret,** un grand merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury et de juger mes travaux de thèse.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi individuel, le **Pr Sophie Gil**, pour la bienveillance qui la caractérise, et le **Dr Vincent Lelièvre** pour sa vision éclairée sur la recherche et sur l'après thèse.

Que serait la science sans les collaborations !? Merci au **Pr Annie Laquerrière**, au **Dr Florent Marguet** et à **Damien Genty**, pour nos collaborations permettant d'illustrer le lien qui existe entre clinique et préclinique.

Comme le dit si bien Edouard Baer, « la vie, c'est avant tout des rencontres ». Travailler au sein de l'équipe 4 de l'unité U1245, m'aura alors permis de côtoyer bon nombre de belles âmes avec qui le travail d'équipe constitue la force de notre laboratoire de recherche.

Pour commencer : Bienvenue aux nouveaux venus, les **Drs Anthony Falluel**, **Delphine Burel** et **David Vaudry**, je vous souhaite de vous épanouir dans votre nouvelle équipe. Merci à **Michelle Hauchecorne** et **Céline Lesueur** (qui prend toujours le temps de passer nous revoir pour un repas ou un café), pour votre présence lors de mes débuts de thèse, et nos parties de cartes endiablées du midi. Je remercie également les **Drs Carole Brasse-Lagnel** et **Nathalie Dourmap** pour nos échanges lors des réunions d'équipe et en dehors.

Un grand merci également à nos derniers retraités en date, le **Dr Phillipe Leroux** et le **Pr Isabelle Leroux-Nicollet**, qui j'espère, profitent amplement de leur retraite bien méritée.

Je tiens également à remercier le **Dr Carine Cleren**, j'admire ton implication dans l'enseignement, et ton incroyable bienveillance et engagement à l'égard de tes doctorants. Enfin, merci à **François Janin**, ta discrétion et ta gentillesse sont sans égal, conserve ton humour qui fait mouche, c'est un réel plaisir de rire avec toi.

Acteurs essentiels d'un laboratoire, les étudiants en font un lieu d'échange et d'enthousiasme constant. Je tiens ainsi à remercier tous les étudiants de l'équipe 4, partis vers de nouvelles aventures ou encore présents. Merci à **Maëlle Fabre** pour ta joie de vivre, à **Mathilde Dubot** ma toute première stagiaire, et au **Dr Thibault Plouchard** pour ton incroyable gentillesse et ton sens de l'écoute. **Anaïs Leroy** dernière doctorante arrivée, je te souhaite de réaliser une bonne thèse et d'en apprécier chaque instant. Aux stagiaires de Master 2, **Cyann Larralde**, **Grégroire Mallet**, **Alexandre Béranger** *aka* Œil de lionceau et **Aurélien Debonne** *aka drama queen*, partager cette fin de thèse avec vous fut un réel plaisir, je vous souhaite une agréable fin de stage, et de belles choses pour la suite de vos aventures.

A mes anciens collègues doctorants, devenus depuis Docteurs, merci pour tout, de votre intégration à votre bienveillance. Merci au **Dr Cécile Léger** pour ta bonne humeur, et au **Dr Camille Sautreuil**, quel plaisir de te revoir parmi nous ! Je tiens également à remercier le **Dr Bérénice Le Dieu-Lugon** toujours prête à rendre service, tes expressions font encore trembler les murs du labo ! Enfin, un merci tout particulier au **Dr Nicolas Dupré**, un fol acolyte

de premier rang avec lequel les débats sont toujours passionnants, ton humour et ta capacité à rassembler ont marqué plus d'un étudiant.

Un immense merci aux copains : **Antoine**, **Ludo**, **Loys**, **Charlotte**, illustrant à la perfection qu'une rencontre sur les bancs de l'université peut donner naissance à de très belles amitiés. **Xavier** et **Hugo**, merci de supporter nos conversations à rallonge aux filles et à moi, votre patience n'a d'égal que votre bienveillance et votre humour.

Les filles *aka* les supers nanas *aka* mes comparses du bureau du 4ème. La thèse sans vous aurait été bien différente. Votre amitié m'est incontestablement précieuse. Alors un merci tout particulier au **Dr Marion Dumanoir** avec qui parcourir ses années de thèse fut synonyme de joie, merci pour ta confiance. A la prochaine docteure **Lou Legouez**, mon binôme diabolique (non, nous ne sommes pas addict au café !), ma cop's, merci d'être aussi farfelue que moi, je sais que nos questions existentielles sur la vie et nos brainstormings de 18h continueront bien au-delà de la thèse.

Avec tout mon amour, je remercie ma famille et ma belle-famille, soutien discret et constant pendant toute la durée de cette thèse. Merci à **mes parents**, vous qui croyez toujours en moi et qui, quelle que soit la situation, êtes présents à mes côtés. Merci à ma petite sœur, **Clara**, la petite ingénieure de la famille, toujours là pour me rassurer et me donner la force de croire en mes capacités. Enfin, mon grand chat **Eurêkat**, merci pour ton aide pendant l'écriture de ce manuscrit, je sais à quel point tu as apprécié t'installer sur le clavier de cet ordinateur pour partager tes multiples connaissances scientifiques.

Je finirais ces remerciements par mes plus fervents supporters, **David et Auguste**. L'amour que je vous porte, et la force que vous me donnez, ne seront jamais quantifiables. **David**, je ne saurais expliquer simplement l'importance de ton soutien tant il a été essentiel au cours de ces années de thèse comme sur ma vie en général. J'espère que tu es fier de moi. Alors candidement, merci d'être là.

Productions scientifiques

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures et des tables

Chapitre 1 – Introduction 1

I. Interactions neuro-vasculaires : les acteurs d'une communication physiologique essentielle ... 3

1. Développement précoce du système nerveux et mise en place du cortex cérébral 3

a. La différenciation du tube neural 3

b. Les grandes subdivisions de l'encéphale 6

c. La diversité cellulaire au sein du cortex cérébral 6

2. Mise en place de la population oligodendrocytaire 12

a. Fonctions principales des oligodendrocytes 12

b. Production des oligodendrocytes 13

c. Migration des oligodendrocytes 16

d. Prolifération et différenciation des oligodendrocytes 19

e. Myélinisation au sein du système nerveux central 23

f. Vulnérabilité et pathologies 30

g. Développement des oligodendrocytes : murin *versus* humain 30

3. Les acteurs de la vascularisation cérébrale 32

a. Mise en place du réseau vasculaire 32

b. Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse 34

c. Interactions neuro-vasculaires 37

d. La superfamille des VEGFs 39

i. VEGF-A 40

ii. VEGF-B, C, D, E et F 41

iii. Le PlGF 42

e. Récepteurs du VEGF et du PlGF 44

i. Généralités 44

ii. Organisation et rôle des VEGF-R1, -R2 et -R3 46

iii. Rôle des co-récepteurs 48

II. Alcoolisation *in utero* : Troubles associés et impacts sur le neurodéveloppement 49

1. Syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) et Troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) : Conséquences d'une consommation d'alcool au cours de la grossesse 49

a. Alcool et société 49

b. Historique d'un syndrome 50

c. Troubles associés à une alcoolisation maternelle 51

2. Influence de l'alcool sur le neurodéveloppement 54

a. Mécanismes d'action de l'alcool et vulnérabilité cérébrale 54

b. Impacts de l'alcoolisation fœtale sur les populations cérébrales 55

c. Impact de l'alcoolisation fœtale sur la vascularisation cérébrale 59

d. Le placenta : outil de diagnostic précoce des troubles du neurodéveloppement 60

Chapitre 2 – Hypothèse & Objectifs 61

Chapitre 3 – Matériels & Méthodes 65

I. Lignée de souris et hébergement 67

II. Traitement *in vivo* des mères gestantes et allaitantes 67

III. Evaluations comportementales 67

1. Evaluation des capacités sensorimotrices des souriceaux 67

2. Evaluation des capacités motrices chez la Souris à P15 et à P45 68

IV. Evaluation moléculaire du lignage oligodendrocytaire 69

1. Approche par Western blot 69

2. Approche par qRT-PCR 70

V. Evaluation histologique des oligodendrocytes 71

1. Immunohistochimie 71

2. Quantification de la densité des cellules Olig2-positives au sein du corps calleux et des couches corticales 72

3. Mesure du profil immuno-réactif des oligodendrocytes immatures et matures au sein des couches corticales 73

4. Quantification des fibres MBP-positives et des faisceaux MBP-positif respectivement au sein des couches corticales et du striatum 73

5. Microscopie électronique des corps calleux chez la souris à P15 73

6. Evaluation des profils axonaux myélinisés et des épaisseurs de gaine de myéline au sein du corps calleux 74

7. Evaluation de l'orientation vasculaire et des interactions oligo-vasculaires 74

VI. Influence des modulations placentaires sur l'axe placenta-cerveau & alcoolisation *in utero* .. 75

VII. Analyses statistiques 76

Chapitre 4 – Résultats 77

Etude 1 79

Etude 2 145

Chapitre 5 – Discussion & Perspectives 183

Références bibliographiques 201

Annexe 231

Etude Collaborative 233

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

- **Brosolo M**, Lecointre M, Laquerrière A, Genty D, Lesueur C, Vivien D, Marret S, Marguet F, Gonzalez B. (En révision dans Neurobiology of Disease). *In utero alcohol exposure impairs vessel-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing neocortex*

- Marguet F, **Brosolo M**, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez B, Laquerrière A. (*In Press* dans Acta Neuropathol Commun.). *Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed fetuses*.

- Marguet F, Friocourt G, **Brosolo M**, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A. (2020). *Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans.* Acta Neuropathol Commun. 8(1):208.

PUBLICATIONS NATIONALES

- **Brosolo M**, Lecointre M, Marret S, Gonzalez BJ. (2020). *Effet de l'exposition in utero à l'alcool sur l'angiogenèse et la corticogenèse cérébrale du fœtus : une étude préclinique*. Publication d'un abstract dans Perfectionnement en Pédiatrie. 3. 100-101.
- **Brosolo M**, Lecointre M, Marguet F, Genty D, Leseur C, Laquerrière A, Marret S, Gonzalez BJ. (2022). *Impact de l'alcoolisation in utero sur les interactions oligo-vasculaires au sein du néocortex en développement*. Publication d'un abstract dans Perfectionnement en Pédiatrie. *In Press*.

COMMUNICATIONS ORALES

L'orateur est souligné.

- **Mélanie Brosolo**, Maryline Lecointre, Florent Marguet, Damien Genty, Céline Lesueur, Annie Laquerrière, Stéphane Marret et Bruno José Gonzalez, *Impact de l'alcoolisation in utero sur les interactions oligo-vasculaires au sein du néocortex en développement*, **JFRN 2021**, **Paris**

- Maryline Lecointre, **Mélanie Brosolo**, Pauline Fadda, Denis Vivien, Stéphane Marret et Bruno Gonzalez, *Invalidation du récepteur NMDA endothélial : Perturbation de l'angiogenèse, défaut de maturation des oligodendrocytes et troubles du comportement*, **JFRN 2021**, **Paris**

- **Mélanie Brosolo**, Maryline Lecointre, Céline Lesueur, Damien Genty, Florent Marguet, Annie Laquerrière, Stéphane Marret et Bruno José Gonzalez, *Prenatal alcohol exposure effects on oligo-vascular interaction in the developing cortex*, **JED 2021**, **Distanciel**

- **Mélanie Brosolo**, Maryline Lecointre, Camille Sautreuil, Stéphane Marret and Bruno José Gonzalez, *Effects of prenatal PlGF on neurovascular impairments induced by prenatal alcohol exposure : Focus on oligodendrocytes*, **JED 2019**, **Caen**

- **Mélanie Brosolo**, Maryline Lecointre, Stéphane Marret et Bruno José Gonzalez, *Effet de l'exposition in utero à l'alcool sur l'angiogenèse et la corticogenèse cérébrale du fœtus : une étude préclinique*, **JFRN 2019**, **Paris**
  Lauréat du meilleur abstract.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

L'orateur est souligné.

- Maryline Lecointre, Alexandre Béranger, Pauline Fadda, **Mélanie Brosolo**, Denis Vivien, Stéphane Marret, Nicolas Guérout, Bruno Gonzalez, *Endothelial NMDA receptor impairs the differentiation of oligodendrocytes*, **FENS 2022**, **Paris**.

- **Mélanie Brosolo**, Maryline Lecointre, Céline Lesueur, Stéphane Marret and Bruno José Gonzalez, *Oligo-vascular interactions : impact of prenatal alcohol exposure (PAE) and placental PlGF overexpression in the developing cortex*, **FNN 2021**, **Distanciel**

- **Mélanie Brosolo**, Bruno José Gonzalez, Céline Lesueur, Damien Genty, Florent Marguet, Annie Laquerrière, Stéphane Marret et Maryline Lecointre, *Oligo-vascular interactions in the developing cortex : impact of in utero alcohol exposure*, **FASD 2021 Symposium, Distanciel**

COMMUNICATIONS GRAND PUBLIC

- **Mélanie Brosolo**, « Alcool pendant la grossesse : Lever le pied ou lever le coude ? », **Fête de la science 2020, Rouen**

ENSEIGNEMENTS

- Mission Enseignement 2019-2020 (32h) – Université des Sciences et Techniques de Rouen.
    - Niveau Licence 1 SVTE, Sciences de la Vie et de la Terre
    - Travaux Pratiques d'histologie animale (Tissu musculaire & Tissu nerveux)

ENCADREMENTS DE STAGIAIRES

- 1 stagiaire en 2ème année de Master Sciences Biomédicales - Parcours Neuroscience : Guylène Mboa-Atanga. Durée : 6 mois.
- 1 stagiaire en 1ère année de Master Biologie Intégrative et Physiologie – Parcours Management de l'Expérimentation Préclinique (MEP) : Mathilde Dubot. Durée : 2 mois.
- 1 stagiaire en 3ème année de Licence Sciences de la Vie, Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Physiologie : Sofiane Hamdi. Durée : 1 mois.
- 1 stagiaire en 3ème – Collège André Raimbourg : Océane Pilon. Durée : 1 semaine.

FORMATIONS

- Formation « Formation en technique chirurgicale appliquée à l'expérimentation », WASP Science, Université de Rouen Normandie, Rouen (2022)

- Formation « Expérimentation animal – Conception et réalisation de procédures expérimentales (ex-Niveau 1) », Ecole vétérinaire ONIRIS, Nantes (2019)
- Programme « Les Entrepreneuriales », Edition 2019
- Formation au sein de la plateforme d'imagerie PRIMACEN
    - « Initiation à l'analyse d'images » (2018)
    - « Formation à Image J & à FIJI » (2019)
- Formation à l'institut national supérieur du professorat et de l'éducation (INSPE ; 2019-2020)
    - « Analyser en groupe des situations professionnelles »
    - « Faire réussir et motiver les étudiants : freins et leviers »
- Formations proposées par l'école doctorale normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE, ED 497)
    - « De la thèse à l'emploi : Construire son projet professionnel »
    - « De la thèse à l'emploi : Développer son réseau professionnel »
    - « Place de l'e-recrutement sur le marché du travail »
    - « CV et Lettre de motivation »
    - « Hygiène et sécurité »

AUTRES ACTIVITES

- Organisation des JED 2021

  Les journées de l'école doctorale (JED) sont organisées chaque année sous forme de congrès, permettant la présentation des travaux scientifiques, l'intervention de professionnels et les échanges interdisciplinaires.
- Médiation scientifique
    - Rotations laboratoires

      Les rotations laboratoires ont pour objectifs de présenter les projets et les techniques scientifiques développés au sein de notre unité auprès d'étudiant en première année de Master Neurosciences.

Resume

Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) est provoqué par la consommation d'alcool au cours de la grossesse, et constitue l'atteinte la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF). Première cause de retard mental acquis, le SAF se traduit par de multiples manifestations cliniques (retard de croissance, déficit cognitif, troubles de l'apprentissage, de la mémorisation et de l'attention). La présence d'une dysmorphie cranio-faciale caractéristique, comprenant un ensemble de signes, permet un diagnostic périnatal précoce. Cependant, alors qu'ils pourront développer des atteintes neurodéveloppementales et comportementales, la plupart des enfants exposés *in utero* à l'alcool ne présentent pas ces anomalies faciales et échappent, de ce fait, à un diagnostic précoce. Les troubles engendrés par l'alcoolisation maternelle seront alors décelés tardivement, lors de la scolarisation, de nombreuses années de prise en charge étant ainsi perdues.

Bien que de multiples études aient démontré une action délétère d'une exposition *in utero* à l'alcool sur de nombreuses cellules nerveuses, ce n'est que plus récemment qu'un effet sur l'angiogenèse cérébrale a été caractérisé. Ainsi, des travaux réalisés au sein du laboratoire, puis confirmés par d'autres groupes, ont mis en évidence le rôle néfaste d'une alcoolisation maternelle sur l'angiogenèse cérébrale fœtale, engendrant notamment une désorganisation du réseau vasculaire cortical. Par ailleurs, d'autres groupes de recherche ont démontré l'existence d'une subtile interaction entre les vaisseaux et deux types cellulaires, les interneurones GABAergiques et les oligodendrocytes ; les vaisseaux servant de support de migration tangentielle. Ainsi, mon projet de thèse a consisté à rechercher l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes au cours du développement. Ces travaux ont pu être menés par des approches précliniques et, en partie, chez l'humain grâce à une interaction étroite avec plusieurs Services du CHU de Rouen. Enfin, du fait de la caractérisation récente d'un axe « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale, une approche fonctionnelle par modulation de l'expression placentaire d'un facteur angiogénique, le PlGF, a été initiée pour tenter d'établir un lien entre anomalies vasculaires et anomalies oligodendrocytaires.

Concernant l'étude des interactions oligo-vasculaires au sein du cortex en développement, les données obtenues chez la Souris confirment la désorganisation vasculaire cérébrale induite par l'alcoolisation maternelle. Toutefois, cette désorganisation observée chez le fœtus et le nouveau-né s'estompe avec l'âge. Au niveau cortical, une interaction entre oligodendrocytes et vaisseaux radiaux a été caractérisée. Dans le groupe alcool, alors que les vaisseaux sont désorganisés, l'association oligo-vasculaire n'est pas modifiée. En revanche,

l'alcoolisation *in utero* entraîne un défaut de positionnement des cellules Olig2-positives. En effet, sur l'ensemble de l'épaisseur corticale, les cellules Olig2-positives sont densifiées au sein des couches corticales profondes, renforçant l'hypothèse qu'une altération des routes migratoires vasculaires induirait des défauts ou un retard de positionnement cortical. De plus, des études protéiques et immunohistochimiques démontrent des altérations des processus de maturation, l'exposition prénatale à l'alcool entraînant une diminution de l'expression de la CNPase et de la MBP, deux marqueurs des oligodendrocytes immatures et matures, respectivement. Une perturbation du processus de myélinisation est également retrouvée après exposition prénatale à l'alcool au sein du corps calleux (réduction de l'épaisseur de la gaine de myéline) et du striatum, deux régions de projection des fibres corticales. Enfin, des atteintes comportementales ont été constatées, traduisant notamment des altérations motrices à long terme. Parallèlement, des études réalisées chez l'homme sur une cohorte de fœtus exposés ou non *in utero* à l'alcool, démontrent la présence d'interactions oligo-vasculaires sur l'ensemble de la surface corticale. De manière comparable aux études réalisées chez la Souris, un défaut de différenciation oligodendrogliale majeur a été observé chez les individus exposés *in utero* à l'alcool se traduisant directement par une augmentation des précurseurs oligodendocytaires.

En complément de ces travaux, une approche fonctionnelle a été initiée. Elle s'appuie sur la démonstration récente d'un axe « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale fœtale. Réalisée par une approche de modulation génique ciblant le PlGF d'origine placentaire, elle vise à établir un lien entre les anomalies angiogéniques induitent par l'alcoolisation *in utero* et les anomalies du lignage oligodendroglial.

En conclusion, ces travaux de thèse ont révélé que les oligodendrocytes intégrant le néocortex utilisent les microvaisseaux radiaux. L'alcoolisation *in utero* désorganise l'orientation radiale des vaisseaux et induit une altération des profils migratoires et de maturation des oligodendrocytes corticaux. Ces effets sont associés à un défaut de myélinisation et des troubles moteurs. Ils suggèrent une dysfonction oligovasculaire induite par l'alcool et ouvrent de nouvelles pistes de recherche. En particulier, il serait intéressant de déterminer si une correction des atteintes vasculaires pourrait être en mesure de corriger les atteintes développementales du lignage oligodendroglial.

Abstract

Alcohol consumption during pregnancy can cause fetal alcohol syndrome (FAS), referring to the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). Leading cause of non-genetic mental retardation, FAS is associated with multiple clinical defects such as growth retardation, neurological deficits, and behavioural troubles. Whereas FAS patients present characteristic facial dimorphisms, most FASD children do not present them but are not devoid of neurodevelopmental impairments and behavioral disabilities, which are frequently detected with schooling. Consequently, these children are late or misdiagnosed and several years of care are lost.

Although it is well established that *in utero* alcohol exposure exerts deleterious effects on nervous cells, several studies more recently showed that prenatal alcohol exposure (PAE) alters brain angiogenesis. In particular, data from our laboratory revealed that PAE disorganizes the radial orientation of cortical microvessels. Concurrently, other research groups demonstrated a close interaction between brain microvessels and two nervous cell types; GABAergic interneurons and oligodendrocytes that use vessels as guides during their migration. In this way, my thesis project consisted in evaluating the effects of *in utero* alcohol exposure on the vasculo-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing cortex. This project has been performed using a mouse preclinical model of *in utero* alcohol exposure and, when possible, in human in a close partnership with several departments from the Rouen University Hospital. Moreover, due to the recent evidence in favour of a "placenta-brain" axis involved in the control of fetal cortical angiogenesis, a functional study targeting the angiogenic factor PlGF has been initiated in order to establish a link between vascular and oligodendrocyte impairments resulting from PAE.

Regarding oligo-vascular interactions in the developing cortex, data obtained in mouse brains at three developmental stages confirmed that *in utero* alcohol exposure induced a perinatal disorganization of the cortical vascular network. However, this effect decreased with age. Moreover, in control mice, a vascular association was evidenced between oligodendrocytes invading the developing cortex and radial microvessels. PAE did not impaired this oligo-vascular association but led to a mispositioning of Olig2-positive cells among cortical layers. Indeed, morphometric quantifications showed a larger number of Olig2-positive cells in the deep cortical layers compared to superficial cortical layers, supporting the hypothesis that, by impairing vascular routes, PAE could lead to delayed or mis-positioning of migrating oligodendrocytes. Consistent with these results, Western blot and immunohistochemistry experiments have shown that PAE altered the differentiation of the oligodendrocytes. Indeed,

in utero alcohol exposure reduced the expression of CNPase and MBP, two markers of immature and mature oligodendrocytes, respectively. Interestingly, alcohol exposure inverted the distribution profiles of CNPase and MBP immunoreactivities in deep cortical layers. Moreover, PAE resulted in myelination impairments: reduced myelin sheath of axons in the corpus callosum and a disorganization of myelinated bundles in the striatum. All these neurodevelopmental defects were associated to perinatal behavioural impairments that persisted at adulthood. In human, experiments conducted in a cohort of control and FAS foetuses showed similar oligovascular interactions in the developing cortex and revealed major defects regarding differentiation of oligodendrocytes. Immunohistochemistry showed that PAE induced an increase of PDGFRα-positive oligodendrocyte precursors in the ganglionic eminences and the cortex, and a decrease of Olig2-positive cells in the cortex.

In addition to these data, a functional study has been initiated and was based on the recent demonstration of a functional "placenta-brain" axis involved in the control of fetal angiogenesis. Focused on the targeted modulation of PlGF by *in utero* electroporation, it aims to demonstrate a link between alcohol-induced vascular defects and impairments of the oligodendrocyte lineage.

In conclusion, the present thesis showed that oligodendrocytes invading the developing cortex are in close interaction with radial microvessels. PAE impaired both the cortical vasculature and the positioning and maturation profiles of cortical oligodendrocytes. These effects which are, at least in part, retrieved in human, are associated to white matter defects and motor disabilities. Altogether, they support a vascular contribution in neurodevelopmental effects of alcohol and suggest that the characterization of alcohol-induced vascular impairments would be a promising research avenue to improve the early diagnosis of FASD.

LISTE DES ABREVIATIONS

[A]

ADH Alcool déshydrogénase

ALDH Acétaldéhyde déshydrogénase

AMPA-R Récepteur sensible à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazol

API Alcoolisation ponctuelle importante

[B]

BDNF *brain-derived neurotrophic factor*

bHLH *basic helix-loop-helix*

BMP *bone morphogenetic proteins*

[C]

CD146 *cluster of differentiation 146*

CNP/CNPase *2,3-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase*

CNP1 Isoforme 1 de la CNP

CP *cortical plate*

CRISPR *Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats*

CRISPR-*PlGF*-Act *Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats* d'Activation du PlGF

CSN Cellules souches neurales

Ct *threshold cycle*

CxcL1 *chemokine (C-X-C motif) ligand* 1

Cxcr4 *chemokine (C-X-C motif) receptor* 4

CYP2E1 cytochrome P450 2E1

[D]

DCX *doublecortin*

[E]

EGF *epidermal growth factor*

eGFP *enhanced green fluorescent protein*

Emx1 e*mpty spiracles homeobox 1*

Erk1/2 *extracellular signal-regulated kinase ½*

Ex Jour embryonnaire x

[F]

FAEE *fatty acid ethyl ester*

FAS *Fetal Alcohol Spectrum*

FASD *Fetal Alcohol Spectrum Disorder*

FGF *fibroblast growth factor*

Flk1 *fetal liver kinase* 1

Flt1 *fms related tyrosine kinase* 1

Flt4 *fms related tyrosine kinase* 4

[G]

GAPDH Glycéraldhéhyde-3phosphate

GalC Galactocérébroside

Glut1 Transporteur de glucose de type 1

Gsx2 *GS homeobox 2*

[H]

HAT Histone acétyltransférase

HDAC Histone désacétylase

HGF *hepatic growth factor*

HIF *hypoxia inductible factor*

H_2O Eau

H_2O2 Eau oxygénée

[I]

IRM Imagerie à résonance magnétique

IZ *intermediate zone*

[J]

JG Jour gestationnel

[K]

K^+ Ion potassique

[L]

LGE Eminences ganglionnaires latérales

[M]

MAG *myelin-associated glycoprotein*

MBP *myelin basic protein*

MCT1 Transporteur de monocarboxylate de type 1

MCT2 Transporteur de monocarboxylate de type 2

MGE Eminences ganglionnaires médianes

mGluR Récepteurs métabotropiques sensible au glutamate

miARN micro-ARN

MOG *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

Myrf *myelin regulatory factor*

MZ *marginal zone*

[N]

Na^+ Ion sodique

NAD+ Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH Hydrure de NAD

$NADP^+$ Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH Hydrure de NADP

NG2 *neural/glial antigen 2*

NICD *Notch intracellular domain*

Nkx2.1 *Nk2 homeobox 1*

Nkx2.2 *Nk2 homeobox 2*

NMDA N-Méthyl-D-Aspartate

NMDA-R Récepteur sensible au NMDA

NPR-1 *semaphorin receptors neuropilin* 1

NPR-2 *semaphorin receptors neuropilin* 2

[O]

OL Oligodendrocytes

Olig2 *oligodendrocyte transcription factor 2*

OPC *oligodendrocytes precursor cells*

O2 Dioxygène

[P]

PDGF *platelet-derived growth factor*

PDGFRα *PDGF receptor alpha*

PGF+ PlGF surexprimé

PI3K/Akt *phosphoinositide 3 kinase/AKT*

PlGF *placental growth factor*

PLCγ *phospholipase C gamma*

PLP *proteolipid protein*

pMN *motor neuron progenitor domain*

PP *preplate*

Pré-OL Pré-oligodendrocytes

Px Jour de vie postnatal

[R]

ROI *region of interest*

[S]

SAF Syndrome d'alcoolisation fœtale

Sdf-1 *stromal-derived factor 1*

SG Semaine de grossesse

Shh *sonic hedgehog*

SNC Système Nerveux Central

SP *subplate*

sVEGF-R1 forme soluble du VEGF-R1

SZ *subventricular zone*

[T]

TCAF Troubles causés par l'alcoolisation fœtale

TGF-β *transforming growth factor β*

[U]

UNV Unité neuro-vasculaire

Untft *Untransfected* / Non transfecté

[V]

VEGF-A, B, C, D, E et F *vascular endothelial growth factor A, B, C, D, E et F*

VEGF-R1, 2 et 3 Récepteur 1, 2 et 3 du VEGF

VPF *vascular permeability factor*

VZ *ventricular zone*

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Neurulation de l'embryon de mammifère. 4

Figure 2 : Principales voies moléculaires impliquées dans l'induction neurale chez les embryons de vertébrés. 5

Figure 3 : Formation des vésicules cérébrales primaires et secondaires. 7

Figure 4 : Co-existence de plusieurs modes de migration cellulaire au sein du néocortex. 9

Figure 5 : Stratification corticale par migration neuronale. 10

Figure 6 : Mise en place de l'hétérogénéité cellulaire au sein du cortex cérébral. 11

Figure 7 : Représentation schématique des vagues oligodendrocytaires peuplant le système nerveux central au cours du développement 15

Figure 8 : Participation des récepteurs glutamatergiques à la mise en place des oligodendrocytes. 17

Figure 9 : Implication de la voie Wnt et de Cxcr4 dans la migration vasculo-associée des OPCs au cours du neurodéveloppement 18

Figure 10 : Maturation des oligodendrocytes. 20

Figure 11 : Schématisation de la formation de la gaine de myéline. 24

Figure 12 : Illustration de la régulation de la conductance axonale. 25

Figure 13 : Représentation schématique des constituants de la gaine de myéline 27

Figure 14 : Importance des protéines myéliniques dans l'intégrité neuronale. 28

Figure 15 : Rôle des oligodendrocytes dans le support métabolique axonal. 29

Figure 16 : Correspondance développementale du lignage oligodendrocytaire chez l'Homme et la Souris. 31

Figure 17 : Vue d'ensemble du processus de myélinisation du cerveau chez l'Homme et le Rat. 32

Figure 18 : Organisation du polygone de Willis chez l'Homme. 34

Figure 19 : Représentation schématique du système VEGF-Dll4-Notch dans le bourgeonnement vasculaire 36

Figure 20 : Constitution de l'unité neuro-vasculaire. 38

Figure 21 : Conformation quaternaire des ligands membres de la superfamille des VEGFs. 40

Figure 22 : Produits résultants de l'épissage alternatif du VEGF-A. 41

Figure 23 : Epissage alternatif du PlGF et produits correspondants. 43

Figure 24 : Ligands et récepteurs de la superfamille du VEGF. 45

Figure 25 : Modification de la réponse angiogénique par le PlGF. 47

Figure 26 : Prévalences mondiales de la consommation d'alcool au cours de la grossesse et du SAF au sein de la population générale, en 2012. 52

Figure 27 : Mécanismes impliqués dans le métabolisme de l'alcool dans le foie par les processus oxydatifs. 55

Figure 28 : Malformations cranio-faciales caractéristiques du syndrome d'alcoolisation fœtale chez l'Homme et la Souris. 57

Figure 29 : Illustrations des tests utilisés pour l'évaluation sensorimotrice des souriceaux. 68

Figure 30 : Illustration du test d'activité locomotrice chez la Souris à P15 et à P45. 69

Figure 31 : Composition du complexe de plasmides lentiviraux d'activation (CRISPR-*PlGF*-Act). 75

Figure 32 : Graphical abstract résumant l'ensemble des résultats obtenus. 195

Figure 33 : Protocole expérimental mis en place pour rechercher un lien fonctionnel entre les anomalies vasculaires et les anomalies du lignage oligodendrocytaire par modulation de l'expression placentaire du PlGF. 197

Figure 34 : Validation de la surexpression placentaire de PlGF à E20. 198

Figure 35 : Effet de la surexpression du PlGF placentaire sur l'orientation corticale des microvaisseaux chez des fœtus à E20 exposés ou non à l'alcool *in utero*. 199

Figure 36 : Effet d'une surexpression placentaire du PlGF et d'une alcoolisation *in utero* sur l'expression de marqueurs du lignage oligodendrocytaire à E20. 200

LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western blot 70

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des séquences des amorces utilisées en qRT-PCR. 71

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunohistochimie. 72

Tableau 4 : Travaux de la littérature illustrant les altérations du développement cérébral à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool en clinique et en préclinique. 187

Chapitre 1

Introduction

I. Interactions neuro-vasculaires : les acteurs d'une communication physiologique essentielle

1. Développement précoce du système nerveux et mise en place du cortex cérébral

Le cerveau adulte présente une architecture complexe, résultant d'un ensemble d'interactions d'ordre génétique, moléculaire ou encore cellulaire au cours du développement. La mise en place du système nerveux central (SNC) est un processus précoce, qui débute chez l'Homme au cours de la 3ème semaine de gestation **[1]**. L'altération du parcours développemental, par des évenements tels qu'une mutation génique ou encore l'exposition à des facteurs environnementaux comme les drogues, peut conduire à des atteintes du SNC.

a. La différenciation du tube neural

Après fécondation, le zygote subit de multiples divisions cellulaires, correspondant à la première phase du développement embryonnaire : la segmentation. L'initiation du développement neuronal dépend cependant de l'étape de gastrulation, élément clef permettant la mise en place de la polarité de l'embryon selon trois axes : antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral. Débutant au cours de la 3ème semaine de gestation chez l'Homme, la gastrulation permet ainsi, à la suite de mouvements cellulaires coordonnés dans le temps et l'espace, la mise en place de 3 feuillets embryonnaires primitifs : un feuillet externe (l'ectoderme), un feuillet intermédiaire (le mésoderme) et un feuillet interne (l'endoderme) **[2]**.

Faisant directement suite à la gastrulation, la neurulation marque la mise en place du système nerveux. Issue de multiples processus morphogéniques complexes qui requièrent une coordination cellulaire et moléculaire, la neurulation débute par l'épaississement des cellules ectodermiques situées au niveau des régions dorsale et médiane de l'embryon permettant ainsi la formation de la plaque neurale (**Figure 1**). Ce neuroectoderme mis en place permettra l'installation de la totalité du système nerveux mature, sous l'influence d'un ensemble de signaux inducteurs : on parle alors d'induction neurale. Au cours du XXème siècle, de multiples expériences, à commencer par celles de Spemann et Mangold en 1924, ont permis d'identifier des signaux inducteurs nécessaires à la différenciation des régions embryonnaires.

---

[1] Bystron *et al.*, 2008.
[2] Stiles & Jernigan, 2010.

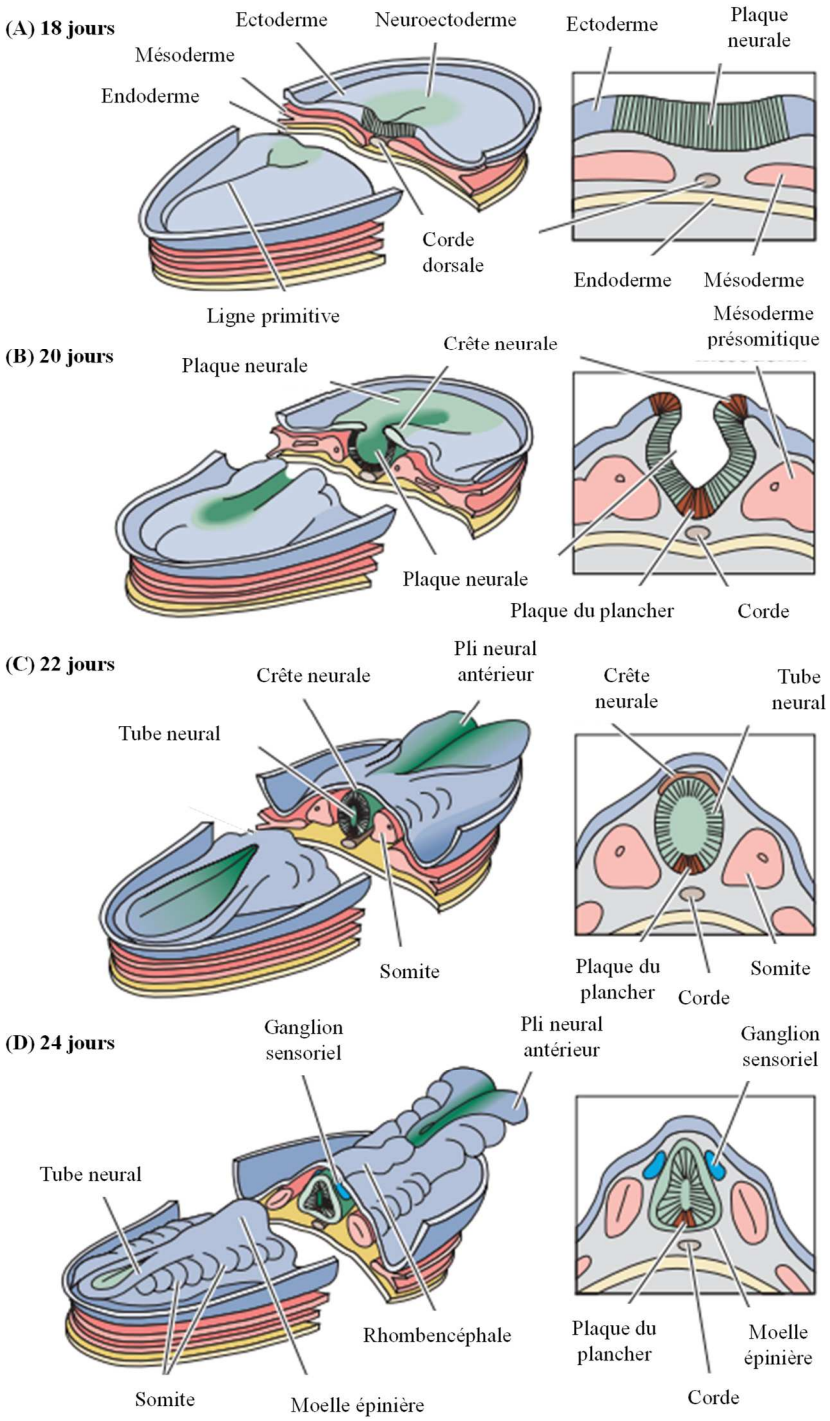


Figure 1 : Neurulation de l'embryon de mammifère.

(A) Initiation de la neurulation par formation de la plaque neurale à partir du neuroectoderme. (B) Repliement de de la plaque neurale permettant la formation progressive du tube neural. (C) Le tube neural étant mis en place, le mésoderme laisse place par subdivision aux somites, précurseurs de la musculature. (D) Le développement du tube neural se poursuit, entraînant la formation de la moelle épinière et du cerveau. D'après Neurosciences, Purves D, Augustine GJ et *al*., éditeurs, De Boeck supérieur.

Les capacités de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme à former un ensemble de cellules différenciées furent ainsi mises en évidence par diverses expériences de suppression ou de transfert de tissus embryonnaires **[3]**. A titre d'exemple, l'exposition des cellules ectodermiques aux *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) provoque leur engagement dans une différenciation épidermique. En revanche, la présence de *Noggin*, *Chordin* et *Follastine*, synthétisées au sein du mésoderme dorsal, entraîne une transformation de l'ectoderme dorsal en tissu nerveux **[4]**, le neuroectoderme échappant ainsi à sa destinée épidermique (**Figure 2**). On parle alors d'une différenciation neuronale « par défaut », faisant écho à un déficit d'expression de protéines ventralisantes.

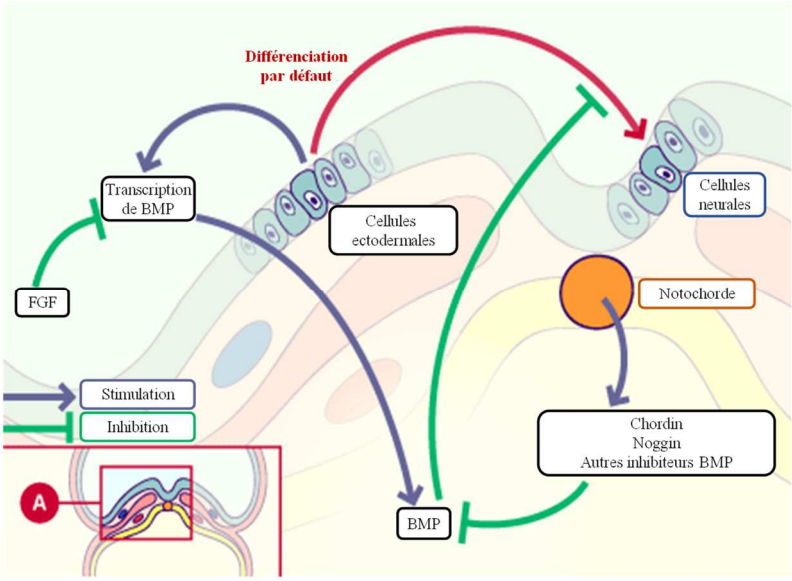


Figure 2 : Principales voies moléculaires impliquées dans l'induction neurale chez les embryons de vertébrés.

L'induction neurale est inhibée par les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP). L'action de la *Noggin* et de la *Chordin*, produites au niveau de la notochorde, inhibent l'action des BMP permettant l'engagement des cellules ectodermiques vers un phénotype neural. En amont de la gastrulation, les *Fibroblast Growth Factor* (FGF) inhibent la transcription des BMP, participant ainsi à l'induction neurale. Modifiée d'après Embryologie.ch.

La neurulation progressant, le soulèvement des bourrelets neuraux situés de part et d'autre de la plaque neurale, permet la formation de la gouttière neurale. L'enroulement et la soudure progressive de la gouttière neurale, de la région médiane vers les régions antérieure et postérieure, permet l'apparition du tube neural, entre le 19ème jour embryonnaire (E19) et E29, qui s'individualise de l'ectoderme (**Figure 1**). Parallèlement à la formation du tube neural par

[3] Spemann & Mangold, **1924**.
[4] Nikolopoulou *et al.*, **2017**.

fermeture de la gouttière neurale, émergent les crêtes neurales. Formées à partir des bords des replis de la plaque neurale, ces crêtes neurales constituent une nouvelle population de cellules précurseurs, qui influencées par des signaux inducteurs sous forme de gradients moléculaires, permettent la détermination des différents lignages des précurseurs neuronaux. A titre illustratif, les signaux inducteurs *transforming growth factor β* (TGF-β) et *Sonic hedgehog* (Shh), produits localement, vont d'une part spécifier l'organisation du tube neural, respectivement en plaque du toit et en plaque du plancher, et d'autre part, participer à la détermination des différentes classes des cellules du système nerveux **[4]**.

b. Les grandes subdivisions de l'encéphale

Au cours de la 4ème semaine de gestation, le tube neural évolue par poussées internes sous l'effet de mouvements morphogénétiques et permet la formation de trois vésicules primaires de la région antérieure à la région postérieure : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur).

Au cours de la 5ème semaine de gestation, ces trois vésicules cérébrales primaires évoluent progressivement de la région antérieure à la région postérieure, permettant la formation des vésicules cérébrales secondaires, alignées selon un axe rostro-caudal et précurseurs des structures du cerveau adulte (**Figure 3** ; **[5]**). A la suite de multiples subdivisions supplémentaires, ces structures cérébrales secondaires évolueront et laisseront place à l'ensemble des structures de l'encéphale chez l'adulte, des hémisphères cérébraux au bulbe rachidien.

c. La diversité cellulaire au sein du cortex cérébral

Le cerveau humain mature constitue une structure extrêmement organisée, la mise en place du cortex cérébral s'effectuant au travers d'une succession d'étapes développementales : de prolifération, de migration, de différentiation et de phases régressives.

Le tube neural établi, les cellules neuroépithéliales qui le composent forment une couche de cellules pseudo-stratifées directement en contact avec la lumière du tube neural **[1]**. Présentant une forte activité mitotique, ces cellules se divisent en suivant une succession de mouvements cellulaires définis.

[5] Stiles, **2008**.

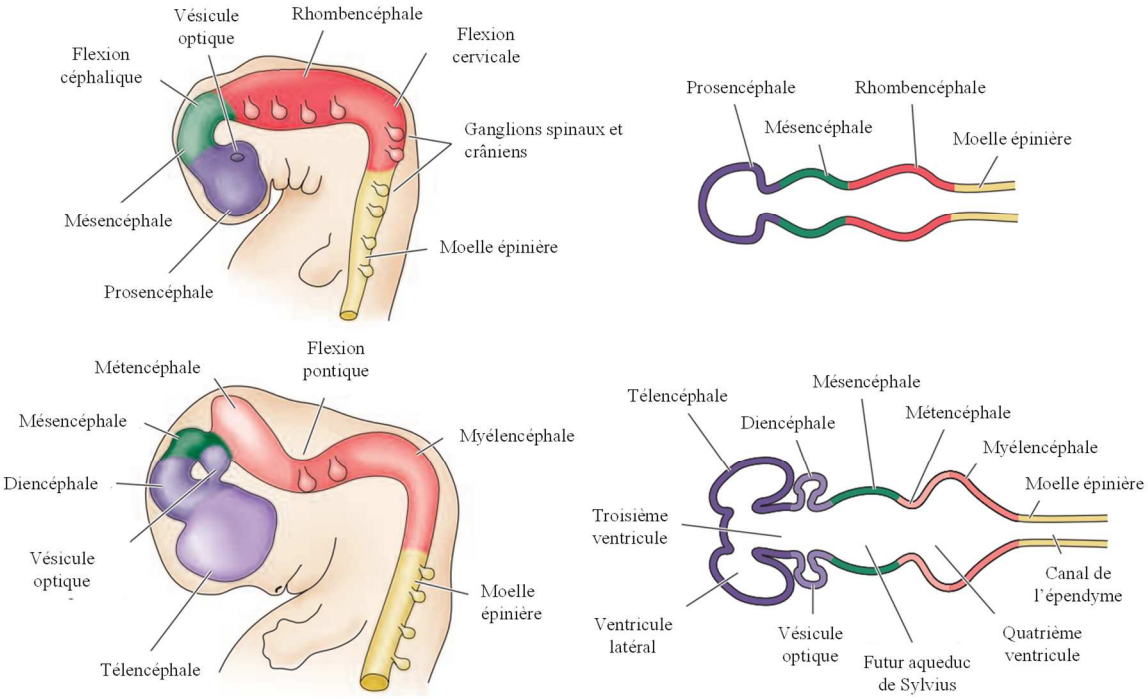


Figure 3 : Formation des vésicules cérébrales primaires et secondaires.

A E28, le tube neural se subdivise en 3 vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Une seconde segmentation se déroule à E49, aboutissant à l'apparition de vésicules cérébrales dites secondaires. A partir du prosencéphale émergent le télencéphale et le diencéphale. Le cerveau postérieur (rhombencéphale) évolue en métencéphale et en myélencéphale. Le mésencéphale constitue la seule vésicule primaire qui ne subit pas de seconde segmentation. D'après Stiles & Jernigan, 2010 **[2]** et modifiée d'après Neurosciences, Purves D, Augustine GJ et *al*., editors. De Boeck supérieur.

Entre E25 et E42, les progéniteurs neuraux présentent un mode de division cellulaire dit symétrique, avec un plan de clivage vertical, conduisant à l'émergence de deux progéniteurs neuraux identiques. Ce mode de division cellulaire permet l'augmentation du pool de progéniteurs neuraux **[2]**, conduisant à l'épaississement du neuroépithélium puis à la formation de la zone ventriculaire. A partir de E42, du fait d'un plan de clivage horizontal **[6]**, une bascule vers des divisions dites asymétriques est observée **[7]**. Ces divisions asymétriques permettent ainsi l'émergence de deux types cellulaires distincts : soit de nouvelles cellules précurseurs qui persistent au sein de la zone ventriculaire, soit de neuroblastes, cellules post-mitotiques destinées à devenir un neurone ou une cellule gliale **[8]** qui migreront hors de la zone proliférative.

[6] Noctor *et al*., **2008**.
[7] Paridaen & Huttner, **2014**.
[8] Wodarz & Huttner, **2003**.

Arrivée à maturité, l'activité neuronale du cortex cérébral résulte d'une balance entre les systèmes excitateurs et inhibiteurs, rôle assuré respectivement par les neurones glutamatergiques et les interneurones GABAergiques qui représentent 80 % et 20 % des neurones corticaux. Afin d'intégrer des circuits neuraux matures, les neurones nouvellement formés doivent migrer hors de la zone ventriculaire. Plusieurs modes de migration neuronale coexistent et dépendent notamment de la localisation du site de production et du site d'intégration des neurones. Au début du développement, du fait des faibles distances à parcourir, la migration par translocation somatique est retrouvée au sein du système nerveux en construction.

Indépendamment de ces mouvements cellulaires par translocation somatique, une migration dite radiaire émerge, du fait d'une plus grande distance à parcourir **[9]**. Ce nouveau mode de migration constitue la forme de déplacement la plus répandue au sein du SNC, les neurones glutamatergiques issus de la zone ventriculaire utilisant les prolongements de la glie radiaire comme support de migration **[10]** (**Figure 4**). Par ailleurs, de récentes observations ont pu mettre en lumière une double fonction de la glie radiaire, étant à la fois cellules progénitrices et guides de migration au sein du cortex cérébral **[11]**.

Parallèlement à la zone ventriculaire, une seconde zone prolifération permet la production de nouvelles cellules. Localisées au sein du télencéphale ventral, les éminences ganglionnaires médianes (MGE) et latérales (LGE), permettent l'émergence des interneurones GABAergiques **[12]** (**Figure 4**) qui adoptent une migration dite tangentielle, impliquant une variété de signaux moléculaires permettant la guidance de ces nouvelles cellules vers le néocortex **[13]**. Plus récemment, une étude menée par Won et collaborateurs a mis en évidence l'existence d'une migration vasculo-associée des interneurones GABAergiques. Utilisant les vaisseaux comme support de migration, les interneurones GABAergiques empruntent deux routes vasculaires au cours de leur migration tangentielle : une route vasculaire profonde, au sein de la zone sous-ventriculaire, et une route vasculaire superficielle, au sein de la zone marginale **[14]**.

---

[9] Rakic, **1990**.
[10] Nadarajah *et al.*, **2003**.
[11] Noctor *et al.*, **2002**.
[12] Anderson *et al.*, **2001**.
[13] Valiente & Marion, **2010**.
[14] Won *et al.*, **2013**.

La migration des neurones glutamatergiques et des interneurones GABAergiques reste cependant un processus complexe impliquant une variété d'acteurs finement régulés **[18]**. Le récepteur sensible au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA-R), un type de récepteur ionotropique du glutamate, est un exemple caractéristique de cette subtile influence sur la migration neuronale. Ainsi, l'activation du NMDA-R stimule la migration radiaire des neurones immatures hors de la zone ventriculaire, alors que l'utilisation d'antagonistes du NMDA-R bloque cette migration **[15]**. En revanche, une stimulation massive du NMDA-R, provoque un arrêt de la migration neuronale **[16]**. Par ailleurs, certains gènes et par voie de conséquence certaines protéines, sont essentiels à la migration corticale, et leurs mutations sont responsables de perturbations cérébrales majeures. A titre d'illustration, la protéine *doublecortin* (DCX) interagit physiologiquement avec les microtubules des neurones en migration le long de la glie radiaire. Une mutation du gène DCX provoque une désorganisation du néocortex conduisant à une lissencéphalie **[17]**.

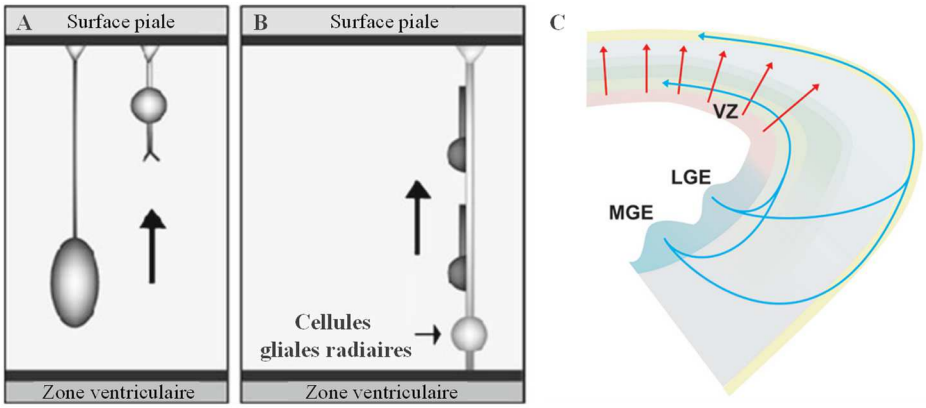


Figure 4 : Co-existence de plusieurs modes de migration cellulaire au sein du néocortex.

(A) Au cours de la migration par translocation somatique, les neurones émettent une extension cytoplasmique en direction de la surface piale, zone la plus périphérique du cerveau en développement. Maintenue à la surface piale, cette projection cytoplasmique se raccourcit permettant au noyau cellulaire de migrer au sein du cerveau embryonnaire. (B) Les cellules radiales projettent vers la surface piale en maintenant leur noyau au sein de la zone ventriculaire. Véritable échafaudage cellulaire, la glie radiaire permet ainsi aux neurones de migrer au sein du cortex en développement. Modifiée d'après Stiles & Jernigan, 2010 **[2]**. (C) Les neurones glutamatergiques (rouge) générés au niveau du neuroépithélium dorsal du télencéphale, suivent une migration radiaire à partir de la zone ventriculaire (VZ : *ventricular zone*). Les interneurones GABAergiques (bleu) suivent une migration tangentielle en partant des éminences ganglionnaires latérale (LGE : *lateral ganglionic eminence*) et médiane (MGE : *medial ganglionic eminence*). D'après Luhmann *et al.*, 2015 **[18]**.

[15] Behar *et al.*, **1999.**
[16] Kihara *et al.*, **2002.**
[17] Des Portes *et al.*, **1998**.
[18] Luhmann *et al.*, **2015**.

Composé à terme de six couches, le néocortex cérébral se constitue selon des processus bien précis. Les premiers neurones post-mitotiques migrent et forment dès le début de la 5ème semaine embryonnaire, deux premières structures nommées : la pré-plaque corticale et la zone intermédiaire. Une seconde vague de migration cellulaire permet la mise en place de structures embryonnaires transitoires, essentielles à la construction du cortex cérébral mature (**Figure 5**). La migration par vagues successives au sein du cortex en développement permet la stratification de ce dernier selon une orientation *inside-out*. Les premiers neurones formés résident au sein des couches corticales les plus profondes, tandis que les plus jeunes migreront au travers, et composeront les couches les plus superficielles **[19]**.

Le positionnement final des neurones au sein de la plaque corticale est soumis à un contrôle par les cellules de Cajal-Retzius, présentes à la surface corticale **[20]** qui produisent la Reeline. Ce signal moléculaire provoque alors l'arrêt des neurones dans leur position finale au sein de l'architecture corticale **[21]**.

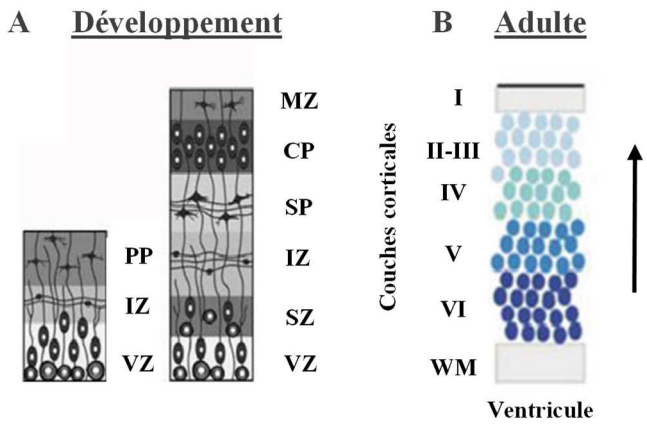


Figure 5 : Stratification corticale par migration neuronale.

Les premières vagues de migration neuronale issues de la zone ventriculaire permettent la mise en place de structures transitoires primaires que sont la pré-plaque (PP) et la zone intermédiaire (IZ). Les migrations suivantes provoquent la séparation de la pré-plaque en zone marginale (MZ) et *subplate* (SP). Entre ces 2 structures embryonnaires émerge la plaque corticale. CP : *cortical plate* ; IZ : *intermediate zone* ; MZ : *marginal zone* ; PP : *preplate* ; SP : *subplate* ; SZ : *subventricular zone* ; VZ : *ventricular zone*. Modifiée d'après Stiles & Jernigan, 2010 **[2]** et Cooper *et al*., 2008 **[19]**.

[19] Cooper, **2008**.
[20] Bielle *et al*., **2005**.
[21] Huang *et al*, **2009**.

Issues de progéniteurs neuraux, les cellules post-mitotiques composant le cortex cérébral présentent une grande diversité de morphologie et de fonction (**Figure 6** ; **[22]**). Cette diversité cellulaire dépend de multiples mécanismes moléculaires complexes, à la fois extrinsèques et intrinsèques. En effet, les signaux moléculaires locaux et les facteurs de transcription sont variables au cours des différentes étapes de la stratification corticale. Ainsi, le devenir de chaque cohorte de cellules nouvellement formée est alors directement influencé par des interactions cellulaires locales, des régulations transcriptionnelles et des expositions moléculaires.

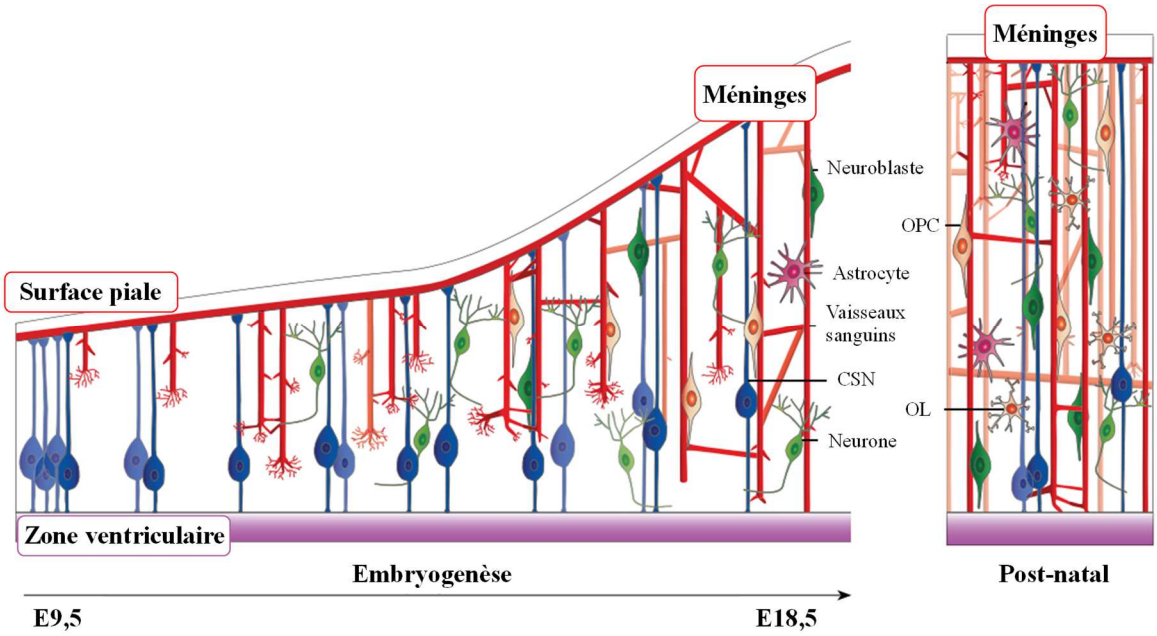


Figure 6 : Mise en place de l'hétérogénéité cellulaire au sein du cortex cérébral.

Débutant à E9,5, la neurogenèse permet la mise en place progressive des différents types cellulaires composants le futur cortex cérébral. A partir des zones germinatives, les cellules souches neurales (CSN) donnent naissance aux neuroblastes, puis aux neurones, aux astrocytes et aux oligodendrocytes (OL), qui formeront ensemble un groupe cellulaire hétérogène et complémentaire nécessaire au bon fonctionnement cérébral. Parallèlement, le système vasculaire se met en place, et participe à la migration de certains types cellulaires. Modifiée d'après Paredes *et al.*, 2018 **[23]**.

A titre d'exemple, de nombreux signaux moléculaires essentiels à l'induction neurale tels que Shh, BMP et Wnt participent à la détermination des neurones et des cellules gliales, par expression ou répression de facteurs de transcriptions propres aux cellules progénitrices. Influençant la mise en place des lignages cellulaires, les gènes *basic helix-loop-helix* (bHLH) constituent une cible importante de ces signaux moléculaires. Ils participent à la diversité

[22] Zeisel *et al.*, **2015**.
[23] Paredes *et al.*, **2018**.

neurale **[24]**, orientant tantôt les cellules progénitrices vers un destin neuronal, tantôt vers la gliogenèse, processus définissant la mise en place des astrocytes, des oligodendrocytes et des cellules épendymaires. D'origine mésodermique, la microglie joue un rôle essentiel dans l'immunité du système nerveux, et est apparentée à des macrophages permettant la phagocytose des déchets de la substance blanche et de la substance grise. Par ailleurs, elle participe à la régulation de l'élimination spécifique de la population neuronale **[25]** et au processus de synaptogenèse, en supprimant les synapses excédentaires **[26]**. Regroupant les oligodendrocytes et les astrocytes, la macroglie présente une origine neuroectodermique **[27]**. Une fois mis en place, les astrocytes participent à la migration des précurseurs neuronaux, constituent un soutien métabolique pour les neurones, et jouent un rôle essentiel dans la transmission synaptique chimique. Les astrocytes et les oligodendrocytes se développent parallèlement, partageant initialement des voies communes, notamment grâce à l'expression du *oligodendrocyte transcription factor 2* (Olig2) **[28]** dont l'invalidation provoque un défaut de mise en place des oligodendrocytes **[29]**. Le processus de spécification gliale, permet aux oligodendrocytes et aux astrocytes de respectivement s'engager dans des voies de lignage spécifique **[30]**.

2. Mise en place de la population oligodendrocytaire

a. Fonctions principales des oligodendrocytes

C'est par un procédé de coloration au carbonate d'argent, qu'en 1921, le neuroscientifique Pio del Rio-Hortega décrit pour la première fois les cellules oligodendrocytaires **[31]**. Issu du grec, le terme oligodendrocyte provient des mots *oligos* (peu) et *dendro* (arbres), permettant d'illustrer ces cellules présentant peu de prolongements mais de nombreuses ramifications. Véritable circuit interconnecté, le système nerveux coordonne les actions du corps afin d'interagir avec l'environnement et d'adapter l'organisme à d'éventuelles contraintes. La vitesse de conduction de l'influx nerveux constitue alors un élément primordial dans le

[24] Baker & Brown, **2018**.
[25] Cunningham *et al.*, **2013**.
[26] Wu *et al.*, **2015**.
[27] Van Tilborg *et al.*, **2018**.
[28] Marshall *et al.*, **2005**.
[29] Zhou *et al.*, **2002**.
[30] Rowitch *et al.*, **2010**.
[31] Hortega, **1921**.

traitement de l'information. Constituant 5 à 10 % de la population gliale totale du SNC **[32]**, les oligodendrocytes ont pour fonction principale la formation de la gaine de myéline autour des axones des neurones, rôle assuré par les cellules de Schwann au sein du système nerveux périphérique. Permettant le processus de myélinisation, l'enroulement et la compaction de la gaine de myéline constitue alors une isolation électrique des fibres nerveuses et permet ainsi l'accélération de la conduction de l'influx nerveux **[33]**. La myélinisation du SNC débute chez l'Homme vers le 5ème mois de grossesse et se poursuit jusqu'à l'adolescence, constituant ainsi une étape fondamentale d'un bon fonctionnement cérébral.

b. Production des oligodendrocytes

Chez la Souris, débutant par la production de progéniteurs oligodendrocytaires (*Oligodendrocytes Precursor Cells,* OPCs), l'oligodendrogenèse s'effectue par vagues et dérive de domaines spécifiques du SNC, à la fois au sein de la moelle épinière, du cervelet et du cerveau **(Figure 7)**.

Partageant des schémas mécanistiques communs avec les motoneurones **[34]**, les OPCs émergent au sein de la moelle épinière à E12,5, au niveau du neuroépithélium de la partie ventrale de la zone ventriculaire, également nommé pMN pour *motor neuron progenitor domain* **[30]**. Cette première vague d'OPCs est dépendante de la signalisation Shh et génère 85 % des oligodendrocytes de la moelle épinière **[35]**. Issues des domaines dorsaux de la moelle épinière, les vagues suivantes de production d'OPCs, à E15,5 et à la naissance, sont indépendantes de Shh, et génèrent les 15 % restants de la population oligodendrogliale finale **[32]**.

Dans le cervelet, les oligodendrocytes proviennent des régions extra-cérébelleuses **[36]**. Générés à E11,5 au niveau de structures rhombomériques, les premiers OPCs migrent et atteignent le cervelet à E16,5. Une phase d'expansion s'effectue à E18,5 par prolifération **[37]**. Simultanément, une production locale d'OPCs a lieu représentant cependant une faible proportion de la population oligodendrogliale cérébelleuse. Après la naissance, le

[32] Baraterio *et al.*, **2016**.
[33] Tauheed *et al.*, **2016**.
[34] Lu *et al.*, **2002**.
[35] Guerout *et al.* **2014**.
[36] Grimaldi *et al.*, **2009**.
[37] Hashimoto *et al.*, **2016**.

neuroépithélium bordant le 4ème ventricule continue à produire des OPCs en direction du cervelet **[38]**.

Au niveau du cerveau, la mise en place des oligodendrocytes se produit selon une dynamique similaire à celle observée au sein de la moelle épinière. Chez la Souris, trois vagues successives issues de trois régions distinctes permettent de peupler progressivement le cerveau selon une progression ventro-dorsale où l'ensemble de ces vagues expriment une combinaison de gènes spécifiques **[39]**. La première vague débute à E12,5 à partir des éminences ganglionnaires médianes et dérive de progéniteurs exprimant les gènes *Nk2 homeobox 1* (Nkx2.1). Des études de tracking cellulaire ont initialement mis en évidence que les OPCs issus de cette première vague disparaissent en postnatal, la population finale d'oligodendrocytes dérivant principalement des seconde et troisième vagues **[39]**. Cependant, une récente étude réalisée par Orduz et collaborateurs a démontré qu'une proportion des OPCs générés au cours de cette première vague de production survivent et présentent à terme des interactions neuronales **[40]**. Originaire des progéniteurs exprimant les gènes *GS homeobox 2* (Gsx2), la seconde vague est issue des éminences ganglionnaires médianes et latérales à E15,5. Enfin, la troisième vague, qui débute à la naissance, provient de la zone périventriculaire dorsale et dérive de progéniteurs exprimant les gènes *Empty spiracles homeobox 1* (Emx1). Il est intéressant de noter que ces vagues sont fonctionnellement redondantes, l'invalidation des progéniteurs d'une vague donnée étant compensée par les autres vagues de production d'OPCs **[39]**. Par ailleurs, l'ensemble de ces vagues provoque une surproduction d'OPCs, conduisant à une compétition spatiale et à une compétition pour l'accès aux facteurs de survie produits par les astrocytes et les neurones **[41]**.

Le déclenchement de ces vagues de production est soumis à la présence de gradients morphogénétiques, regroupant un ensemble de signaux moléculaires, tels que Shh, Wnt ou encore BMP, essentiels au développement du SNC. Ces derniers confèrent une identité de position aux cellules progénitrices, selon les axes antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral et régulent l'expression de facteurs de transcription permettant la diversité neuronale **[30]**. L'expression des facteurs de transcription Olig1 et Olig2 par les progéniteurs cellulaires, présente un rôle majeur dans l'oligodendrogenèse. De précédentes études ont ainsi mis en

[38] Zhang *et al.*, **1996**.
[39] Kessaris *et al.*, **2006**.
[40] Orduz *et al.*, **2019**.
[41] Kuhn *et al.*, **2019**.

évidence un défaut de développement des oligodendrocytes chez des souris double mutants Olig1/2, à la fois au niveau de la moelle épinière et au niveau cérébral [**29**].

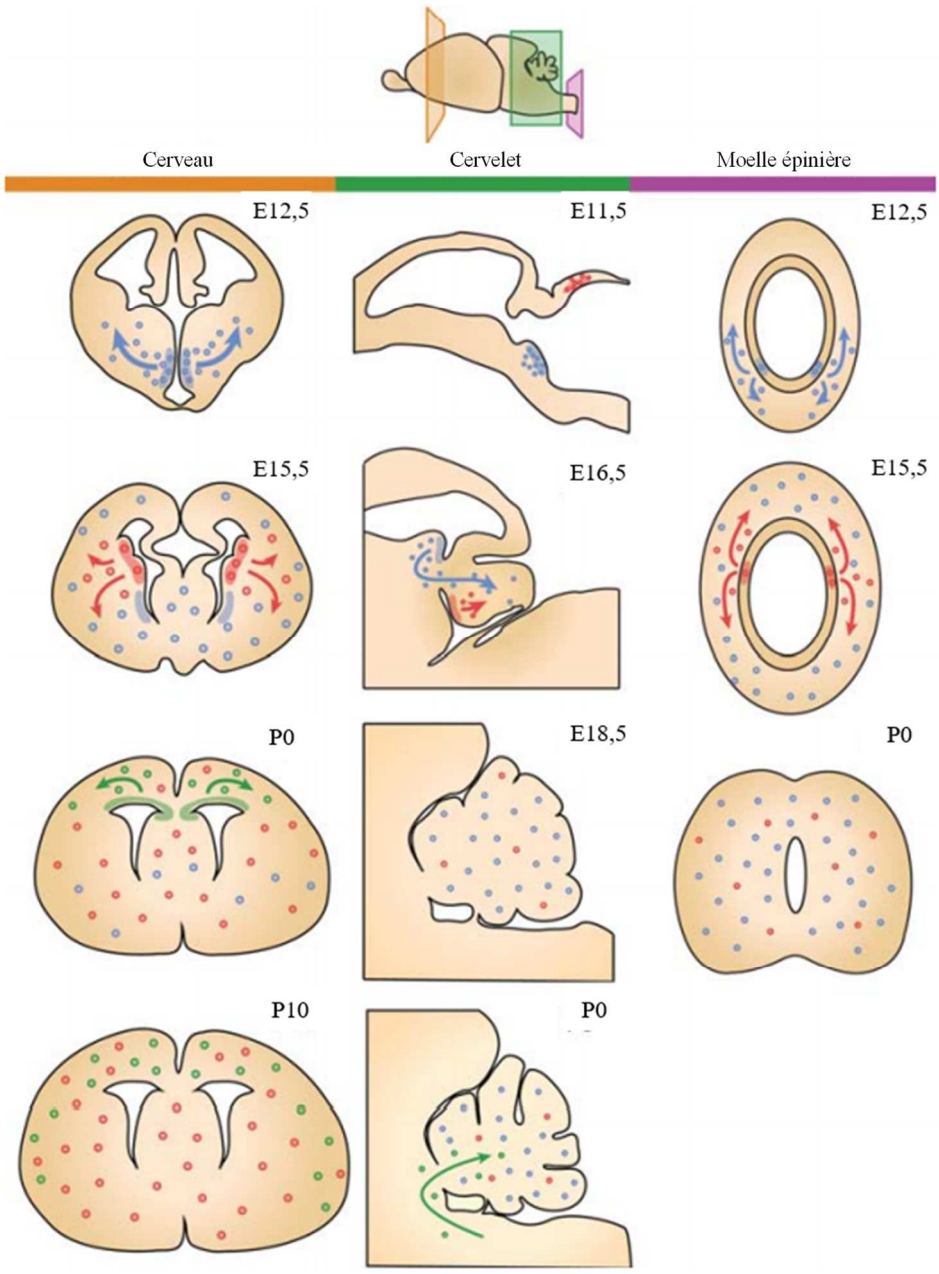


Figure 7 : Représentation schématique des vagues oligodendrocytaires peuplant le système nerveux central au cours du développement.

Le système nerveux central (cerveau, cervelet, moelle épinière) est peuplé par une production de vagues successives de précurseurs oligodendrocytaires selon une temporalité et une régionalisation bien définies. Au sein du cerveau, trois vagues émergent des éminences ganglionnaires médianes (bleue), des éminences ganglionnaires latérales (rouge) et de la zone périventriculaire (vert), respectivement à E12,5, E15,5 et au jour de naissance (P0). Au sein du cervelet, deux vagues sont responsables du peuplement oligodendrocytaire, issues des structures rhombomériques (bleue), et du quatrième ventricule (vert). Enfin, au niveau de la moelle épinière, les oligodendrocytes émergent des parties ventrale (bleue) puis dorsale de la moelle épinière. Modifiée d'après Van Tilborg *et al.*, 2018 [**27**].

c. Migration des oligodendrocytes

Afin d'atteindre leur destination finale, les OPCs migrent sur de grandes distances. Présentant une structure type « cône de croissance », ils sont sensibles à une grande variété de molécules chimiotactiques permettant leur guidance. La détermination de la direction migratoire est ainsi sous l'influence de gradients morphogénétiques des BMP, Shh et Wnt. A titre d'exemple, secrétés dans la région dorsale, les BMP guident les OPCs vers des aires cérébrales ventrales **[42]**. Traiffort et collaborateurs ont récemment démontré le rôle chémo-attractant de Shh dans la migration des OPCs à partir de cultures de nerfs optiques à E16,5 chez la Souris. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps spécifiquement dirigé contre Shh entraîne un blocage de la migration des OPCs **[43]**.

Les facteurs solubles produits localement par les cellules environnantes (neurones et astrocytes) peuvent également impacter la migration des OPCs. Des facteurs de croissance tels que le *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) ou encore *hepatic growth factor* (HGF) participent à la migration des oligodendrocytes **[44 ; 27]**. De multiples études ont ainsi démontré l'influence des facteurs de croissance tels que le VEGF-A, produit par les cellules endothéliales cérébrales **[45]** ou encore le HGF **[46]**, tous deux favorisant la migration des OPCs.

La migration oligodendrocytaire n'est cependant pas uniquement sous le contrôle de facteurs solubles, des interactions avec la matrice extracellulaire influençant cette dernière. Le déplacement des oligodendrocytes est ainsi favorisé par l'intervention de composants extracellulaires tels que la laminine, la fibronectine ou encore l'anosmine-1 **[27]**. De plus, des molécules d'adhésion neurales telles que les sémaphorines, la netrine-1 ou encore la *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1) modulent la migration oligodendrocytaire. A titre illustratif, la migration des OPCs est inhibée par CXCL1 au sein de la moelle épinière **[47]** et par la netrine-1 au sein du nerf optique **[48]**.

---

[42] Choe *et al.*, **2014**.
[43] Traiffort *et al.*, **2016**.
[44] Baraterio *et al.*, **2014**.
[45] Hayakawa *et al.*, **2012**.
[46] Yan *et al.*, **2002**.
[47] Tsai *et al.*, **2002**.
[48] Tsai & Miller, **2002**.

Les cellules environnantes prennent également part à la migration des OPCs. En effet, l'activité neuronale impacte le déplacement des oligodendrocytes. Le glutamate en interaction avec le récepteur sensible à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazol (AMPA-R) et le NMDA-R, également exprimés par les oligodendrocytes, stimule la migration des OPCs (**Figure 8** ; **[49]**).

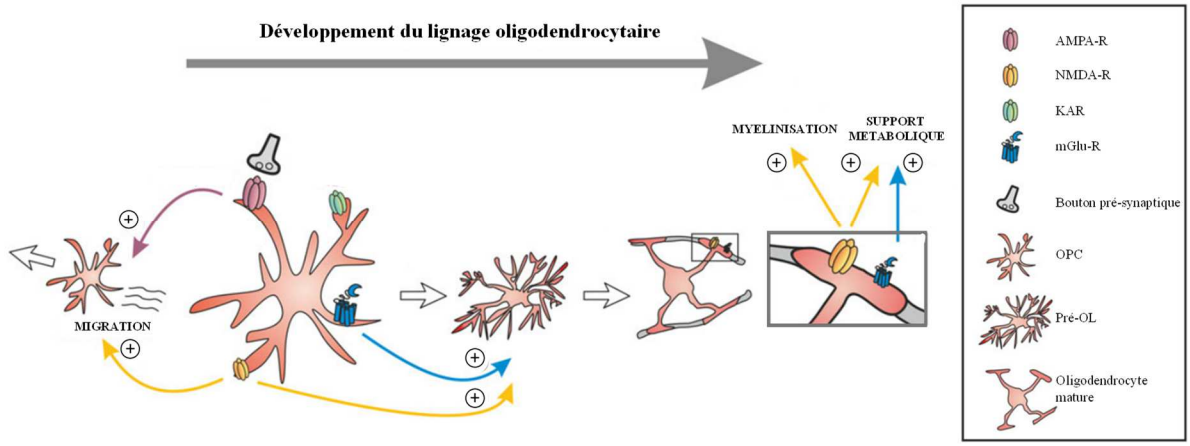


Figure 8 : Participation des récepteurs glutamatergiques à la mise en place des oligodendrocytes.

Les récepteurs glutamatergiques exercent une multitude d'actions sur le développement du lignage oligodendrocytaire, tantôt sur la migration et la différenciation, tantôt sur la myélinisation. Les récepteurs sensibles au NMDA (NMDA-R) et à l'AMPA (AMPA-R) stimulent la migration des précurseurs oligodendrocytaires (OPCs). Les récepteurs métabotropiques (mGlu-R) et les NMDA-R stimulent leur différenciation en pré-oligodendrocytes (pré-OL) et favorisent le support métabolique assuré par les oligodendrocytes. Modifiée d'après Habermacher, 2019 **[49]**.

Le système vasculaire est établi avant l'émergence des OPCs, permettant au cerveau en développement d'accéder à des besoins élevés en oxygène, glucose et autres facteurs trophiques circulants **[50]**. Cependant, un nouveau rôle beaucoup plus spécifique des microvaisseaux cérébraux a progressivement été identifié. Il a ainsi été mis en évidence *in vivo* chez la Souris par Tsai et collaborateurs que les oligodendrocytes migrent le long des vaisseaux cérébraux selon deux mécanismes : le « *crawling* » correspondant à un contact rapproché du corps cellulaire sur la surface endothéliale et le « *jumping* » caractérisant une extension cytoplasmique de l'oligodendrocyte d'un vaisseau à un autre, suivie d'une translocation de son corps cellulaire **[51]**. De plus, la voie Wnt et le récepteur *chemokine (C-X-C motif)*

[49] Habermacher *et al.*, **2019**.
[50] Daneman *et al.*, **2009**.
[51] Tsai *et al.*, **2016**.

receptor 4 (Cxcr4) ont été identifiés comme acteurs de cette migration vasculo-associée (**Figure 9**).

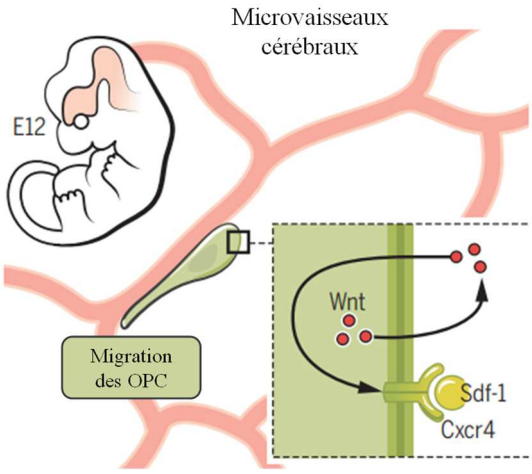


Figure 9 : Implication de la voie Wnt et de Cxcr4 dans la migration vasculo-associée des OPCs au cours du neurodéveloppement.

Grâce à la signalisation de la voie Wnt, une augmentation de l'expression de la chémokine Cxcr4 est retrouvée au sein des OPCs. L'interaction avec son ligand sdf-1 produit par les cellules endothéliales, permet le déclenchement migratoire des OPCs. Cxcr4 : *chemokine (C-X-C motif) receptor* 4 ; sdf-1 : *stromal-derived factor* 1. Modifiée d'après Dejana & Betsholtz, 2016 **[52]**.

Une augmentation des ARNm codant la protéine Cxcr4 par les OPCs est observée au sein des clusters OPCs/vaisseaux. L'utilisation d'un antagoniste de Cxcr4 entraîne des défauts de mise en place de ces clusters. Par ailleurs, une sur-stimulation de la voie Wnt au sein des oligodendrocytes provoque l'apparition de clusters oligodendrocytes/vaisseaux aberrants. En revanche, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt au sein des OPCs, inhibe ces clusters rn réduisant leur capacité migratoire **[51]**. Il est intéressant de noter qu'une communication entre les vaisseaux cérébraux et les oligodendrocytes existe. Yuen et collaborateurs ont ainsi démontré que les OPCs influencent l'angiogenèse en sondant les niveaux d'oxygène par l'intermédiaire le facteur *hypoxia inductible factor* (HIF). En réponse à un faible taux d'oxygène, une sécrétion du ligand Wnt7a/b est induite par les OPCs, entraînant une stimulation angiogénique **[53]**.

[52] Dejana & Betsholtz, **2016**.
[53] Yuen *et al.*, **2014**.

d. Prolifération et différenciation des oligodendrocytes

Arrivée à sa destination finale, la population oligodendrogliale s'étend par prolifération jusqu'à atteindre une balance homéostatique **[54]**. Une variété de signaux (tel que le PDGF) influe sur cette expansion oligodendrocytaire en stimulant la prolifération **[55]** ou en inhibant la différenciation (tels que Notch ou encore Wnt) **[56]** ; **[57]**. Le glutamate, l'un des neurotransmetteurs majoritaires au sein du SNC, joue un rôle prédominant aussi bien sur la survie et la prolifération que sur la différenciation des oligodendrocytes **[49]**. Ainsi, l'activation par le glutamate du AMPA-R exprimé par les oligodendrocytes, inhibe la prolifération des OPCs. L'utilisation d'antagonistes du AMPA-R stimule la prolifération des OPCs, confirmant le rôle inhibiteur des AMPA-R sur la prolifération oligodendrocytaire **[58]**. Par ailleurs, un rôle majeur des cellules endothéliales a été identifié dans la prolifération et la survie des oligodendrocytes **[59]**. De part la production de facteurs de croissance tels que le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), les cellules endothéliales agissent sous le contrôle de la voie de signalisation *phosphoinositide 3 kinase/AKT* (PI3K/Akt) nécessaire à la survie des oligodendrocytes **[60]**.Les cellules endothéliales favorisent également la prolifération des OPCs et à l'inverse, les oligodendrocytes favorisent un remodelage vasculaire au niveau de la substance blanche **[60]**. Chez l'adulte, un pool d'OPCs persiste et représente la population, en capacité de proliférer, la plus abondante au sein du SNC en conditions physiologiques **[35]**. En cas de lésion, une augmentation de la prolifération des OPCs est observée afin de compenser d'éventuelles pertes oligodendrocytaires et des défauts de migration ou de différenciation des oligodendrocytes (**[61]** ; **[39]**).

S'installant à proximité des axones, les OPCs entrent ensuite dans un processus de différenciation. Appartenant à un lignage bien défini, ces cellules sont caractérisées par quatre stades de maturation présentant une morphologie définie **[62]**. Avant d'acquérir leur capacité à myéliniser, les oligodendrocytes évoluent en différentes étapes de différenciation : les progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs, *Oligodendrocytes Precursor Cells*), les pré-

[54] Hughes *et al.*, **2013**.
[55] Calver *et al.*, **1998**.
[56] Givogri *et al.*, **2002**.
[57] Fancy *et al.*, **2011**.
[58] Fannon *et al.*, **2015**.
[59] Arai & Lo, **2009**.
[60] Miyamoto *et al.*, **2014**.
[61] Buffo *et al.*, **2008**.
[62] Back *et al.*, **2007**.

oligodendrocytes (Pré-OL), les oligodendrocytes immatures non myélinisants et les oligodendrocytes matures myélinisants (**Figure 10** ; **[63]**). Caractérisés par une morphologie bipolaire, les OPCs prolifèrent activement et disposent de propriétés migratoires importantes. Présentant une morphologie étoilée, le pré-oligodendrocyte est une cellule plus arborisée, et conserve sa capacité à se diviser. Le stade oligodendrocyte immature est marqué par la perte de capacité à se diviser. Enfin, l'oligodendrocyte mature aborde une morphologie richement arborisée. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'exposition des oligodendrocytes au glutamate ou au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) augmente la morphologie arborisée **[33]**. Chaque stade de maturation oligodendrocytaire exprime une combinaison de marqueurs spécifiques permettant leur identification (**Figure 10**). Cependant, des effecteurs communs sont retrouvés tout au long de la différenciation oligodendrocytaire tels que le facteur de transcription Olig2 **[63]**.

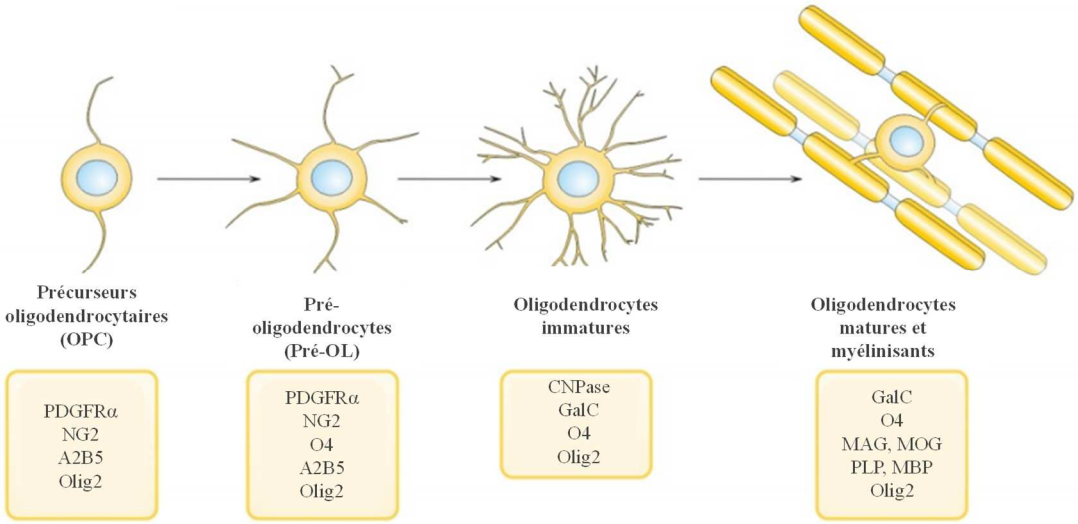


Figure 10 : Maturation des oligodendrocytes.

Selon le degré de maturité, les oligodendrocytes expriment différentes protéines qui peuvent être utilisées comme marqueurs du lignage oligodendrocytaire. La différenciation du progéniteur oligodendrocytaire est également associée à des modifications morphologiques permettant une caractérisation histologique. CNP : *2,3-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase* ; GalC : galactocérébroside ; MAG : *myelin-associated glycoprotein* ; MBP : *myelin basic protein* ; MOG : *myelin oligodendrocyte glycoprotein* ; NG2 : *neural/glial antigen 2*; PDGFRα : *platelet-derived growth factor receptor-α* ; PLP : *proteolipid protein* ; Olig2 : *oligodendrocyte transcription factor 2*. D'après Back *et al*., 2007 **[62]** et modifiée d'après Podbielska *et al*., 2013 **[63].**

La mise en place des différents stades s'effectue selon des fenêtres temporelles données, une correspondance entre l'Homme et la Souris étant retrouvée. Chez la Souris, un fort taux de pré-OL est retrouvé au second jour de vie postnatal (P2) dans la substance blanche,

[63] Podbielska *et al*., **2013**.

comparativement à P7, où 80 % des cellules composant la substance blanche sont des oligodendrocytes immatures **[64]**. Les premières cellules MBP-positives (*myelin basic protein* ; MBP) apparaissent chez les rongeurs à P7, leur quantité étant considérablement augmentée à P14 **[65]**.

L'organisation de la différenciation des oligodendrocytes, aboutissant à la formation d'oligodendrocytes matures et myélinisants, résulte d'une série d'évènements fortement coordonnés. Des mécanismes extrinsèques et intrinsèques variés sont impliqués. D'ores et déjà acteurs de la production et la migration oligodendrocytaire, les voies signalétiques de Shh, Wnt, BMP et Notch, jouent un rôle de régulateur en modulant la chromatine et en influençant la mécanistique transcriptionnelle au travers d'une balance entre activateurs et répresseurs de la transcription **[66]**. A titre d'exemple, l'activité de la voie Wnt/β-caténine conduisant à l'expression du facteur de transcription Tcf4, est réduite au sein des oligodendrocytes matures. Cette action semble en effet nécessaire à la différenciation oligodendrocytaire, la suractivation de cette voie conduisant à un blocage de la différenciation des oligodendrocytes et à une hypomyélinisation **[67]**.

Par ailleurs, de multiples facteurs de transcription sont impliqués dans la mise en place des oligodendrocytes post-mitotiques et matures, tels que Olig1, Nkx2.2, Sox10, Tcf4 ou encore YY1 **[68]**. Cependant, le facteur de transcription Olig2 joue un rôle central au sein du lignage, présentant des actions aux multiples facettes conduisant à une subtile régulation du développement de la population oligodendrogliale. En utilisant une approche d'invalidation conditionnelle du gène Olig2 dans les OPCs et les oligodendrocytes immatures, l'équipe de Mei et collaborateurs a ainsi pu mettre en évidence un double rôle d'Olig2 en fonction du stade de différenciation. D'une part, Olig2 présente un rôle d'activateur de la différenciation des oligodendrocytes, l'invalidation de Olig2 au sein des OPCs conduisant à une inhibition de la différenciation des oligodendrocytes. D'autre part, l'invalidation de Olig2 au sein des oligodendrocytes immatures entraîne une augmentation de la différenciation, traduisant un rôle d'inhibiteur de la différenciation **[69]**.

---

[64] Dean *et al.*, **2011**.
[65] Hardy *et al.*, **1996**.
[66] Copray *et al.*, **2009**.
[67] Fancy *et al.*, **2009**.
[68] Wegner *et al.*, **2008**.
[69] Mei *et al.*, **2013**.

Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle central des modulations épigénétiques dans la maturation oligodendrocytaire, faisant intervenir un remodelage de la chromatine par des histones désacétylase (HDAC) et par des histones acétyltransferase (HAT). Bien que le rôle des HAT dans le développement oligodendrocytaire soit peu étudié, de nombreuses recherches ont pu démontrer le rôle essentiel des HDAC **[70]**. La désacétylation des histones par les HDAC provoque une compaction de l'ADN qui conduit à une baisse d'expression génique. L'équipe de Ye et collaborateurs a mis en évidence le rôle essentiel des HDAC de catégorie 1 et 2 (HDAC 1 et HDAC 2), leur invalidation génique par système Cre-LoxP chez la Souris, conduisant à des défauts de différenciation oligodendrocytaire mais également des défauts de myélinisation **[71]**. De plus, une inhibition de ces HDAC par traitement pharmacologique à l'acide valproïque provoque un blocage de la différenciation des oligodendrocytes à la fois *in vitro* **[72]** et *in viv*o chez le Rat **[73]**. Par ailleurs, ce même traitement entraîne chez l'Homme une inhibition de la différenciation des OPCs **[74]**.

A l'instar des HDAC, certains micro-ARN (miARN) ont récemment été identifiés comme acteurs majeurs de la différenciation oligodendrocytaire et de la myélinisation. Ces ARN simple brin offrent ainsi un nouveau niveau de régulation permettant des modifications post-transcriptionnelles. Dugas et collaborateurs ont notamment démontré leur implication dans le développement des oligodendrocytes en agissant directement sur la machinerie des miARN. L'invalidation conditionnelle chez la Souris de Dicer1, protéine impliquée dans l'interférence ARN, entraîne des retards de myélinisation **[75 ; 76]**. Par ailleurs, les miARN-219 et miARN-338 ont été identifiés comme régulant positivement la différenciation oligodendrocytaire. Ces derniers contrôlent l'oligodendrogenèse en interagissant directement avec des régulateurs négatifs de la différenciation oligodendrocytaire tels que Hes5 et Sox6 **[75 ; 76]**.

D'ores et déjà impliqués dans la prolifération des OPCs, le glutamate et les récepteurs glutamatergiques jouent également un rôle dans la différenciation des oligodendrocytes. L'étude de Chen et collaborateurs a en effet démontré qu'une mutation spécifique de la sous-unité GluA2, composante du AMPA-R, modifie les courants induits par ce dernier,

[70] Emery *et al.*, **2015**.
[71] Ye *et al.*, **2009**.
[72] Marin-Husstege *et al.*, **2002**.
[73] Shen *et al.*, **2005**.
[74] Conway *et al.*, **2012**.
[75] Dugas *et al.*, **2010**.
[76] Zhao *et al.*, **2010**.

conduisant à une réduction de la différenciation des OPCs en oligodendrocytes matures **[77]**. De manière similaire, le NMDA-R stimule la différenciation des oligodendrocytes par le biais de l'activation de la voie mTOR **[78]**.

e. Myélinisation au sein du système nerveux central

Situés à proximité des fibres nerveuses, les oligodendrocytes permettent la formation de la gaine de myéline par enroulement progressif interne de leurs prolongements cytoplasmiques autour des fibres axonales, également nommés internœuds (**Figure 11**).

Chaque oligodendrocyte myélinise en moyenne entre 20 et 60 axones, présentant des internœuds d'une longueur oscillant entre 20 et 200 micromètres, situés sur des axones différents **[79]**. La myélinisation est un processus complexe, ne produisant pas d'oligodendrocytes matures et myélinisants surnuméraires. Afin d'obtenir le nombre d'oligodendrocytes correspondant au nombre d'axones à myéliniser, ceux-ci sont produits en excès, et les surnuméraires sont éliminés par apoptose **[80]**. Chez la Souris, la surexpression de PDGF entraîne une augmentation drastique du nombre d'OPCs au sein de la moelle épinière **[55]**. La compétition pour l'accès aux facteurs de croissance constitue un mode de régulation permettant la persistance d'un nombre donné d'oligodendrocytes myélinisants. Il est intéressant de noter que tous les axones ne sont pas myélinisés, le diamètre de ces derniers influençant l'initiation de leur myélinisation **[81]**. En effet, au sein du SNC, le diamètre seuil des axones à myéliniser a été identifié à 0,2 µm **[82]**.

Structurellement, un axone myélinisé présente donc à la fois des segments avec gaine de myéline, les internodes, et des segments sans, appelés nœud de Ranvier, où la surface axonale est exposée (**Figure 11** ; **[83]**). Par ailleurs, de nombreuses études de microscopie électronique ont révélé l'ultrastructure complexe de la myéline, la gaine de myéline étant elle-même subdivisée en deux catégories distinctes, à savoir la myéline compacte et la myéline non compacte. En effet, au niveau des nœuds de Ranvier, la gaine de myéline s'interrompt de

[77] Chen *et al.*, **2018**.
[78] Li *et al.*, **2013**.
[79] Chong *et al.*, **2012**.
[80] Raff *et al.* **1993**.
[81] Lee *et al.*, **2012**.
[82] Waxman & Bennett, **1972**.
[83] Edgar & Griffiths, **2014**.

manière progressive, définissant une zone paranodale (zone avant le nœud de Ranvier), au sein de laquelle la gaine de myéline présente une relation extrêmement étroite avec le neurone.

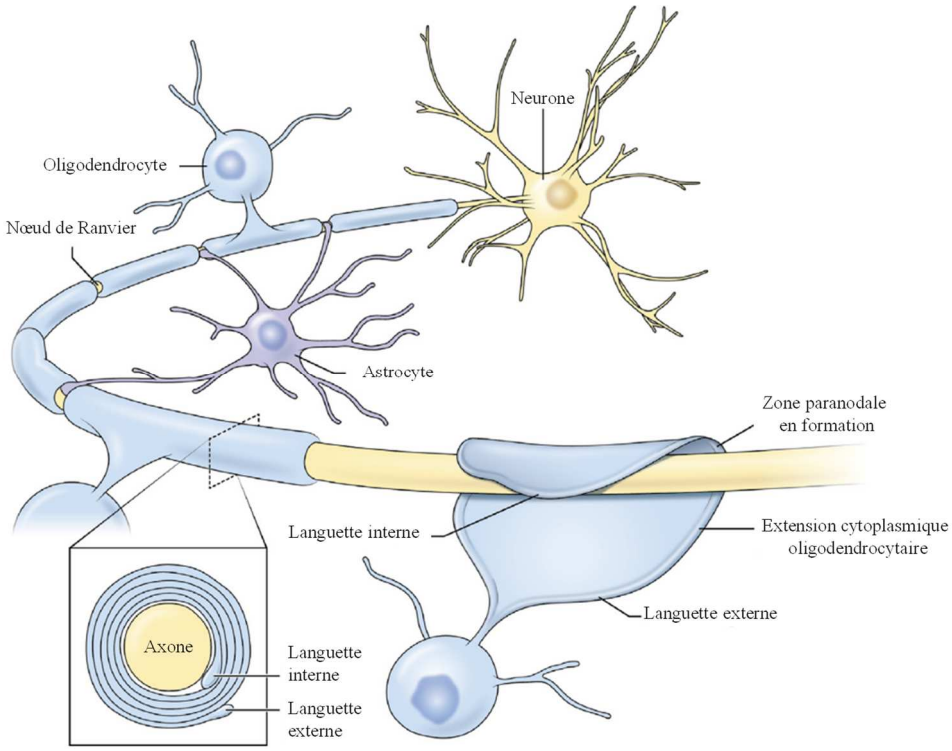


Figure 11 : Schématisation de la formation de la gaine de myéline.

La gaine de myéline se forme par enroulement compact de prolongements oligodendrocytaires autour de l'axone, le premier correspondant à la languette interne, et le dernier, à la languette externe. Présentant une structure lamellaire due à cette superposition de couches myéliniques, la gaine de myéline est caractérisée par une alternance de bandes sombres et de bandes claires, correspondant respectivement aux lignes denses majeures et mineures. Modifiée d'après Fields & Dutta, 2019 **[84]**.

Au cœur de cette zone, le cytoplasme oligodendrocytaire est progressivement exclu permettant l'émergence d'une myéline compacte **[85]**, directement associée à l'existence de points d'ancrage entre protéines transmembranaires neuronales telles que la contactine et la paranodine, et oligodendrocytaires telles que la neurofascine **[86]**. Enfin, entre deux zones paranodales, la zone juxta-paranodale correspond à la myéline non compacte, caractérisée par une persistance du cytoplasme oligodendrocytaire (**Figure 12** ; **[87]** ; **[88]**).

[84] Fields & Dutta, **2019**.
[85] Snaidero *et al.*, **2014**.
[86] Salzer *et al.*, **2008**.
[87] Simon & Nave, **2015**.
[88] Duncan *et al.*, **2021**.

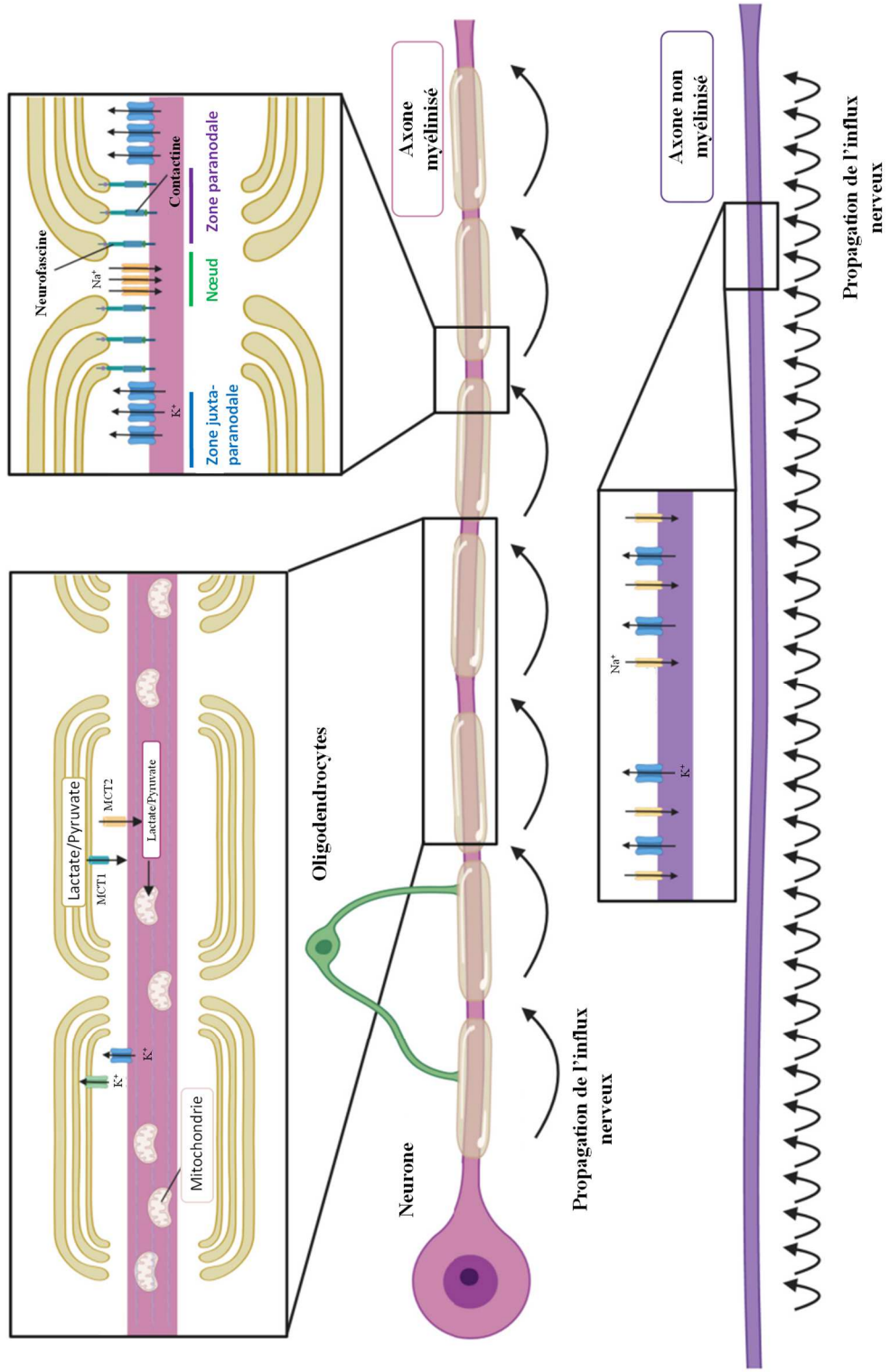


Figure 12 : Illustration de la régulation de la conductance axonale.

Les oligodendrocytes régulent la structure, la conduction et la survie axonale. L'organisation spécifique de la gaine de myéline est permise grâce à des interactions oligodendrocytes/neurones de type neurofascine/contactine. La réorganisation des canaux ioniques voltage-dépendant permet la propagation de l'influx nerveux par conductance saltatoire. Enfin, les oligodendrocytes fournissent un support métabolique conséquent grâce aux métabolites énergétiques (lactate/pyruvate) et aux transporteurs de monocarboxylate (MCT1 et MCT2). Modifiée d'après Duncan *et al.*, 2021 **[88]**.

La transmission du message nerveux s'effectue grâce à la propagation d'un potentiel d'action le long de l'axone, défini comme une inversion transitoire du potentiel électrique à la membrane cellulaire. Ce mécanisme dépend d'une concentration différentielle des ions sodiques (Na^+) et potassiques (K^+) de part et d'autre de l'axolemme, associée au repos à un espace extracellulaire fortement concentré en Na^+ et faiblement en K^+. La présence le long de l'axone de canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants permet les mouvements ioniques respectivement nécessaires aux phases de dépolarisation et de repolarisation membranaires. Au sein des axones myélinisés, l'organisation structurelle globale des canaux voltage-dépendants est modifiée. En raison de l'absence de myéline au niveau des nœuds de Ranvier, une forte concentration de canaux sodiques y est retrouvée, entraînant une conductance saltatoire de l'influx nerveux, passant rapidement d'un nœud de Ranvier à l'autre. Par ailleurs, les canaux potassiques voltage-dépendants se réorganisent, concentrant leur localisation au niveau des régions paranodales, où un flux de K^+ est libéré au niveau de l'espace péri-axonal lors de la phase de repolarisation (**Figure 12** ; **[89]**). Ainsi, au niveau d'un axone myélinisé, une impulsion nerveuse est capable d'atteindre une vitesse de 100 m/s, soit 100 fois plus rapide qu'au niveau d'un axone non myélinisé de même diamètre **[90]**. Le diamètre des axones influence la vitesse de conduction de l'influx nerveux, celle-ci étant proportionnelle au diamètre de l'axone pour une fibre myélinisée, alors qu'elle est proportionnelle à la racine carrée du diamètre de l'axone pour une fibre non myélinisée. Ainsi, la gaine de myéline permet une économie d'espace au sein du SNC. Enfin, la myélinisation des axones engendre une économie d'énergie, directement associée à des dépenses énergétiques uniquement localisées au sein des nœuds de Ranvier afin de déclencher les potentiels d'action **[88]**.

Véritables effecteurs de la myélinisation, les oligodendrocytes matures myélinisants expriment de manière ordonnée un panel de protéines myéliniques à savoir la MBP, la *myelin proteolipid protein* (PLP), la *myelin-associated glycoprotein* (MAG), et la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) ; **[91]**, la MBP et la PLP étant les plus abondantes **[88]**. Les protéines myéliniques ne sont cependant pas les composants majoritaires de la gaine de myéline, cette dernière étant en grande partie composée de lipides, à hauteur de 70 %, permettant sa stabilité **[88]**. Cependant, les protéines myéliniques jouent un rôle primordial dans

[89] Poliak *et al.*, **2003**.
[90] Verkhrastky & Butt, **2013**.
[91] Nawaz *et al.*, **2015**.

la conformation de la gaine de myéline (**Figure 13**). Initialement présents au niveau des corps cellulaires des oligodendrocytes, les ARNm codant la MBP, protéine myélinique majoritaire représentant 30 % des protéines myéliniques, sont transportés au sein de granules cytoplasmiques à destination de la membrane myélinique **[92]**. Arrivés à la surface externe de la gaine de myéline, la polymérisation des monomères de MBP permet l'accolement des hémi-membranes externes (**Figure 13**) et ainsi la compaction de la gaine de myéline. Par ailleurs, ces interactions avec le cytosquelette tels que les filaments d'actine présents dans la bicouche lipidique, renforcent la compaction de la gaine de myéline **[93]**. En effet, l'invalidation de la MBP entraîne une quasi-absence de la gaine de myéline, associée à des défauts de compaction **[94]**, et les souris invalidées présentent une espérance de vie réduite à trois mois **[94]**.

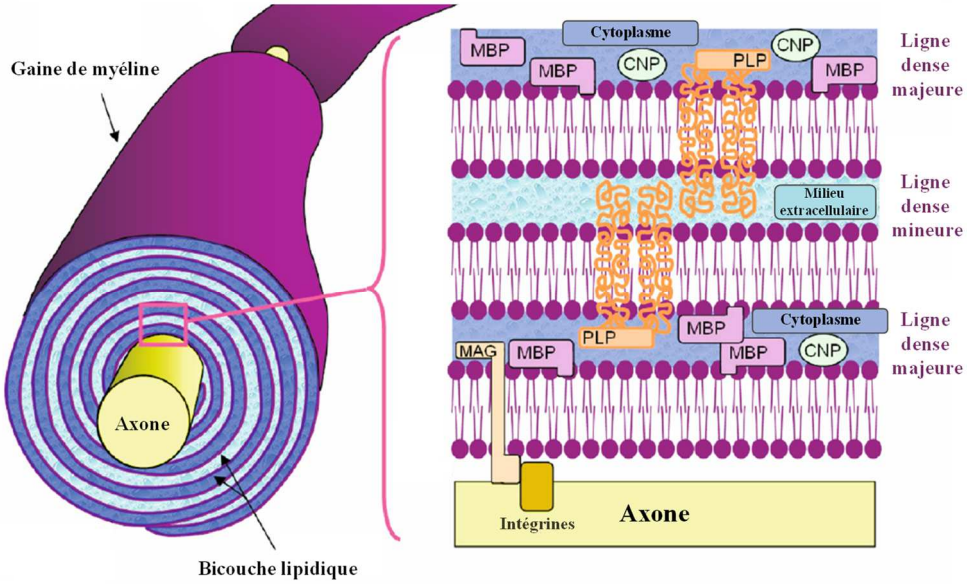


Figure 13 : Représentation schématique des constituants de la gaine de myéline.

La gaine de myéline est composée d'une multitude de molécules lipidiques et protéiques, ayant divers rôles dans la constitution et la compaction de la gaine de myéline. La CNP participe à la croissance des prolongements cytoplasmiques des oligodendrocytes initiant le processus de myélinisation. Situées à la surface cytosolique, les protéines MBP se fixent aux filaments d'actine présents dans la bicouche lipidique et participent ainsi au processus de fusion membranaire. Enfin, les PLP participent à la création de jonctions membranaires et stabilisent les faces extracellulaires des couches de myéline. CNP : *2,3-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase* ; MAG : *myelin-associated glycoprotein* ; MBP : *myelin basic protein* ; PLP : *proteolipid protein.* Modifiée d'après Laule *et al.*, 2007 **[95]**.

Il apparaît cependant nécessaire qu'un mécanisme régule le pouvoir compactant de la MBP (**Figure 14**). Majoritairement exprimée par les oligodendrocytes immatures, une faible

[92] Colman *et al.*, **1982**.
[93] Boggs & Wang, **2004**.
[94] Chernoff *et al.*, **1981**.
[95] Laule *et al.*, **2007**.

expression de la *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNP) par les oligodendrocytes matures persiste, et participe activement à la régulation de la compaction myélinique au cours du développement cérébral. Les travaux de l'équipe de Gravel ont démontré l'existence d'un équilibre entre l'isoforme 1 de la CNP et la MBP, présentant des rôles antagonistes. En effet, la surexpression de la CNP1 conduit à un défaut de compaction **[96]**. En revanche, l'invalidation de la protéine CNP1 chez la Souris provoque une accélération de la compaction myélinique et, à terme une myélinisation aberrante **[85]**. Par ailleurs, les oligodendrocytes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité neuronale, l'absence de CNP chez la Souris entraînant une dégénérescence sévère de l'axone, également retrouvée chez les souris invalidées pour la PLP **[97]**.

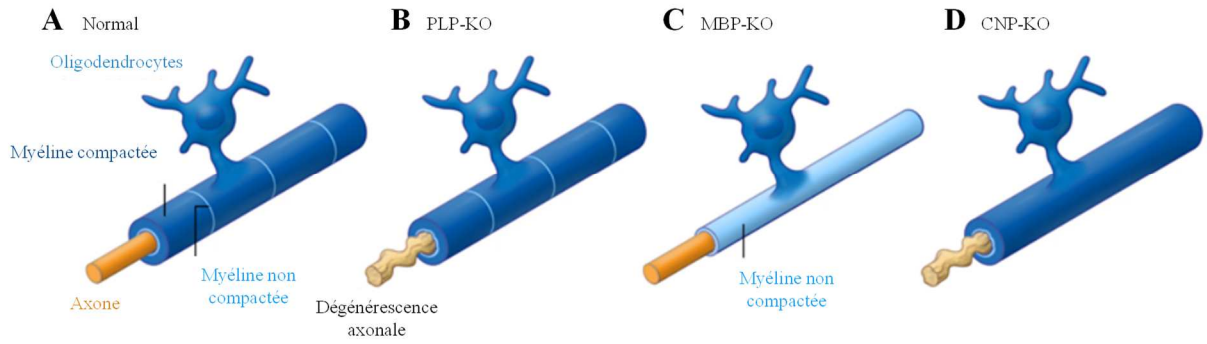


Figure 14 : Importance des protéines myéliniques dans l'intégrité neuronale.

(A) En condition physiologique, la gaine de myéline se met en place autour de l'axone, présentant une succession de portions compactée et non compactée. (B) L'invalidation de la PLP provoque une dégénérescence axonale, bien que la gaine de myéline apparaisse structurellement normale. (C) L'absence de MBP conduit à une décompaction de la myéline, conduisant à la mise en place d'une gaine de myéline particulièrement fine. (D) L'invalidation de la CNP entraîne une sur-compaction de la gaine de myéline associée à une dégénérescence axonale. CNP : *2,3-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase* ; MBP : *myelin basic protein* ; PLP : *proteolipid protein.* Modifiée d'après Philips & Rothstein., 2017 **[97]**.

De récentes études ont mis en lumière le rôle de support métabolique des oligodendrocytes au sein de l'unité neuro-oligodendrocytaire. Accumulant du lactate au niveau intracellulaire, les oligodendrocytes sont en mesure de le libérer au sein de l'espace péri-axonal grâce au *monocarboxylate transporter 1* (MCT1), qui permet le co-transport de monocarboxylates tels que le lactate ou le pyruvate. Une fois libéré, le lactate est récupéré par le neurone grâce au *monocarboxylate transporter 2* (MCT2), exprimé au niveau axonal, fournissant alors un substrat métabolique à la demande énergétique neuronale (**Figure 15** ; **[88]**

[96] Gravel *et al.*, **1996**.
[97] Philips & Rothstein, **2017**.

; **[98]**). L'invalidation spécifique de MCT1 au sein des oligodendrocytes provoque une sévère dégénérescence axonale sans altération de la gaine de myéline, consolidant ainsi le rôle essentiel des oligodendrocytes en tant que support métabolique **[81]**. Par ailleurs, les oligodendrocytes permettent un apport énergétique grâce à l'expression du transporteur de glucose de type 1 (Glut1), lui-même régulé par l'activité du NMDA-R **[99]**. Ce dernier, préférentiellement exprimé au niveau des prolongements oligodendrocytaires et de la gaine de myéline, stimule en effet l'entrée de glucose issu de l'espace extracellulaire vers la gaine de myéline **[99 ; 100]**.

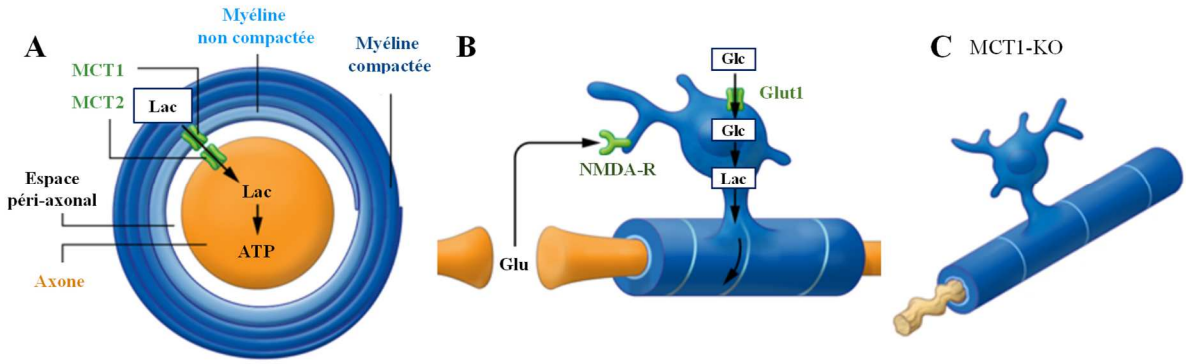


Figure 15 : Rôle des oligodendrocytes dans le support métabolique axonal.

(A) Au travers l'expression de MCT1 et MCT2, respectivement par les oligodendrocytes et par les neurones, un transport du lactate s'effectue des oligodendrocytes vers les neurones, conduisant *in fine* à la production d'ATP. (B) Le support métabolique assuré par les oligodendrocytes est lui-même régulé par la liaison du glutamate (Glu) sur ses NMDA-R. Par ailleurs, une augmentation de l'entrée de glucose au sein des oligodendrocytes est possible au travers l'expression du transporteur Glut1 par les oligodendrocytes. (C) L'invalidation de MCT1 au sein des oligodendrocytes conduit à une dégénérescence axonale malgré une gaine de myéline structurellement normale. Modifiée d'après Philips & Rothstein, 2017 **[97]**.

Sous l'influence de facteurs de transcription tels que Olig2, Sox10 et le *myelin regulatory factor* (Myrf ; **[101 ; 70]**), l'expression des protéines myéliniques par les oligodendrocytes traduit la fin du processus de maturation oligodendrogliale et l'engagement des cellules dans la voie de la myélinisation **[33]**. Soumise à de multiples régulateurs de la maturation oligodendrogliale, la myélinisation du SNC peut être directement impactée par ces effecteurs **[70]**. Ainsi, chez la Souris, l'invalidation conditionnelle de Myrf provoque le maintien du stade pré-myélinisant des oligodendrocytes, conduisant à un défaut de myélinisation du SNC et à une mort postnatale **[102]**. Outre son implication dans l'initiation de la myélinisation, Myrf est

[98] Morrison *et al.*, **2013**.
[99] Saab *et al.*, **2016**.
[100] Salter & Fern, **2005**.
[101] Bujalka *et al.*, **2013**.
[102] Emery *et al.*, **2009**.

également essentiel au maintien de la gaine myélinique, son invalidation au niveau des oligodendrocytes matures provoquant la dégénérescence de la gaine de myéline **[103]**.

f. Vulnérabilité et pathologies

La myélinisation des axones par les oligodendrocytes constitue l'une des transformations cellulaires les plus complexes, aboutissant à des interactions cellulaires des plus importantes pour le bon fonctionnement et la transmission des messages nerveux. Acteurs décisifs, la perturbation de cette unité oligodendrocyte/neurone ainsi que l'altération de la gaine de myéline, constituent des causes de pathologies. Plusieurs types de pathologies sont ainsi retrouvés tels que les pathologies démyélinisantes, associées à une dégradation progressive de la gaine de myéline retrouvée dans le cadre de la sclérose en plaque **[33]**, ou encore des pathologies dysmyélinisantes, associées à une formation de gaine de myéline défectueuse retrouvée dans le cadre de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. Par ailleurs, les atteintes cérébrales survenant dans le cadre de la prématurité, coïncident avec une fenêtre de vulnérabilité des pré-oligodendrocytes peuplant la substance blanche **[104]**. Des atteintes inflammatoires ou encore des évènements hypoxiques peuvent ainsi constituer un milieu non favorable à la maturation des oligodendrocytes et à la myélinisation du SNC **[105]**. De multiples altérations de la substance blanche telles que les leucomalacies kystiques ou diffuses, sont alors retrouvées chez les enfants nés prématurément, et directement associés à des désordres neurologiques affectant les fonctions motrices et cognitives **[106]**.

g. Développement des oligodendrocytes : murin *versus* humain

La mise en place des oligodendrocytes et, par extension, de la substance blanche présente de nombreuses similitudes chez l'Homme et la Souris. Chez l'Homme, les quatre stades de maturation oligodendrocytaire sont retrouvés entre la 10ème et la 41ème semaine de grossesse (SG) **[32]**. Les premiers OPCs sont détectables autours de la 10ème SG, émergeant des éminences ganglionnaires latérale et médiane, puis de la zone ventriculaire, et migrent progressivement vers la plaque corticale. Suivant une dynamique semblable à celle des rongeurs, les différents stades oligodendrocytaires s'organisent, et permettent l'émergence d'oligodendrocytes matures myélinisants (**Figure 16** ; **[32]**). Bien que la myélinisation du

[103] Koenning *et al.*, **2012**.
[104] Back *et al.*, **2001**.
[105] Van Tilborg *et al.*, **2016**.
[106] Back et Miller, **2014**.

cerveau commence à la fin du troisième trimestre, cette dernière est majoritaire au cours de la première année de vie et continue pendant plusieurs années jusqu'à l'adolescence, certaines régions frontales continuant à être myélinisées plus tardivement **[107]**.

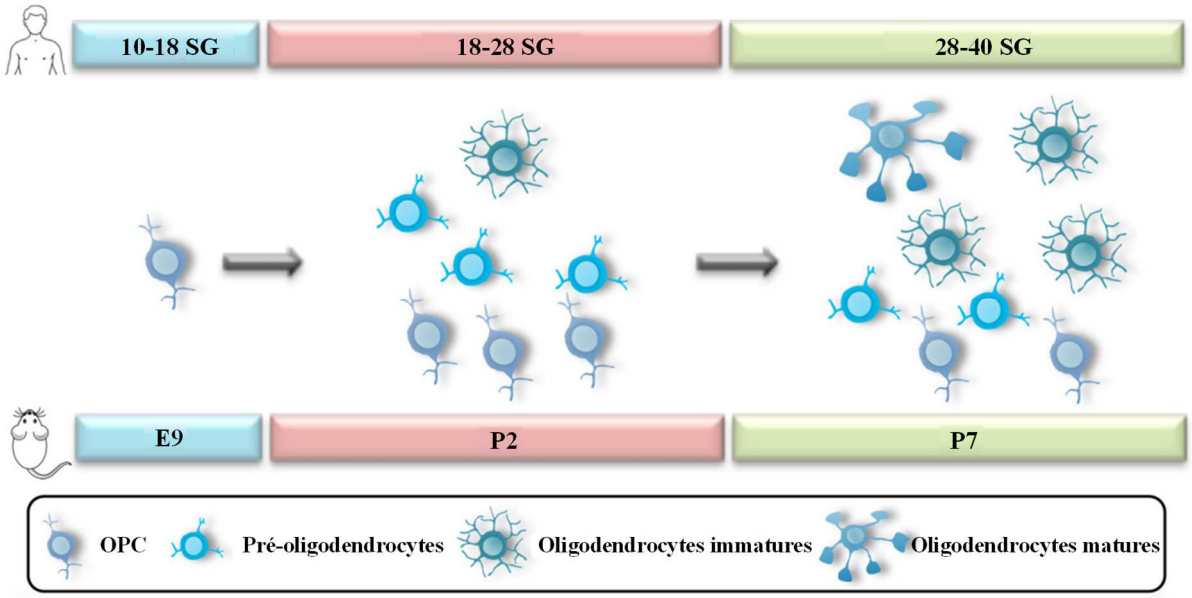


Figure 16 : Correspondance développementale du lignage oligodendrocytaire chez l'Homme et la Souris.

Chez l'Homme, les OPCs émergent à 10 semaines de grossesse (SG), leur période de prolifération s'étendant jusqu'à la 20ème SG. Entre 18 et 28 SG, le lignage oligodendrocytaire est constitué en majorité d'OPCs et de pré-oligodendrocytes mais également de quelques oligodendrocytes immatures. Une forte différenciation entre 28 et 40 SG permet l'augmentation du pool d'oligodendrocytes immatures, ainsi que l'apparition des oligodendrocytes matures. Les premières cellules MBP-positives apparaissent vers la 20ème SG, leur nombre augmentant progressivement à partir de la 28ème SG. La myélinisation cérébrale débute au cours du troisième trimestre, mais reste majoritaire au cours de la première année de vie. Chez la Souris, la dynamique de progression oligodendrocytaire est comparable aux trois fenêtres identifiées chez l'Homme : 10-18 SG, 18-28 SG et 28-40 SG ; correspondant respectivement à des fenêtres débutant à E9, P2 et P7 chez le rongeur. D'après Barateiro *et al.*, 2016 **[32]** et modifiée d'après Van Tilborg *et al.*, 2018 **[27]**.

Les schémas de myélinisation du cerveau présentent un fort degré de ressemblance entre l'Homme et les rongeurs (Rat, Souris). En effet, la myélinisation s'effectue selon une progression caudo-rostrale et ventro-dorsale. A titre illustratif, au cours des trois premiers mois de vie, les structures issues du mésencéphale seront myélinisées, comparativement aux structures corticales, débutant du cortex occipital vers le cortex préfrontal, qui ne seront myélinisées que plus tardivement (**Figure 17** ; **[32]** ; **[108]**).

[107] Bartzokis *et al.*, **2001**.
[108] Jakovcevski *et al.*, **2009**.

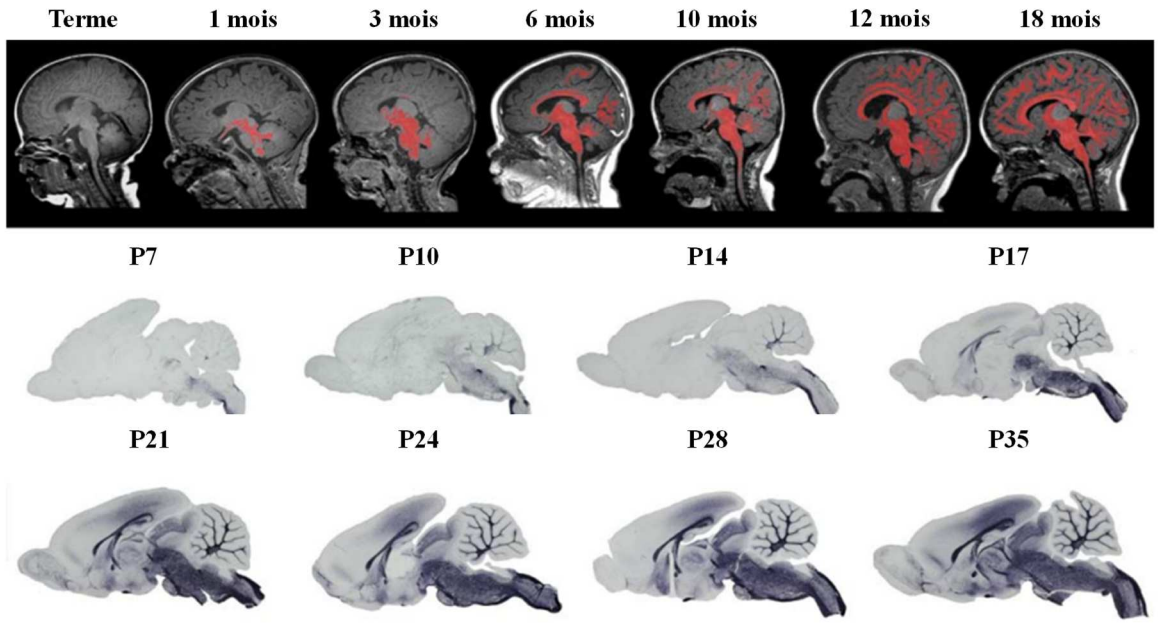


Figure 17 : Vue d'ensemble du processus de myélinisation du cerveau chez l'Homme et le Rat.

Visualisation par imagerie à résonance magnétique (IRM) de la myélinisation cérébrale chez l'Homme du terme aux 18ème mois de l'enfant. Les sections myélinisées sont identifiées en rouge. Chez le Rat, la myélinisation du cerveau est identifiée par marquage de la MBP de P7 à P35. Les processus de myélinisation cérébrale présentent une progression semblable chez l'Homme et le Rat. MBP : *myelin basic protein*. Modifiée d'après Van Tilborg *et al.*, 2018 **[27]**.

Malgré leurs nombreuses similitudes, des différences entre le développement oligodendrocytaire murin et humain sont retrouvées, notamment le volume de substance blanche, directement associé à l'augmentation de la complexité des fonctions neurologiques au cours de l'évolution **[30]**. L'une des différences notables entre ces deux espèces réside au niveau de la maintenance des oligodendrocytes **[109]**. Chez le rongeur, un fort *turn-over* des oligodendrocytes est observé, il est essentiel à la maintenance de la myéline. Comparativement, chez l'Homme, le *turn-over* oligodendrocytaire est faible, de l'ordre de 0,3 %, impliquant que les oligodendrocytes myélinisants survivent plus longtemps que chez les rongeurs **[53]**.

3. Les acteurs de la vascularisation cérébrale

a. Mise en place du réseau vasculaire

Chez l'Homme adulte, bien que le cerveau représente environ 2 % de la masse totale d'un individu, ce dernier consomme 20 % d'oxygène, soulignant le rôle essentiel du réseau

[109] Young *et al.*, **2013**.

vasculaire permettant les différents apports à la structure cérébrale. Concomitant à la formation des principaux vaisseaux du système cardiovasculaire, le développement de la circulation cérébrale chez l'Homme débute autour de la 7ème semaine de grossesse. Le réseau vasculaire se développe selon deux mécanismes : vasculogenèse et angiogenèse. Caractérisée par la différenciation des cellules précurseurs issues du mésoderme en cellules endothéliales matures, la vasculogenèse permet la formation *de novo* d'un réseau vasculaire primitif **[110]**. L'angiogenèse permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, permettant ainsi la croissance et le remodelage du réseau vasculaire primitif en un réseau vasculaire complexe **[111]**. Contrairement à la vasculogenèse qui s'effectue au cours de l'embryogenèse **[111]**, l'angiogenèse a lieu à la fois au cours de la période embryonnaire et chez l'adulte, en conditions physiologiques comme pathologiques **[110]**.

Du fait de l'absence de cellules précurseurs vasculaires au sein du SNC, la vascularisation cérébrale se met en place par angiogenèse, c'est-à-dire par invasion des vaisseaux au sein du cerveau et de la moelle épinière **[112]**. Les vaisseaux issus de la pie-mère, également nommé vaisseaux perforants, envahissent le SNC, convergeant de façon centripète vers les ventricules **[113]**. Après avoir atteint le réseau péri-ventriculaire, des branches vasculaires secondaires ventrifuges et des collatérales issues des vaisseaux perforants permettent l'irrigation du parenchyme cérébral **[113]**. S'organisant de manière séquentielle, la vascularisation cérébrale suit un gradient cranio-caudal, et se met en place selon trois niveaux d'organisation. Le premier niveau dépend de la mise en place de deux plexus vasculaires (**Figure 18**) : l'arc carotidien, premier réseau artériel assurant 80 % de la vascularisation de la boîte crânienne, et l'arc du tronc basilaire, qui permet l'alimentation vasculaire du rhombencéphale et du mésencéphale. Le second niveau d'organisation consiste en la réunion de ces deux réseaux artériels, permettant l'émergence du polygone de Willis, système de suppléance assurant l'arrivée de sang aux différentes régions du cerveau en cas de baisse de flux sanguin. Enfin, la mise en place des artères cérébrales compose le dernier niveau d'organisation de cette vascularisation.

[110] Risau, **1997**.
[111] Carmeliet, **2000**.
[112] Bautch & James, **2009**.
[113] Greenberg & Jin, **2005**.

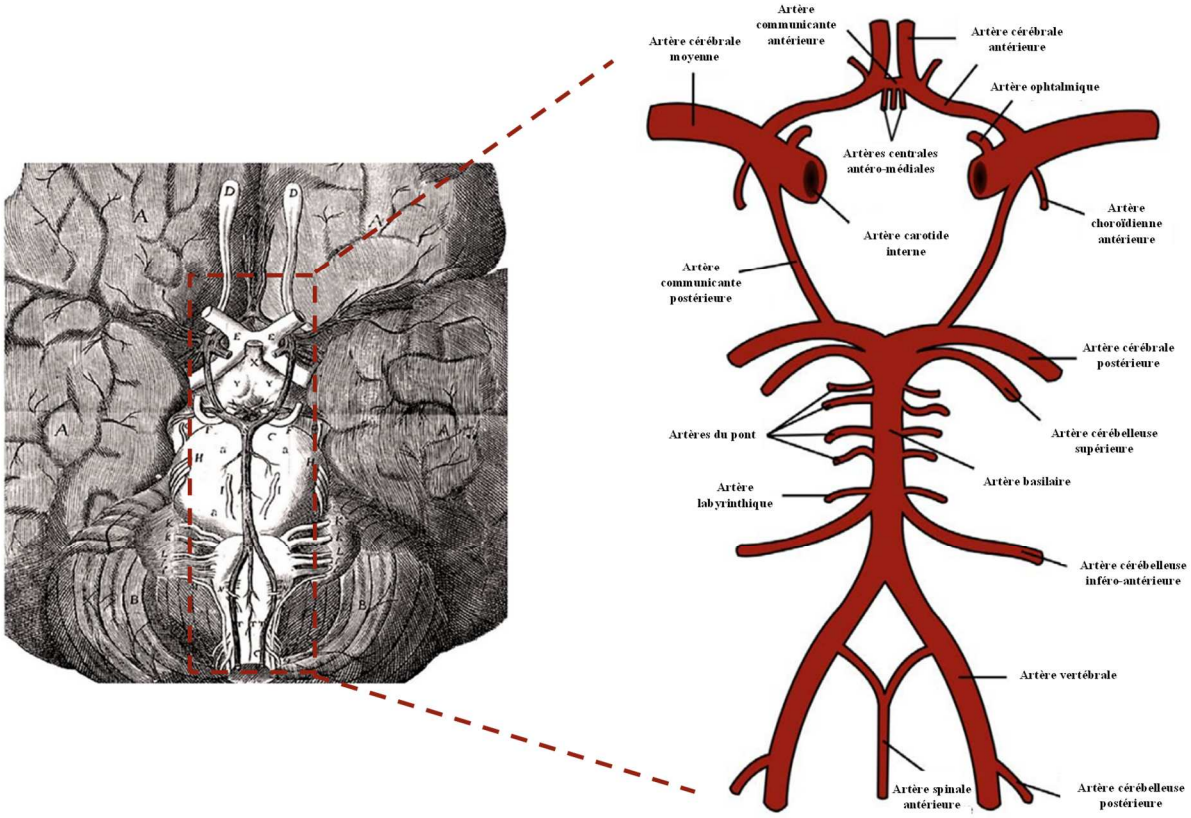


Figure 18 : Organisation du polygone de Willis chez l'Homme.

Chez l'Homme, à partir de la 8ème semaine de grossesse, la réunion des arcs carotidien et basilaire permet la mise en place du polygone de Willis. Du fait de son organisation, il constitue un véritable système de suppléance. Les artères collatérales émergeant du polygone de Willis irriguent l'ensemble des régions cérébrales, même si l'une d'entre elles est lésée ou obstruée. Illustration de gauche : Illustration par Christopher Wren, *De Cerebri Anatome*, 1664 **[114]**. Illustration de droite : Modifiée d'après Thèse de Alexandre Vivanti, Université Paris Saclay, 2018 **[115]**.

b. Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse

La vascularisation cérébrale s'effectue par angiogenèse selon deux mécanismes : par intussusception et par bourgeonnement respectivement minoritaire et majoritaire. Phénomène rapide, l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas de prolifération cellulaire, mais provoque un réarrangement de structures vasculaires préexistantes **[116]**. En effet, l'intussusception s'effectue par invagination de l'endothélium, suivi d'un cloisonnement des cellules endothéliales conduisant à l'émergence de nouveaux vaisseaux **[117]**.

[114] Illustration de Christopher Wren, De Cerebri Anatome, **1664**.
[115] Thèse de Alexandre Vivanti, Université Paris Saclay, **2018**.
[116] Burri *et al.*, **2004**.
[117] Djonov *et al.*, **2003**.

A l'inverse de l'intussusception, l'angiogenèse par bourgeonnement est un processus long, basé sur la prolifération cellulaire qui conduit à l'extension du réseau vasculaire existant **[116]**. Acquérant un profil activé, les cellules endothéliales migrent et prolifèrent dans le but de former de nouveau vaisseaux. Deux phénotypes cellulaires sont ainsi retrouvés au sein des cellules endothéliales ; les *tips cells* et les *stalk cells*, et présentent des rôles définis au cours de l'angiogenèse **[118]**. Cellule endothéliale polarisée située à l'extrémité de la structure vasculaire, la *tip cell* est caractérisée par de nombreux filopodes qui permettent l'exploration de l'environnement, et par extension et rétractation, orientant la migration des vaisseaux en formation en fonction des stimuli chimiotactiques environnants **[119]**. A l'inverse, les *stalk cells*, situées à l'arrière de la cellule *tip cell*, prolifèrent de manière intensive conduisant à l'extension vasculaire **[120]**. Au-delà des différences morphogéniques et fonctionnelles, les *tip cells* et les *stalk cells*, qui réagissent à des stimuli communs, expriment un panel de gènes directement impliqués dans leur devenir cellulaire **[119]**. L'engagement d'une cellule endothéliale en *tip cell* s'effectue par fine régulation assurée à la fois par les systèmes VEGF et Notch/Dll4 (**Figure 19** ; **[118]**). En interagissant avec le *vascular growth factor receptor 2* (VEGF-R2) présent à la surface de la cellule endothéliale dite *tip cell*, le VEGF-A stimule l'expression de Dll4. En se fixant sur le récepteur Notch présent à la surface des cellules endothéliales adjacentes, les *stalk cells*, Dll4 permet l'activation de la cascade signalétique de la voie Notch, qui provoque une inhibition de l'expression de VEGF-R2 à la surface des *stalk cells* **[121]** ; **[122]**. Il est intéressant de noter que, du fait de l'existence d'un gradient de concentration de VEGF-A, les cellules endothéliales n'ont pas les mêmes réponses au VEGF-A. Ainsi, la cellule endothéliale qui présente la plus forte exposition, exprime un taux de Dll4 plus élevé, et par conséquent une activité Notch supérieure. Cette fine régulation permet la sélection et l'engagement d'une seule cellule endothéliale en *tip cell*, engageant par conséquent les cellules adjacentes vers une destinée de *stalk cells* (**Figure 19** ; **[121]** ; **[122]**).

[118] Blanco & Gerhardt, **2013**.
[119] Michaelis, **2014**.
[120] Gerhardt *et al.*, **2003**.
[121] Lobov *et al.*, **2007**.
[122] Suchting *et al.*, **2007**.

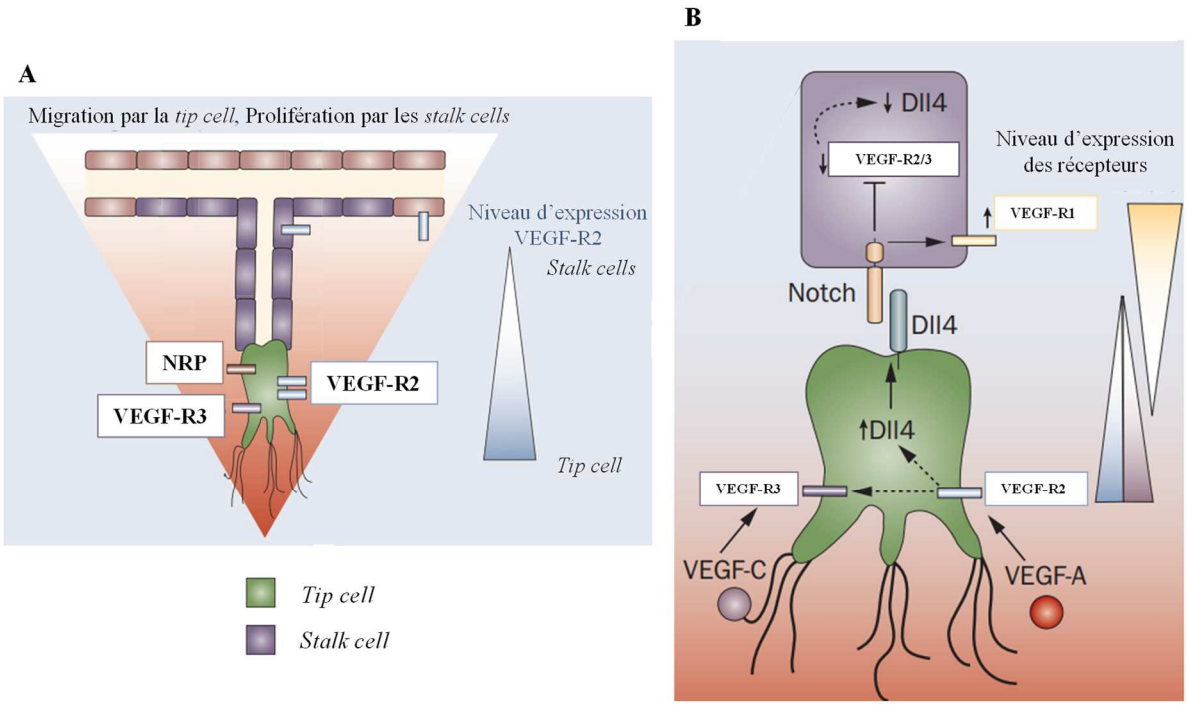


Figure 19 : Représentation schématique du système VEGF-Dll4-Notch dans le bourgeonnement vasculaire.

Le facteur de croissance VEGF-A interagit avec le récepteur VEGF-R2 exprimé par les *tip cells* enclenchant l'expression de Dll4. En se liant à son récepteur Notch, exprimé par les *stalk cells*, Dll4 conduit au clivage protéolytique du domaine intracellulaire de Notch, nommé NICD. Après translocation dans le noyau, NICD entraîne une modification de l'expression génique, et provoque notamment une inhibition de l'expression de VEGF-R2. NICD : *Notch intracellular domain* ; NRP : Neuropiline ; VEGF-R : *vascular endothelial growth factor receptor* ; Modifié d'après Carmeliet *et al.*, 2009 **[123]** et Michaelis, 2014 **[119]**.

La modulation de ces systèmes influence directement la formation du réseau vasculaire **[124]**. Ainsi, le blocage de la voie Notch/Dll4 provoque l'engagement des cellules endothéliales uniquement vers un phénotype *tip cells*, conduisant à l'effondrement du système vasculaire **[125]**. De la même manière, le blocage de la stimulation par le VEGF-A par des anticorps dirigés contre VEGF-R2 provoque la rétractation complète des filopodes, limitant la progression vasculaire **[120]**. Des réarrangements cellulaires au cours des phénomènes d'anastomose ont par ailleurs été identifiés, toujours sous l'influence du système VEGF-Dll4-Notch. En effet, de récentes études ont mis en lumière une migration rétrograde des *tip cells* , échangeant leur place avec les *stalk cells* **[126]**. Enfin, il est intéressant de noter que de

[123] Carmeliet *et al.*, **2009**.
[124] Zeng *et al.*, **2021**.
[125] Gerhardt *et al.*, **2008**.
[126] Arima *et al.*, **2011**.

nombreux signaux moléculaires attractifs et répulsifs présents dans l'environnement influencent la guidance vasculaire d'une manière analogue à la guidance axonale **[127]**.

c. Interactions neuro-vasculaires

Historiquement, une correspondance entre les systèmes nerveux et vasculaires a été identifiée chez l'Homme par Andreas Vesalius au 16ème siècle, les deux réseaux présentant des arborisations similaires **[128]**. Bien au-delà des ressemblances morphologiques, de récentes études ont démontré une homologie cellulaire entre ces deux systèmes, laissant émerger le concept d'un lien neuro-vasculaire, traduisant une subtile communication entre les cellules nerveuses et les cellules endothéliales, ces dernières répondant à des signaux moléculaires communs **[127]**. Structure complexe et hautement organisée, le SNC est en effet composé de multiples types cellulaires communicants entre eux afin d'assurer la mise en place d'un système fonctionnel et efficace **[129]**. De nombreuses études ont ainsi caractérisé le rôle majeur d'une communication neuro-vasculaire dans le développement du SNC, notamment au travers la mise en place d'une unité neuro-vasculaire (UNV ; **Figure 20**).

[127] Carmeliet & Tessier-Lavigne, **2005**.
[128] Vesalius, **1543**.
[129] Segarra *et al.*, **2019**.

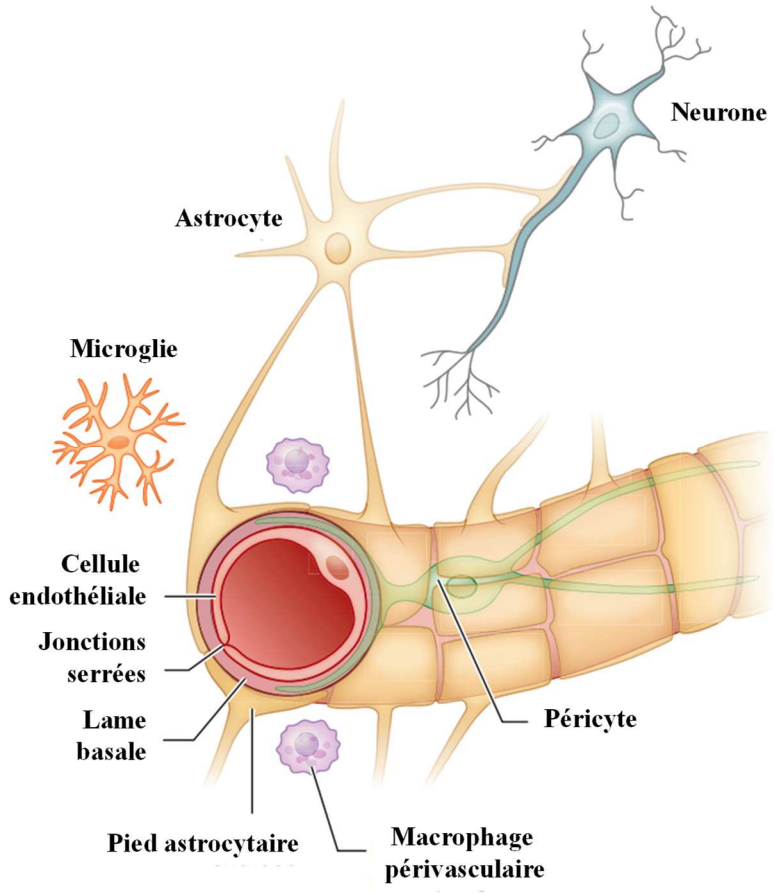


Figure 20 : Constitution de l'unité neuro-vasculaire.

L'unité neuro-vasculaire (UNV) est composée d'une étroite communication entre de multiples types cellulaires : les cellules endothéliales, les péricytes, les astrocytes, les neurones ainsi que la microglie. L'UNV constitue une entité responsable du contrôle du transport de substances au sein du SNC et permet ainsi la mise en place de la barrière hémato-encéphalique. Ce contrôle est notamment assuré par les jonctions serrées présentes entre les cellules endothéliales de l'UNV. Modifié d'après Segarra *et al.*, 2019 **[129]**.

Le transport d'oxygène, de nutriments et de métabolites, à destination du parenchyme cérébral ainsi que la régulation du débit sanguin en réponse à la demande neuronale, sont des rôles assurés par l'UNV. Il est cependant intéressant de noter que de récentes études ont identifié des rôles complémentaires de l'UNV influençant de larges processus neurodéveloppementaux tels que la neurogenèse, la migration ou encore la différenciation cellulaire **[23]** ; **[130]**. Ainsi, le VEGF-A présente des effets neurotrophiques, favorisant la survie neuronale **[131]**, la croissance axonale **[132]** ou encore le nombre de neurites **[133]**.

[130] Segarra *et al.*, **2015**.
[131] Sondell *et al.*, **1999**.
[132] Silverman *et al.*, **1999**.
[133] Rosenstein *et al.*, **2003**.

Par ailleurs, le système vasculaire joue un rôle capital dans la mise en place des différentes populations nerveuses. Divers modèles d'interactions vasculaires sont ainsi décrits dans la littérature, telle que la migration des neuroblastes utilisant les vaisseaux comme support migratoire **[134]**. De plus, d'ores et déjà identifiée au sein de la population oligodendrogliale **[51]**, Won et collaborateurs ont mis en évidence une étroite association des interneurones GABAergiques avec les vaisseaux au cours de leur migration tangentielle à destination du néocortex **[14]**. Ainsi, un complexe tripartite formé par les vaisseaux, les neurones et les cellules gliales, supporte les changements dynamiques permettant le bon développement du SNC.

d. La superfamille des VEGFs

La vascularisation cérébrale se met en place par angiogenèse, et dépend de diverses familles de protéines impliquées aussi bien dans la survie, l'adhésion ou encore la croissance cellulaire, que dans la migration endothéliale **[135]**. Cependant, la famille des VEGFs constitue l'une des plus importante dans la mise en place du réseau vasculaire, régulant à la fois la mise en place des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Cette superfamille est composée de sept ligands ; le VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F et du *placental growth factor* (PlGF), des glycoprotéines biologiquement actives sous forme de dimères, principalement en tant qu'homodimères mais parfois sous formes hétérodimériques (**Figure 21** ; **[136]**). Présentant une architecture commune, les différents facteurs de croissance de cette superfamille ont une structure dite à motif « *cystein knot* ». Ce motif protéique contenant trois ponts disulfures reliant respectivement une paire de cystéines constitue une signature fonctionnelle impliquée dans la stabilité protéique **[136]**. Ces acteurs vasculaires induisent leurs effets biologiques au travers l'interaction avec trois récepteurs de type tyrosine kinase : les VEGF-R1, -R2 et –R3, et des co-récepteurs ; les *semaphorin receptors neuropilin* 1 et 2 (NP-1 et -2) **[137]**.

[134] Snapyan *et al.*, **2009**.
[135] Carmeliet & Jain, **2000**.
[136] Iyer & Acharya, **2011**.
[137] Salajegheh *et al.*, **2016**.

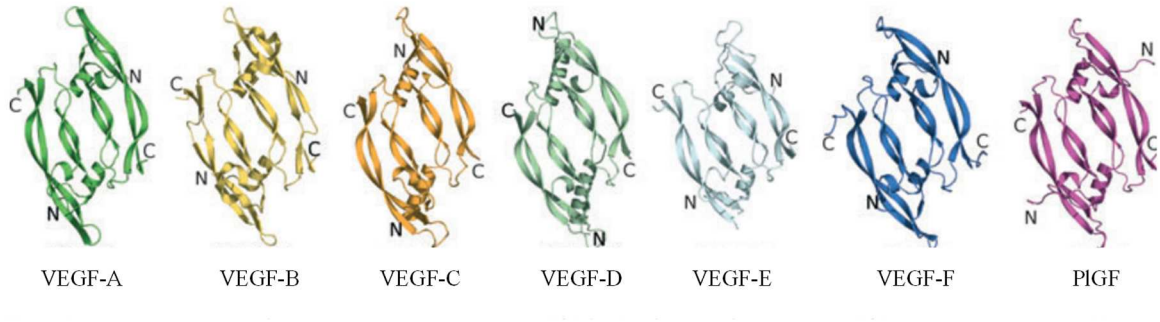


Figure 21 : Conformation quaternaire des ligands membres de la superfamille des VEGFs.

Biologiquement actif sous forme dimérique, les sept ligands composant la superfamille des VEGFs présentent une topologie globale similaire basée sur la présence d'un motif *cystein knot* et sur une forte conservation des résidus impliqués dans la structuration protéique. C : Extrémité carboxi-terminale ; N : Extrémité amino-terminale. Modifiée d'après Iyer & Acharya, 2011 **[136]**.

i. VEGF-A

Considéré comme le chef de file de cette superfamille, le VEGF-A joue un rôle capital dans l'angiogenèse. D'abord identifié par Senger et collaborateurs en 1983 sous le terme de *vascular permeability factor* (VPF ; **[138]**), il fut isolé, séquencé et nommé VEGF-A en 1989 par l'équipe de Ferrara et collaborateurs **[139]**. Le gène du VEGF, situé sur le chromosome 6, est composé de huit exons et génère de multiples isoformes par épissage alternatif des exons 6 et 7 (**Figure 22** ; **[140]**). Cinq isoformes matures sont retrouvées : le VEGF-A_{121}, le VEGF-A_{189}, le VEGF-A_{148}, le VEGF-A_{206} et le VEGF-A_{165}, ce dernier représentant la forme la plus fréquemment exprimée, et deux formes minoritaires le VEGF-A_{145} et le VEGF-A_{183} **[141]**. Par ailleurs, des variants supplémentaires ont été identifiés. Issus d'une série d'épissages alternatifs, les VEGF-A_{xxx}b (**Figure 22**) sont en mesure de se fixer aux VEGF-R mais sans activer efficacement la cascade signalétique, ayant un rôle anti-angiogénique **[142]**. Principalement relayée par le facteur HIF **[143]**, l'expression du VEGF-A se présente sous forme homodimérique ou hétérodimérique **[144]**, et est stimulée en condition d'hypoxie. Cependant son expression est influencée par d'autres facteurs, tels que les facteurs de croissance *epidermal*

[138] Senger *et al.*, **1983**.
[139] Ferrara *et al.*, **1989**.
[140] Tischer *et al.*, **1991**.
[141] Ferrara & Adamis, **2016**.
[142] Harper *et al.*, **2008**.
[143] Eswarappa *et al.*, **2014**.
[144] Disalvo *et al.*, **1995**.

growth factor (EGF) et PDGF **[145]**. Interagissant avec deux des récepteurs au VEGF, le VEGF-R1 et le VEGF-R2, le VEGF-A stimule la perméabilité vasculaire, la survie, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, permettant le mécanisme d'angiogenèse **[146]**. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une dérégulation du système VEGF entraînait des perturbations développementales sévères, telles que l'invalidation du gène codant le VEGF-A qui provoque une létalité embryonnaire **[147]**.

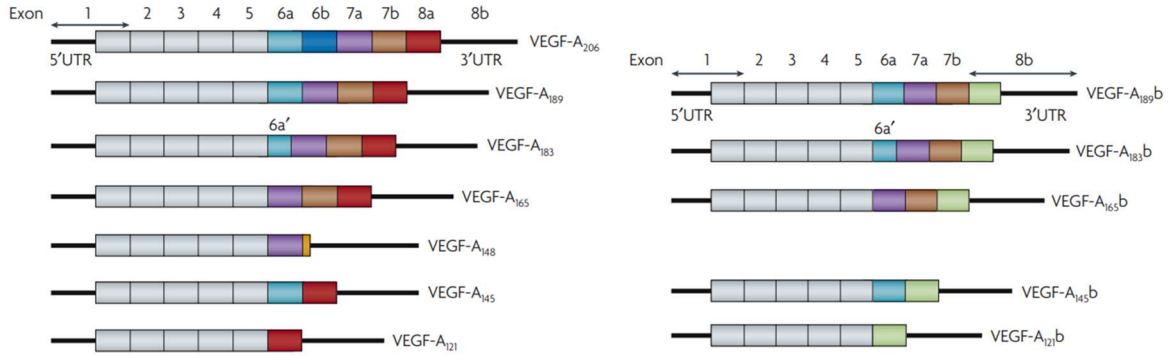


Figure 22 : Produits résultants de l'épissage alternatif du VEGF-A.

S'effectuant à l'extrémité 5' ou 3' des sites d'épissage, une multitude d'isoformes du VEGF-A peut être générée. Deux catégories distinctes aux fonctions opposées apparaissent : les isoformes pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Les isoformes pro-angiogéniques (à gauche), que sont le VEGF-A_{121}, le VEGF-A_{189}, le VEGF-A_{148}, le VEGF-A_{206}, le VEGF-A_{165}, le VEGF-A_{145} et le VEGF-A_{183}, sont générées à partir de la partie proximale du site d'épissage au sein des exons 6 et 7. Les isoformes anti-angiogéniques (à droite), que sont les VEGF-A_{xxx}b, sont issues de la partie distale du site d'épissage de l'exon 8. D'après Harper *et al.*, 2008 **[148]**.

ii. VEGF-B, C, D, E et F

Caractérisés par la présence de 8 résidus cystéines formant une structure dite *cystein-knot*, des homologues du VEGF-A sont retrouvés, à savoir les VEGF-B, -C, -D, -E et -F, et jouent des rôles distincts soit dans l'angiogenèse soit dans la lymphangiogenèse.

Le VEGF-B, largement distribué au niveau tissulaire, présente une activité angiogénique, bien qu'il n'influence pas la perméabilité vasculaire contrairement à son homologue le VEGF-A **[149]**. Majoritairement exprimé au sein du système cardiaque, le VEGF-B joue un rôle dans le développement du système cardio-vasculaire **[150]**. La déficience en VEGF-B provoque une diminution de la densité des vaisseaux sanguins au sein du myocarde ischémié chez la Souris

[145] Ferrara *et al.*, **2004**.
[146] Apte *et al.*, **2019**.
[147] Carmeliet *et al.*, **1996**.
[148] Harper *et al.*, **2008**.
[149] Li *et al.*, **2009**.
[150] Olofsson *et al.*, **1996**.

[151], bien qu'une absence de défaut vasculaire soit retrouvée au niveau des autres organes. En effet, l'invalidation du VEGF-B chez la Souris n'entraîne pas d'altération particulière globale que cela soit sur un plan développemental, ou en ce qui concerne la fertilité et la vie postnatale **[149]**.

Les VEGF-C et -D présentent des similitudes structurales et fonctionnelles. Ils sont principalement impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse (**[152]** ; **[153]**). En effet, la surexpression de VEGF-C dans les kératinocytes entraîne une augmentation du nombre de vaisseaux lymphatiques **[154]**. De la même manière, la surexpression du VEGF-D dans les kératinocytes entraîne une stimulation de la lymphangiogenèse chez la Souris, accompagnée d'une augmentation de la migration des cellules endothéliales lymphatiques **[155]**.

Identifié au sein du génome du parapoxvirus *Orf*, le VEGF-E joue un rôle capital dans le processus d'infection virale, en stimulant la vascularisation autour du site de lésion **[156]**.

Le VEGF-F est la forme la plus récemment identifiée des VEGFs, dérivant du venin de serpent **[157]**. Présentant une structure commune avec les VEGFs de mammifères, le VEGF-F stimule la perméabilité vasculaire **[158]** et joue un rôle dans la réduction de la pression sanguine **[159]**.

iii. Le PlGF

Découvert dans le placenta chez l'Homme en 1991 **[160]**, le PlGF constitue le dernier membre de la superfamille des VEGFs. Bien qu'une identité de conformation soit remarquablement retrouvée entre le PlGF et le VEGF-A, le PlGF humain présente uniquement 42 % d'homologie de séquence avec ce dernier **[161]** ; **[162]**. Protéine dimérique glycosylée, le PlGF est principalement synthétisé pendant la grossesse par le placenta, organe transitoire assurant les apports en oxygène et en nutriments, ainsi que l'élimination des métabolites générés

[151] Li *et al.*, **2008**.
[152] Alitalo *et al.*, **2005**.
[153] Ruiz de Almodovar *et al.*, **2009**.
[154] Jeltsch *et al.*, **1997**.
[155] Stacker *et al.*, **2001**.
[156] Savory *et al.*, **2000**.
[157] Toivanen *et al.*, **2017**.
[158] Matsunaga *et al.*, **2009**.
[159] Yamazaki *et al.*, **2003**.
[160] Maglione *et al.*, **1991**.
[161] Muller *et al.*, **1997**.
[162] Iyer *et al.*, **2001**.

par le fœtus. Bien que le placenta constitue la source majoritaire de PlGF, d'autres organes tels que le cœur, les poumons, la glande thyroïde et les muscles squelettiques l'expriment également **[163]**. Enfin, alors que des études de transcriptomique ou de protéomique identifient une faible expression du PlGF dans le SNC **[164]**, une étude controversée définit le cerveau comme une source non négligeable **[165]**.

Situé sur le chromosome 14 chez l'Homme, et le chromosome 12 chez la Souris, le PlGF est constitué de sept exons. Différentes isoformes sont générées à la suite d'épissage alternatif. Alors que chez l'Homme quatre isoformes du PlGF sont retrouvées, nommées PlGF-1 ($PlGF_{131}$), PlGF-2 ($PlGF_{152}$), PlGF-3 ($PlGF_{203}$) et PlGF-4 ($PlGF_{224}$), seule l'isoforme PlGF-2 a été identifiée chez la Souris (**Figure 23** ; **[166]**).

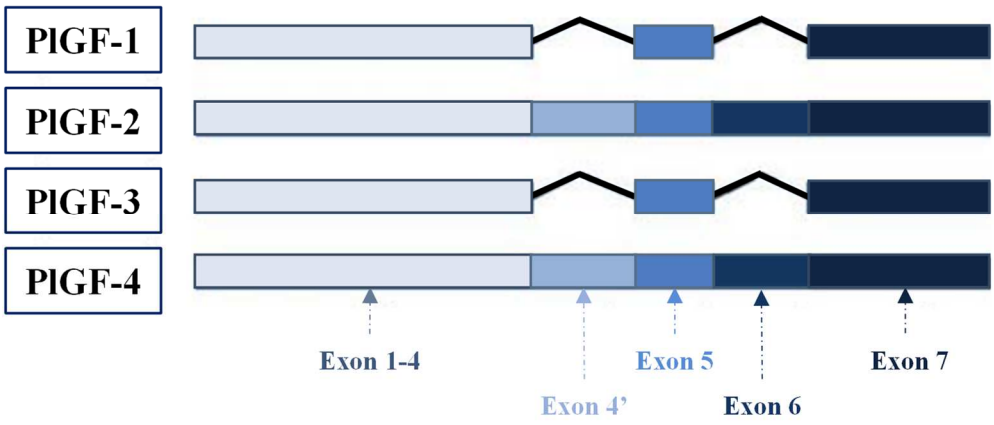


Figure 23 : Epissage alternatif du PlGF et produits correspondants.

Illustration représentative des quatre isoformes du PlGF, résultant de l'épissage alternatif. Au-delà de leur taille variable, ces isoformes diffèrent par leurs affinités de liaison au récepteur. Modifiée d'après Ribatti, 2008 **[167]**.

Fortement conservé au cours de l'évolution, suggérant un rôle spécifique, le PlGF est exprimé au cours du développement embryonnaire. Impliqué dans l'invasion trophoblastique, son expression est particulièrement élevée dans le syncytiotrophoblaste géant des villosités placentaires, soulignant son implication dans la vascularisation placentaire **[168]** ; **[169]**. En conditions physiologiques, le PlGF présente ainsi une activité pléiotrope, associée à de nombreux effets biologiques. Au travers son rôle pro-angiogénique, le PlGF agit sur la

[163] Persico *et al.*, **1999**.
[164] Sautreuil *et al.*, **2019**.
[165] Luna *et al.*, **2016**.
[166] De Falco, **2012**.
[167] Ribatti, **2008**.
[168] Munaut *et al.*, **2008**.
[169] Depoix *et al.*, **2011**.

croissance et la maturation vasculaires en stimulant la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales **[170]** ; **[171]**. De plus, en conditions pathologiques, de nombreuses cellules expriment le PlGF, telles que les fibroblastes, les hépatocytes ou encore les cellules tumorales **[172]**. L'invalidation du gène codant le PlGF n'entraîne pas d'anomalies du développement embryonnaire, les souris adultes étant viables et fertiles **[171]**. Ces observations ont contribué à penser que cet acteur vasculaire n'intervenait pas de manière majoritaire dans le développement cérébral. Cependant, de récents travaux ont démontré que l'absence de PlGF provoque des perturbations du développement vasculaire cortical **[165]** ; **[173]**. Par ailleurs, au cours d'un épisode hypoxo-ischémique, le traitement par le PlGF favorise l'angiogenèse et la revascularisation **[172]**. Enfin, bien que le PlGF soit majoritairement exprimé par le placenta, son récepteur le VEGF-R1 est fortement exprimé au niveau du cerveau fœtal, soulignant un rôle direct du PlGF placentaire sur la vascularisation corticale fœtale, démontrant ainsi l'existence d'un axe fonctionnel « placenta-cerveau » **[173]**.

e. Récepteurs du VEGF et du PlGF

i. Généralités

Les fonctions biologiques des membres des VEGFs sont relayées par trois récepteurs : le VEGF-R1 (ou *fms related tyrosine kinase* 1 ; Flt-1), le VEGF-R2 (ou *fetal liver kinase* 1 ; Flk-1) et le VEGF-R3 (ou *fms related tyrosine kinase* 4 ; Flt-4). Tout comme leurs ligands qui présentent des similitudes structurales, les récepteurs de la superfamille des VEGFs s'organisent selon un modèle commun : une partie extracellulaire, un domaine transmembranaire, ainsi qu'une partie intracellulaire contenant 2 domaines à activité tyrosine kinase **[166]**. La liaison du ligand sur le récepteur s'effectue sur le domaine extracellulaire, et provoque la dimérisation de ce dernier. La formation d'homo-dimères ou d'hétéro-dimères (**[174]** ; **Figure 24**), est cependant insuffisante pour activer la cascade biologique **[175]**. La dimérisation du récepteur s'accompagne de modifications de conformation au niveau des domaines intracellulaires contenant les domaines tyrosine kinase, aboutissant à l'exposition des sites de liaison à l'ATP, et à la phosphorylation du récepteur **[176]**.

---

[170] Ziche *et al.*, **1997**.
[171] Carmeliet *et al.*, **2001**.
[172] Derwerchin & Carmeliet, **2012**.
[173] Lecuyer *et al.*, **2017**.
[174] Nilsson *et al.*, **2010**.
[175] Koch *et al.*, **2011**.
[176] Lemmon & Schlessinger, **2010**.

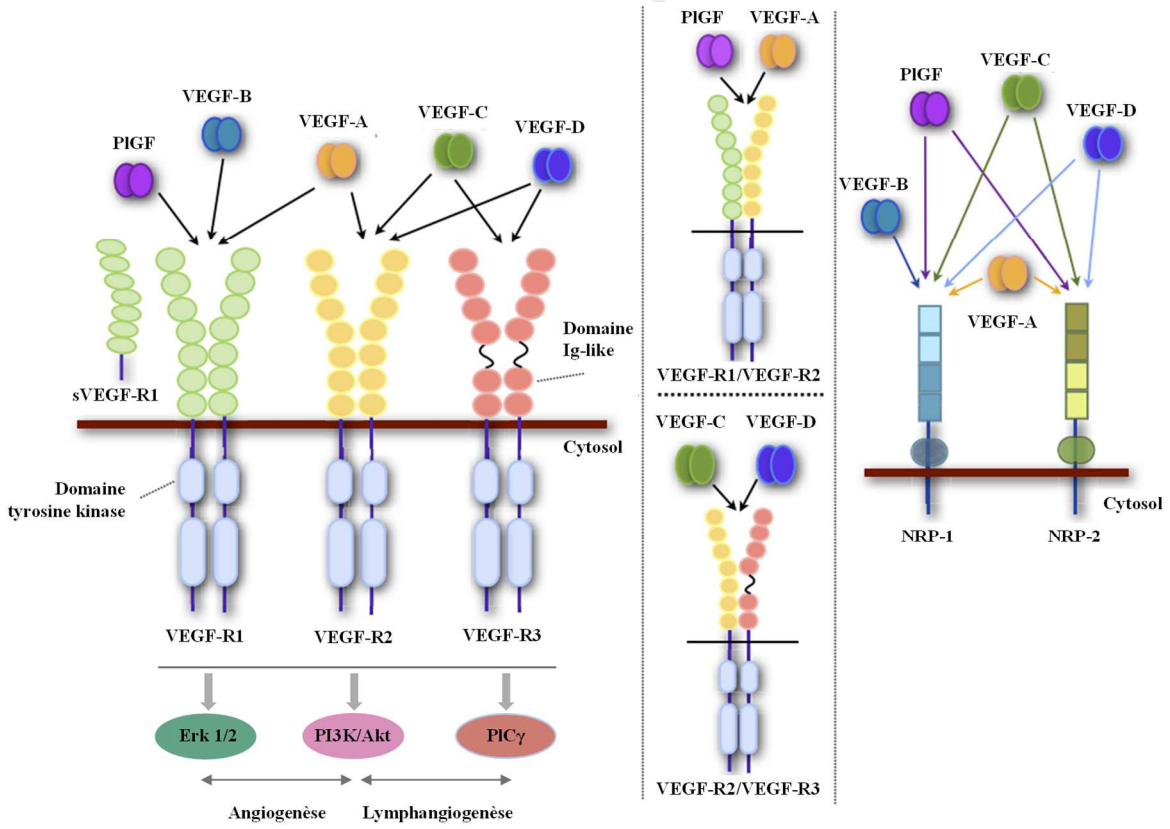


Figure 24 : Ligands et récepteurs de la superfamille du VEGF.

Le VEGF-A, ligand chef de file de la superfamille, interagit avec les récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2. Le VEGF-B, impliqué principalement dans le développement cardiaque, interagit uniquement avec le VEGF-R1. Intervenant dans la lymphangiogenèse, les VEGF-C et VEGF-D interagissent avec les VEGF-R2 et VEGF-R3. Par ailleurs, le PlGF se lie au VEGF-R1. Enfin, non représenté, le VEGF-E lie uniquement le VEGF-R2 alors que le VEGF-F lie les VEGF-R1 et VEGF-R2. Présent sous forme homo-dimérique ou hétéro-dimérique, le VEGF-R1 est le seul récepteur comportant une forme soluble. Enfin, les NRP-1 et NRP-2 agissent à la fois en tant que récepteurs du VEGF et co-récepteurs de VEGF-R1 et de VEGF-R2. Modifiée d'après Ruiz de Almodovar, 2009 **[153]**.

Les membres de la superfamille des VEGFs interagissent avec les récepteurs du VEGF selon une spécificité et une affinité distincte, et déclenchent des cascades de signalisation permettant notamment les processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse **[153]**. Les trois récepteurs sont en mesure d'activer les mêmes voies de signalisation intracellulaire à savoir l'activation de *phospholipase C gamma* (PlCγ ; **[177]**), de *phosphoinositide 3 kinase/AKT* (PI3K/AKT ; **[178]**) et *extracellular signal-regulated kinase ½* (ERK1/2 ; **[179]** ; **Figure 24**). Toutefois, ces dernières sont activées avec des efficacités différentes assurant une modulation

[177] Takahashi *et al.*, **2001**.
[178] Cai *et al.*, **2003**.
[179] Tchaikovski *et al.* **2008**.

fine de la transduction du signal en fonction des équilibres « ligand/récepteur ». L'activation de ces différents récepteurs participent ainsi au contrôle de la multiplication, de la migration, du bourgeonnement et de la survie des cellules endothéliales **[153]**.

ii. Organisation et rôle des VEGF-R1, -R2 et -R3

Glycoprotéine de 180-185 kDa, le récepteur VEGF-R1 est activé par liaison au VEGF-A, VEGF-B ou au PlGF, et joue un rôle dans l'angiogenèse en régulant la différenciation et l'organisation du réseau vasculaire **[175]**. Principalement exprimés par les cellules endothéliales à la fois au cours du développement et chez l'adulte **[180]** ; **[181]**, d'autres types cellulaires expriment également le VEGF-R1, tels que les macrophages, les monocytes, le trophoblaste et les cellules dendritiques **[175]**. Par ailleurs, une forme soluble du VEGF-R1 (sVEGF-R1) est générée par épissage alternatif **[182]**. Fortement présente au sein du placenta **[183]**, cette forme soluble exerce un rôle physiologique dans la maturation vasculaire **[184]**. A l'instar de l'invalidation du VEGF-A, l'invalidation du récepteur VEGF-R1 conduit à une létalité embryonnaire **[185]**. Cependant, la délétion des domaines tyrosine kinase du VEGF-R1 n'entraîne pas de défaut de développement vasculaire **[186]**. Malgré une faible activité tyrosine kinase, le VEGF-R1 présente une forte affinité pour le VEGF-A, affinité plus importante que pour le PlGF **[187]**. L'ensemble de ces constatations suggère alors un rôle des VEGF-R1 et sVEGF-R1 dans la régulation de la signalisation du VEGF-R2, communément appelé le « VEGF *decoy effect* », prévenant d'une activation excessive du VEGF-R2 en séquestrant le VEGF-A. A l'inverse, en se liant au VEGF-R1, le PlGF favorise la liaison du VEGF-A sur le VEGF-R2. Cette compétition « ligand/récepteur » entraîne alors un contrôle de l'angiogenèse (**Figure 25** ; **[171]** ; **[172]**).

[180] Peters *et al.*, **1993**.
[181] Jakeman *et al.*, **1992**.
[182] Kendall *et al.*, **1993**.
[183] Clark *et al.*, **1998**.
[184] Lorquet *et al.*, **2010**.
[185] Fong *et al.*, **1995**.
[186] Hiratsuka *et al.*, **1998**.
[187] Auterio *et al.*, **2003**.

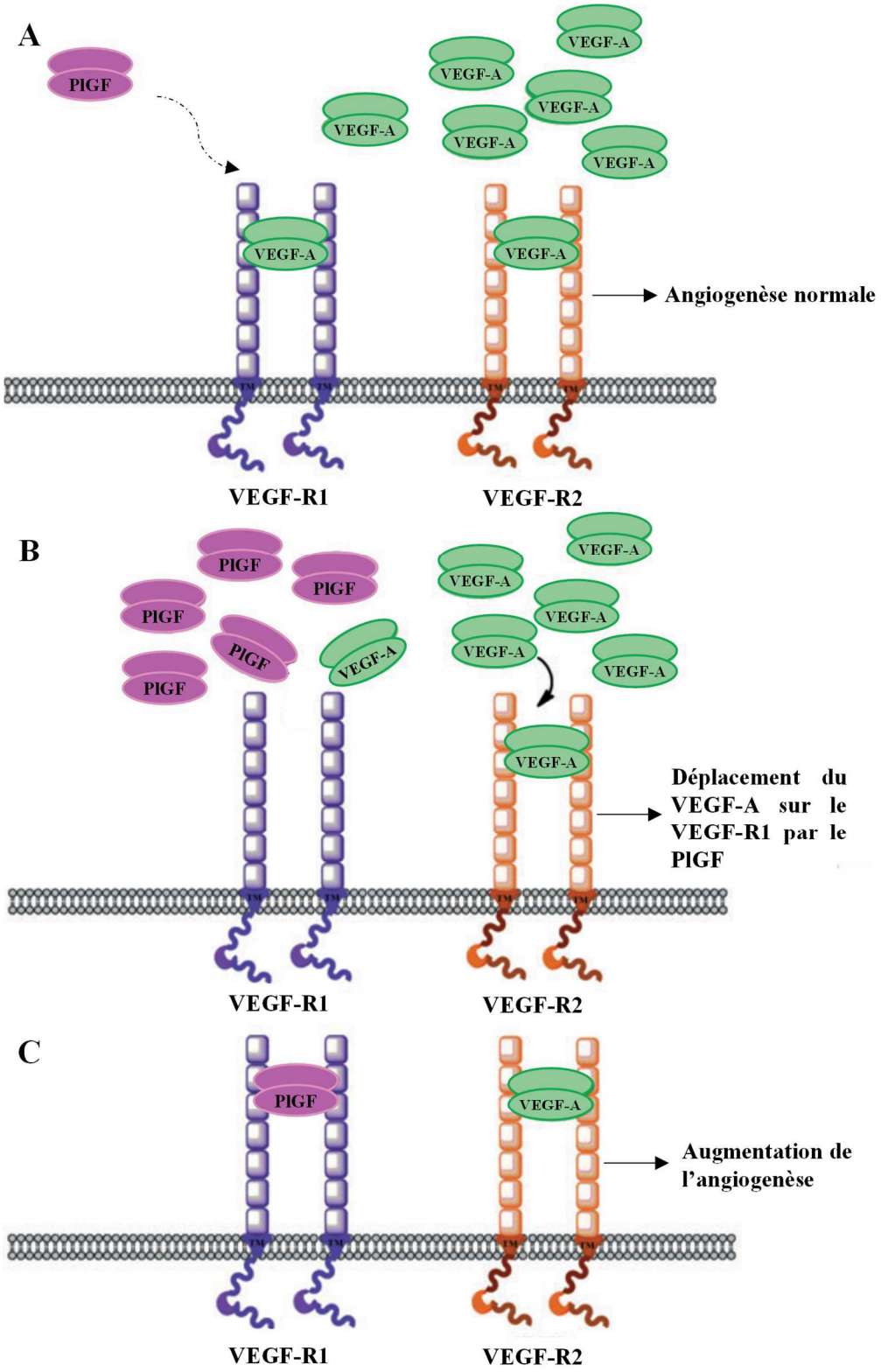


Figure 25 : Modification de la réponse angiogénique par le PlGF.

(A) Lorsque le PlGF est minotaire, le VEGF-A interagit à la fois avec le VEGF-R1 et le VEGF-R2. (B) Malgré une spécificité de liaison avec le VEGF-R1, le PlGF lorsqu'il est présent en grande quantité, est en mesure d'activer indirectement le VEGF-R2. Interagissant avec le VEGF-R1, le PlGF favorise la liaison du VEGF-A sur le VEGF-R2. (C) Cette compétition « ligand/récepteur » entraîne ainsi une augmentation de l'angiogenèse. Modifiée d'après Iyer & Acharya, 2011 **[136]**.

Glycoprotéine de 210-230 kDa liant le VEGF-A avec une plus faible affinité que le VEGF-R1 **[188]**, le VEGF-R2 est majoritairement exprimé par les cellules endothéliales et leurs précurseurs au cours du développement embryonnaire, mais également par certaines cellules non vasculaires telles que les cellules pancréatiques **[189]**. Présentant un rôle majoritaire et essentiel dans l'angiogenèse, le VEGF-R2 constitue le principal effecteur du VEGF-A. Il régule la survie des cellules endothéliales, leur prolifération et leur migration. Le VEGF-R2 joue par conséquent un rôle majeur dans la formation du réseau vasculaire **[175]**. A l'instar du VEGF-A, l'invalidation du VEGF-R2 chez la Souris provoque un défaut de développement des cellules endothéliales associé à une mort *in utero* à E8,5 **[190]**.

Enfin, constituant le troisième membre de cette famille de récepteurs, le VEGF-R3 est une glycoprotéine de 195 kDa liant le VEGF-C et VEGF-D **[191]**. Le VEGF-R3 joue un rôle critique dans la régulation de la lymphangiogenèse **[192]** et son invalidation provoque une mort *in utero* à E10,5 chez la Souris **[193]**.

iii. Rôle des co-récepteurs

Les neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2), glycoprotéines d'environ 130 kDa présentent un domaine intracellulaire court. Elles ont été identifiées comme co-récepteurs des VEGFs modulant la signalisation du système VEGF. Dépourvues d'activité catalytique intrinsèque et donc de signalisation biologique, les neuropilines nécessitent l'interaction avec les récepteurs du VEGF afin de réguler leurs effets **[194]**. A titre illustratif, la co-expression de NRP-1 et de VEGF-R2 provoque à une amplification de la phosphorylation, et *in fine* de la signalisation de VEGF-R2 **[195]**, conduisant à une augmentation de la migration et de la survie cellulaire **[196]**. Par ailleurs, la double invalidation NRP-1/NRP-2 provoque une mort *in utero* à E8,5 confirmant l'implication des NRP dans la signalisation VEGF **[197]**.

Enfin, plus récemment, l'équipe de Jiang et collaborateurs a mis en évidence l'existence d'un autre co-récepteur du VEGF-R2, le *cluster of differentiation 146* (CD146). Identifié au

---

[188] Fuh *et al.*, **1998**.
[189] Oelrichs *et al.*, **1993**.
[190] Shalaby *et al.*, **1995**.
[191] Achen *et al.*, **1998**.
[192] Karpanen *et al.*, **2008**.
[193] Dumont *et al.*, **1998**.
[194] Fujisawa *et al.*, **1998**.
[195] Geretti *et al.*, **2008**.
[196] Favier *et al.*, **2006**.
[197] Takashima *et al.*, **2002**.

niveau des cellules endothéliales, le CD146 stimule la liaison du VEGF-A sur le VEGF-R2, stimulant ainsi la migration cellulaire **[198]**.

II. Alcoolisation *in utero* : Troubles associés et impacts sur le neurodéveloppement

1. Syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) et Troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) : Conséquences d'une consommation d'alcool au cours de la grossesse

a. Alcool et société

Emblème de la gastronomie et du patrimoine français, l'alcool est un élément essentiel de la culture française. La consommation de vin à table est socialement inscrite dans l'Histoire, exprimant traditionnellement le partage social, les festivités et la joie qui les entourent. Cependant, cette consommation d'alcool engendre des effets néfastes sur la santé.

Au cours de l'Histoire, la place et la vision de l'alcool ont ainsi arboré une certaine ambivalence, passant d'une image tantôt positive à négative. Dans l'antiquité, l'alcool était perçu comme sacré et mystique du fait de ses propriétés enivrantes incomprises, en témoignent les cultes de Dionysos en Grèce, Dieu de la vigne et du vin ou encore celui de Bacchus, pour les Romains. Par ailleurs, sa consommation était monnaie courante lors de cérémonies religieuses ou lors de banquets philosophiques, l'alcool étant considéré comme une porte d'entrée vers le monde des Dieux **[199]**.

Progressivement, des questionnements entourant cette consommation virent cependant le jour. Désordres, délires, excès en tout genre, violences et échecs, vont peu à peu être associés à l'alcool, l'affligeant d'une étiquette négative **[200]**. Cependant, au Moyen-âge, la consommation excessive d'alcool était considérée comme un péché par l'Eglise qui prôna alors une consommation modérée. Bien au fait de cette ambivalence, la France aborde une position particulière ancrée dans la culture du bon vivant, la situant au 6ème rang des pays les plus consommateurs d'alcool au monde **[201]**.

---

[198] Jiang *et al.*, **2012**.
[199] Jovelin E, Oreskovic, De l'alcoolisme à l'abstinence, **2002**.
[200] Alcool, Dommages sociaux : Abus et dépendance, INSERM, **2003**.
[201] Baromètre santé **2018**, Alcool : où en sont les Français, Santé Publique France.

En France, on retrouve des campagnes publicitaires datant des années 50 prônant un discours positif sur la consommation d'alcool à l'ensemble de la population, comprenant entre autres les femmes allaitantes et les enfants. Malgré une diminution globale des ventes d'alcool au cours des cinquante dernières années, les modes de consommation évoluent parmi les différentes tranches d'âges. La consommation quotidienne d'alcool est principalement retrouvée chez les 65-75 ans alors que les alcoolisations ponctuelles importantes (API), également connues sous le terme de *binge drinking* et qui référent à des quantités excessives de boissons alcoolisées consommées sur de courtes périodes, sont majoritairement retrouvées chez les 18-24 ans et 25-34 ans **[202]**. Cette nouvelle forme de consommation fait ainsi partie intégrante d'habitudes de consommation à risque, tant sur le plan social que sanitaire. Il est alors essentiel d'éduquer les jeunes en âge de procréer, afin d'abandonner ces habitudes de consommation en particulier au cours d'une grossesse.

b. Historique d'un syndrome

Les méfaits de l'alcool sur le fœtus ont été pressentis depuis longtemps. Les Grecs anciens interdisaient la consommation d'alcool pendant les noces des jeunes époux, craignant des effets néfastes sur l'enfant qui pourrait être conçu **[203]**. Au XVIII^{ème} siècle, le peintre anglais William Hogarth publia une estampe **[204]** décrivant les dérives de la consommation de Gin. A la suite d'une diminution de la taxe sur le Gin, les médecins purent observer une diminution de la natalité, associée à une augmentation de la mortalité infantile et de troubles neurologiques.

Laissant le temps aux observations et études scientifiques de se développer, c'est en 1968 qu'un pédiatre français mis en lumière l'existence d'un lien entre des effets tératogènes et une consommation d'alcool au cours de la grossesse. Grâce à l'examen de 127 enfants nés de mères souffrant d'alcoolisme, le Dr Paul Lemoine, alors chef du service de pédiatrie au CHU de Nantes, identifie des anomalies faciales associées à des troubles du développement **[205]**. Malheureusement rejetée dans un premier temps par la communauté scientifique, son étude sera corroborée en 1973 par les docteurs David W. Smith et Kenneth L. Jones, qui confirment le tableau clinique précédemment décrit par leur confrère, chez 11 enfants nés de mères ayant

[202] BEH **2019**, Consommation d'alcool, comportement et conséquences pour la santé, Santé Publique France.
[203] Calhoun & Warren, **2007**.
[204] William Hogarth [1697-1764], Gin Lane, **1751**.
[205] Lemoine *et al.*, **1968**.

reconnu avoir consommé de l'alcool au cours de la grossesse **[206]**. Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF ou *FAS* en anglais pour *Fetal Alcohol Syndrom*) fut alors publiquement identifié, se caractérisant par la présence d'une dysmorphie faciale, un retard de croissance pré et postnatal et une déficience mentale dans les cas les plus sévères **[207]**.

Par la suite de nombreuses études ont permis d'affiner les connaissances sur le SAF. Il fut ainsi mis en évidence qu'une exposition à l'alcool pendant la grossesse n'engendrait pas systématiquement toutes les caractéristiques pour conclure à un diagnostic de SAF **[208]**. Les conséquences d'une alcoolisation maternelle étant variables, différentes déclinaisons du syndrome furent identifiées, l'ensemble étant regroupé sous le terme de troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF ou *FASD* en anglais pour *Fetal Alcohol Spectrum Disorder*) dont le SAF constitue la forme la plus sévère **[209]**.

c. Troubles associés à une alcoolisation maternelle

Dans le monde, on estime que 1 femme sur 10 consomme de l'alcool au cours de sa grossesse, et la prévalence du syndrome d'alcoolisation fœtale se situe à 1,5 cas pour 1000 naissances (**Figure 26** ; **[210 ; 211]**), contre 7 cas pour 1000 naissances pour les TCAF **[212]**. En Europe, 25 % des femmes enceintes consomment de l'alcool au cours de la grossesse, et la prévalence du SAF se situe aux alentours de 3 cas pour 1000 naissances **[213]**. La France ne fait malheureusement pas exception. Selon le baromètre santé 2017, 1 femme sur 10 consommeraient de l'alcool alors qu'elles savent qu'elles sont enceintes, et 6 femmes sur 10 déclarent avoir été informées par le personnel médical des dangers associés **[214]**. Ces données épidémiologiques révèlent ainsi un problème de santé publique majeur, et pourtant évitable.

[206] Jones & Smith, **1973**.
[207] Mattson *et al.*, **2019**.
[208] Chasnoff *et al.*, **2015**.
[209] Riley *et al.*, **2011**.
[210] Popova *et al.*, **2017**.
[211] Popova *et al.*, **2019**.
[212] Lange *et al.*, **2017**.
[213] World Health Organization, **2018**.
[214] Baromètre Santé **2017**, Santé Publique France.

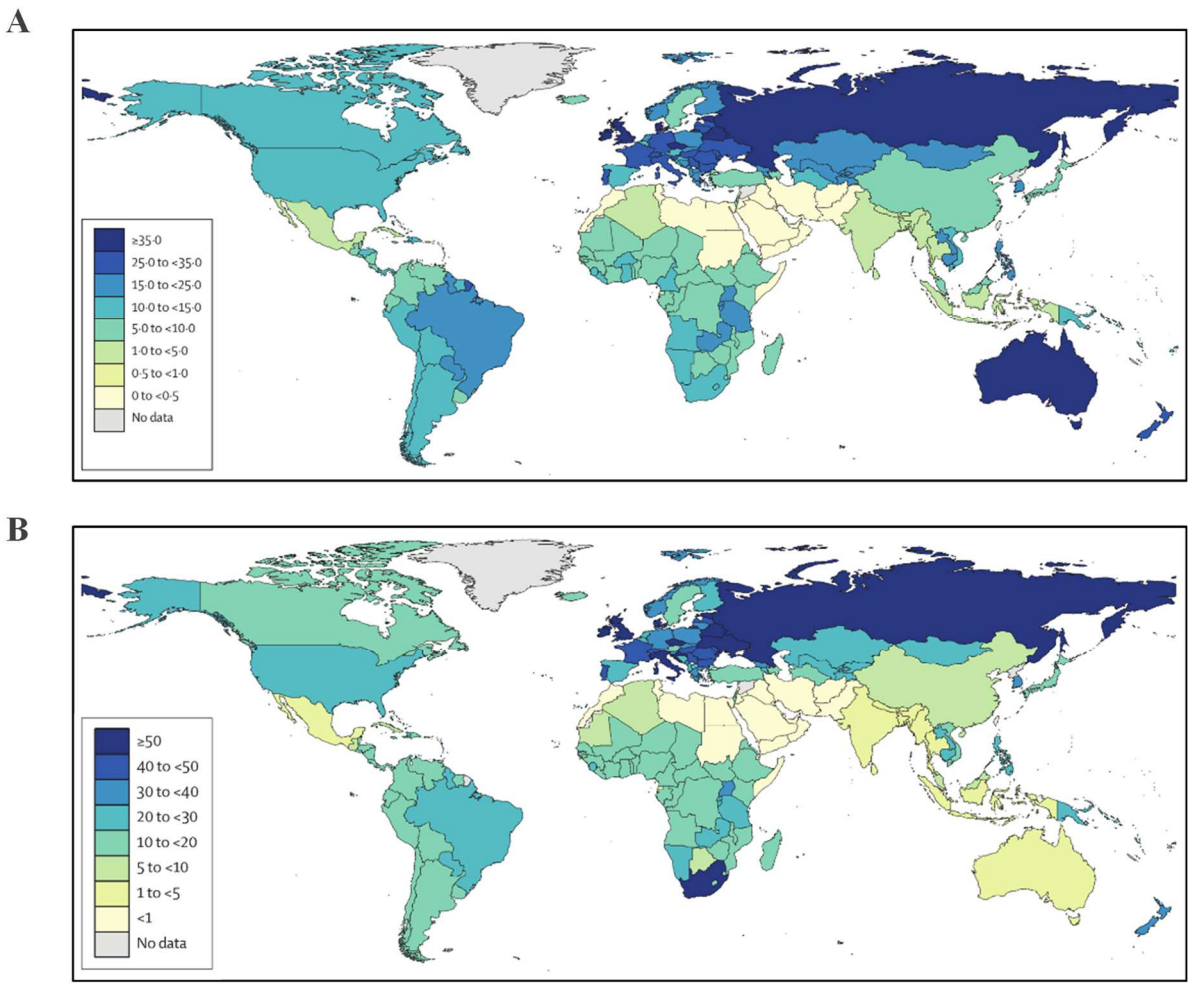


Figure 26 : Prévalences mondiales de la consommation d'alcool au cours de la grossesse et du SAF au sein de la population générale, en 2012.

(A) Prévalence globale (en %) parmi la population générale de la consommation d'alcool au cours de la grossesse en 2012. Se situant à 9,8 %, la prévalence moyenne des femmes consommant de l'alcool au cours de leur grossesse, masque en réalité des disparités relatives à des indicateurs socio-économiques, culturels et religieux. Ainsi, les 5 pays ayant la plus forte prévalence appartiennent tous à la zone Europe, et ceux présentant la plus faible, appartiennent à la région méditerranéenne orientale. (B) Prévalence globale de SAF en 2012, parmi la population générale. La Biélorussie, l'Italie, l'Irlande, la Croatie et l'Afrique sont les 5 pays avec la prévalence la plus haute de SAF (pour 10 000 personnes). Les 5 pays avec la prévalence la plus faible sont le sultanat d'Oman, les Emirats Arabes Unis, l'Arabie Saoudite, le Qatar et le Koweït. D'après Popova *et al.*, 2017 **[210]**.

La mise en place d'un parcours de soins adapté se révèle particulièrement complexe du fait de l'éventail de troubles qu'engendre une alcoolisation maternelle. Ces troubles se traduisent notamment par des déficits cognitifs, des troubles de l'apprentissage, de l'attention ou encore de la mémorisation **[215]**. L'alcoolisation prénatale représente ainsi la première cause de retard mental acquis aux Etats-Unis **[216]**, les scores des quotients intellectuels étant

[215] Mattson *et al.*, **2011**.
[216] Williams *et al.*, **2015**.

diminués chez les individus exposés *in utero* à l'alcool **[215]**. Des troubles du langage peuvent également être retrouvés, les individus TCAF présentant des déficits au niveau des capacités grammaticales **[217]**. Des troubles des fonctions motrices sont également retrouvés. En effet, des altérations de la motricité fine **[218]** et une diminution des performances sensorimotrices **[219]** ont été décrites chez des enfants fortement exposés à l'alcool au cours de la grossesse. Enfin, la planification et la résolution de problèmes peuvent également être altérées chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool. Un ensemble d'études a notamment montré que le temps passé à identifier une stratégie optimale pour résoudre une situation problématique était diminué chez les enfants TCAF, conduisant à l'utilisation de stratégies moins efficaces, et à une augmentation de la violation des règles **[207]**.

Les troubles associés à une alcoolisation maternelle sont donc multiples et entraînent des conséquences au long terme. Ces altérations neurodéveloppementales conduisent à l'émergence de troubles secondaires qui aboutissent à des inadaptations sociales importantes (échec scolaire, exclusion sociale, perte d'autonomie, consommation de substances illicites, délinquance, …) **[220]**. A titre d'exemple, les patients TCAF présentent des troubles d'ordre psychiatrique de façon significative **[221]**. Du fait de l'éventail des troubles associés, la prise en charge des patients exposés *in utero* à l'alcool requiert donc une multitude de soins et de services qu'ils soient médicaux, chirurgicaux, comportementaux, éducationnels ou encore judiciaires. L'ensemble constitue un réel fardeau pour l'enfant, sa famille mais également pour la société **[222]**. De nombreuses études ont tenté d'estimer le coût de prise en charge de ces troubles. Au Canada, une étude récente a ainsi évalué le coût annuel de la prise en charge des individus TCAF entre 1,3 et 2,3 millions de dollars canadiens **[223]**. Pour la prise en charge d'un individu SAF sur l'ensemble de sa vie, le coût estimé s'élève à environ 2 millions de dollars **[222]**. En France, le coût par individu, de la naissance à ses 20 ans, est estimé à 520 000 euros **[224]**.

La prévention primaire visant à informer sur la nécessité d'une absence de consommation d'alcool pendant la grossesse constitue un réel enjeu pour nos sociétés, la communication au

[217] Thorne *et al.*, **2017**.
[218] Kalberg *et al.*, **2006**.
[219] Jirikowic *et al.*, **2008**.
[220] Streissguth *et al.*, **2004**.
[221] O'Connor et al., **2014**.
[222] Lupton *et al.*, **2004**.
[223] Popova *et al.*, **2016**.
[224] Guyet *et al.*, **2009**.

grand public étant essentielle. Par ailleurs, un diagnostic précoce des enfants exposés *in utero* à l'alcool est important afin de les orienter vers une prise en charge le plus précoce possible. Enfin, l'amélioration de la prise en charge dans le but de limiter le handicap et ces conséquences au long terme, ainsi que la formation au dépistage par les professionnels, sont partie intégrante de la stratégie à déployer **[214]**.

2. Influence de l'alcool sur le neurodéveloppement

a. Mécanismes d'action de l'alcool et vulnérabilité cérébrale

Rapidement absorbé après ingestion, l'éthanol diffuse librement aux travers des membranes biologiques du fait de sa nature liposoluble, jusqu'à atteindre un équilibre avec le compartiment plasmatique. Le métabolisme de l'éthanol est assuré majoritairement par détoxication hépatique, par processus d'oxydation à l'aide de trois enzymes : l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH), le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et la catalase **[225]**. Aboutissant à la production d'acétaldéhyde, métabolite hautement toxique, ces réactions d'oxydation participent aux dommages tissulaires par production de radicaux libres **(Figure 27** ; **[226])**. Par ailleurs, une proportion mineure de l'éthanol ingéré est transformée par voie non-oxydative, les produits obtenus pouvant servir de biomarqueurs d'exposition à l'éthanol tels que le *fatty acid ethyl ester* (FAEE ; **[227]**). Enfin, bien que la métabolisation de l'éthanol soit majoritairement hépatique, le cerveau est également en mesure de le dégrader par oxydation par le CYP2E1, l'enzyme ADH étant peu exprimé au sein de cet organe **[228]**.

[225] Birkova *et al.*, **2021**.
[226] Albano *et al.*, **2006**.
[227] Zakhari, **2006**.
[228] Heit *et al.*, **2013**.

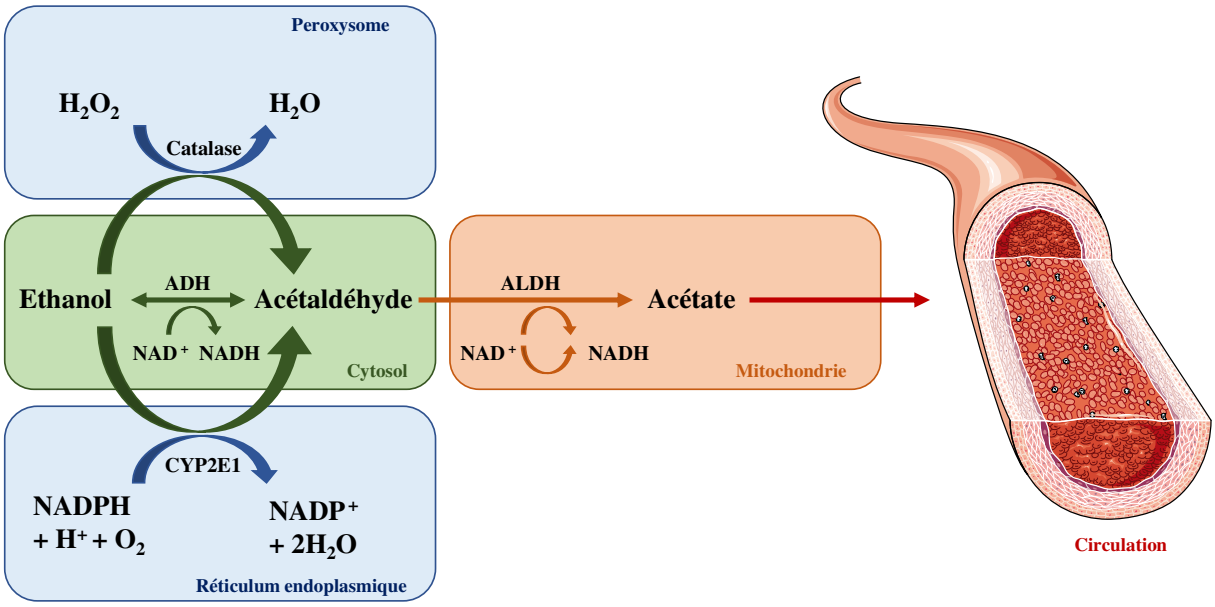


Figure 27 : Mécanismes impliqués dans le métabolisme de l'alcool dans le foie par les processus oxydatifs.

De multiples mécanismes métaboliques permettent une élimination de l'alcool par l'organisme. La métabolisation de l'éthanol en acétaldéhyde s'effectue par le biais de trois voies oxydatives distinctes que sont : l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH), la catalase, et enfin le cytochrome P4502E1 (CYP2E1), respectivement présents au sein du cytosol, du peroxysome et du réticulum endoplasmique. Métabolisé en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) dans la mitochondrie, ce dernier est principalement distribué dans l'organisme. La quantité résiduelle d'acétate au sein de la structure hépatique est transformée en AcétylCoA, composant essentiel du cycle de Krebs, par l'intermédiaire de l'enzyme AcétylCoA synthétase. ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : acétaldéhyde déshydrogénase ; H_2O : eau ; H_2O_2 : eau oxygénée ; O_2 : dioxygène ; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH : hydrure de NAD ; $NADP^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NADPH : hydrure de NADP. **[225]** ; **[227]**.

Franchissant aisément la barrière placentaire, l'éthanol et ses produits de dégradation diffusent au sein du compartiment fœtal, en s'accumulant dans le liquide amniotique **[229]**. Au cours de la période fœtale, le métabolisme de l'éthanol est limité associé à une élimination de l'alcool lente. La voie majeure d'élimination de l'alcool chez le fœtus s'effectue grâce un transfert du compartiment fœtal vers le compartiment maternel. Il en résulte une accumulation de l'alcool dans le liquide amniotique, et les phénomènes de déglutition par le fœtus accentuent le processus d'exposition, transformant le liquide amniotique en réservoir d'alcool **[230]**.

b. Impacts de l'alcoolisation fœtale sur les populations cérébrales

Associés à des mécanismes multiples et complexes, les effets liés à une exposition prénatale à l'alcool présentent une grande variabilité inter-individuelle. Ainsi, certains enfants

[229] Heller & Burd, **2014**.
[230] Nava-Ocampo *et al.*, **2004**.

exposés *in utero* à l'alcool présentent des déficits associés ou non à des caractéristiques physiques, alors que d'autres en sont exemptés **[231]**. A l'instar des autres organes, le cerveau fœtal est vulnérable au cours de son développement. Pendant toute la durée de la grossesse, ce dernier est susceptible d'être impacté par l'éthanol. Un consensus scientifique concernant un seuil de risque zéro n'ayant pas été établi, la communauté scientifique s'accorde à dire qu'il n'y a ni dose ni période autour de laquelle consommer de l'alcool serait sans danger **[231]**. Ainsi, le principe de précaution s'applique, et le message porté par les institutions de santé vont dans la même direction : « Zéro alcool pendant la grossesse ».

Une exposition prénatale précoce à l'alcool peut coïncider avec la période d'organogenèse, correspondant aux premières étapes de formation des organes d'un individu. Une consommation au cours de cette période peut notamment entraîner l'apparition d'une dysmorphie cranio-faciale caractéristique du SAF regroupant un ensemble de signes (**Figure 28**, **[232]**). Par ailleurs l'atteinte des cellules de la crête neurale vont impacter le développement du système nerveux (**[233] ; [234]**). Des malformations cérébrales ont ainsi été décrites chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool, en particulier des microcéphalies, une hydrocéphalie et une dysplasie corticale **[231]**. A partir d'études d'imagerie cérébrale, de multiples anomalies cérébrales ont été identifiées à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool, notamment des anomalies de formation du corps calleux, du cervelet ou encore des noyaux gris centraux **[231]**. De plus, la structure calleuse est particulièrement affectée par l'alcoolisation maternelle, provoquant des agénésies du corps calleux dans les cas les plus sévères **[235]**.

[231] Pruett *et al.*, **2013**.
[232] Smith *et al.*, **2014**.
[233] Cartwright *et al.*, **1995a**.
[234] Cartwright *et al.*, **1995b**.
[235] Lebel *et al.*, **2011**.

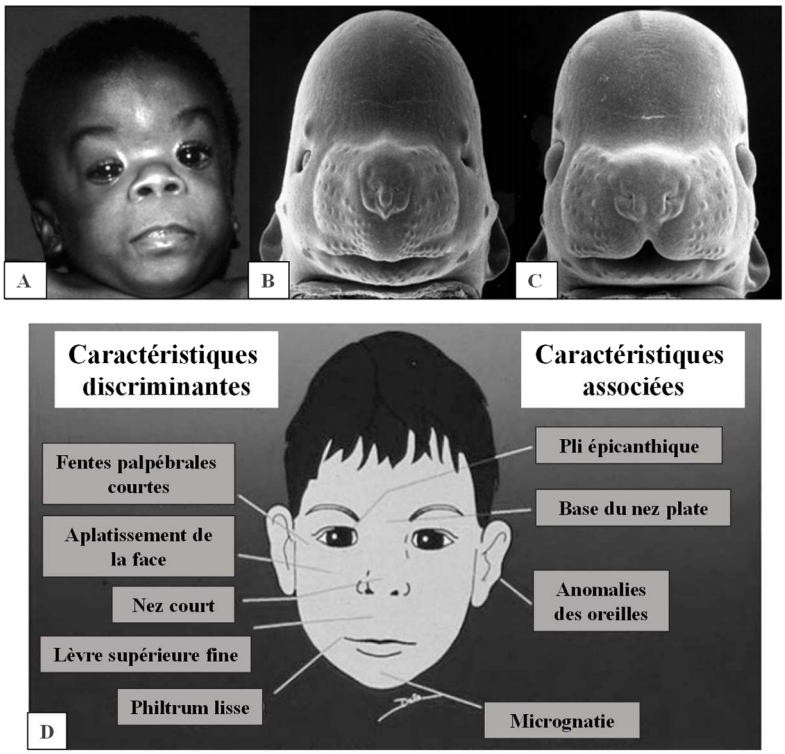


Figure 28 : Malformations cranio-faciales caractéristiques du syndrome d'alcoolisation fœtale chez l'Homme et la Souris.

Les enfants atteints du SAF (A) et les souriceaux exposés *in utero* à l'alcool (B), comparativement à un souriceau contrôle (C), présentent des anomalies cranio-faciales caractéristiques (D) : des fentes palpébrales étroites, un philtrum lisse et bombé, une lèvre supérieure lisse, une micrognathie et éventuellement une microcéphalie. D'après Clarke & Gibbard, 2001 **[236]** et modifiée d'après Sulik, 2005 **[237]**.

Bien qu'il ne possède pas de récepteur spécifique, l'éthanol présente la capacité d'agir sur de multiples mécanismes et types cellulaires, par des actions directes en tant que molécule tératogène, et indirectes, induit par ses métabolites. Particulièrement délétère au cours du neurodéveloppement, l'éthanol entraîne une réduction de la neurogenèse **[238]**, associée à une neurodégénescence apoptotique **[239]**. Parallèlement, la glie est impactée par une consommation maternelle d'alcool, associée dans un premier temps à une augmentation de l'activité microgliale **[240]** et à l'inhibition de la prolifération astrocytaire **[241]**, pour *in fine*, provoquer une mort astrocytaire et microgliale (**[242]** ; **[243]**). La population oligodendrogliale

[236] Clarke & Gibbard, **2001**.
[237] Sulik, **2005**.
[238] Ikonomidou *et al.*, **2002**.
[239] Olney *et al.*, **2002**.
[240] Fernandez-Lizarbe *et al.*, **2009**.
[241] Guerri *et al.*, **2009**.
[242] Wilhem & Guizzetti, **2016**.
[243] Kane *et al.*, **2011**.

n'est également pas épargnée, l'exposition prénatale à l'alcool entraînant une mort apoptotique et des défauts de différenciation oligodendrocytaire, associés à des altérations de la substance blanche (**[244]** ; **[245]** ; **[246]**). Les processus de migration cellulaire sont également touchés par l'exposition prénatale à l'alcool **[244]**, engendrant notamment des défauts de positionnement des interneurones GABAergiques par action délétère de l'éthanol sur l'activité endothéliale des microvaisseaux piaux dans le cortex en développement (**[247]** ; **[248]**). Chez l'Homme, ces altérations de positionnement sont également retrouvées, les interneurones GABAergiques présentant de plus des interactions vasculaires réduites **[249]**.

Au niveau moléculaire, l'éthanol influence la transmission synaptique, tant inhibitrice par le système GABAergique, qu'excitatrice par le système glutamatergique **[250]**. Présentant des propriétés d'antagoniste du NMDA-R, l'éthanol engendre des effets variables en fonction du mode d'exposition à l'alcool. Dans le cadre d'une consommation d'alcool aigüe, la conductance du NMDA-R est inhibée alors qu'en cas de consommation chronique, il existe une augmentation de la transmission glutamatergique **[251]**. Par ailleurs, des modulations de l'expression des sous-unités du NMDA-R sont également retrouvées, une exposition à l'alcool au cours de la troisième semaine de gestation induisant chez le Rat une augmentation de l'expression de la sous unité GluN2B **[252]**. A l'instar du système glutamatergique, l'éthanol perturbe également le système GABAergique. En effet, une faible exposition à l'éthanol au cours de la gestation favorise chez la Souris la migration tangentielle des interneurones GABAergiques **[253]** tandis qu'une exposition chronique induit une altération de la maturation du système GABAergique **[254]** et une inhibition de l'activité du récepteur $GABA_A$ **[255]**.

De nombreuses études ont récemment mis en lumière l'implication de processus épigénétiques parmis les anomalies induites par l'alcoolisation fœtale **[256]**. Engendrant des modifications stables et réversibles ou non, les modulations épigénétiques modifient la lecture

---

[244] Darbinian *et al.*, **2022**.
[245] Newville *et al.*, **2017**.
[246] Creeley *et al.*, **2013**.
[247] Léger *et al.*, **2020a**.
[248] Léger *et al.*, **2020b**.
[249] Marguet *et al.*, **2020**.
[250] Abrahao *et al.*, **2017**.
[251] Farley & Mihic, **2015**.
[252] Bird *et al.*, **2015**.
[253] Cuzon *et al.*, **2008**.
[254] Skorput *et al.*, **2015**.
[255] Hughes *et al.*, **2019**.
[256] Kaminen-Ahola, **2020**.

génétique sans modifier la séquence d'ADN. L'accès à la machinerie transcriptionnelle est modulé par des processus de méthylation de l'ADN, de méthylation et d'acétylation des histones **[257]**. Le fœtus étant particulièrement vulnérable aux facteurs environnementaux, ces modifications épigénétiques peuvent entraîner des conséquences à long terme. Ainsi, l'exposition *in utero* à l'alcool est responsable de modifications des profils de méthylation de l'ADN en particulier au niveau de la lignée germinale pouvant conduire à des atteintes chez la descendance (**[258] ; [259]**). Par ailleurs, un lien entre la consommation d'alcool par la mère et l'acétylation des histones dans le cerveau fœtal a été identifié. Les groupements acétyles formés lors du catabolisme de l'alcool sont en effet directement impliqués dans l'acétylation des histones au sein de l'hippocampe, altérant par voie de conséquence la transcription génique au sein de cette structure **[260]**.

c. Impact de l'alcoolisation fœtale sur la vascularisation cérébrale

Plus récémment, le système vasculaire a été identifié comme une nouvelle cible de l'éthanol pouvant affecter la mise en place des vaisseaux **[261]**. L'exposition à l'alcool provoque notamment une diminution des processus de cicatrisation de lésions cutanées **[262]** ou encore une diminution de l'expression de Glut1, transporteur du glucose essentiellement exprimé au sein des cellules endothéliales, pouvant dès lors entraîner un déficit en apport d'énergie au cours du neurodéveloppement **[263]**. Par ailleurs, une perturbation de la dynamique associée à l'angiogenèse est également retrouvée, l'alcool engendrant une pertubation de l'expression des membres de la superfamille des VEGFs. *In vitro*, une diminution de l'expression de VEGF-R2 est retrouvée, et à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool, une augmentation de VEGF-R1 est observée au niveau cortical **[264]**. Associée à ces perturbations moléculaires, une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux corticaux est identifiée après une exposition *in utero* à l'alcool chez la Souris et chez l'Homme **[264]**.

[257] Deans & Maggert, **2015**.
[258] Kaminen-Ahola *et al.*, **2010**.
[259] Nieto *et al.*, **2022**.
[260] Mews *et al.*, **2019**.
[261] Radek *et al.*, **2005**.
[262] Williams *et al.*, **2008**.
[263] Vorbrodt *et al.*, **2001**.
[264] Jégou *et al.*, **2012**.

d. Le placenta : outil de diagnostic précoce des troubles du neurodéveloppement

Organe transitoire essentiel au bon déroulement de la grossesse, l'exposition *in utero* à l'alcool impacte directement le placenta, provoquant chez l'Homme une vasoconstriction rapide, responsable d'une diminution d'apport en oxygène au fœtus **[265]**. Des modulations de l'expression de facteurs angiogéniques placentaires, après exposition prénatale à l'alcool ont été décrites telles qu'une diminution des taux d'ARNm codant le PlGF **[266]**, associée à une diminution de son expression protéique **[173]**. De plus, des travaux menés chez la Souris au sein du Laboratoire, ont permis de mettre en évidence qu'une répression placentaire du PlGF mime les effets d'une exposition *in utero* à l'éthanol sur l'organisation vasculaire intra-corticale (**[173]** ; **Brevet FR1555727**). Ceci souligne alors l'existence d'un axe fonctionnel « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale et qui est pertubé par l'alcoolisation fœtale **[164]**. L'exploration de cet axe « placenta-cerveau » pourrait ainsi permettre un diagnotic précoce des troubles du neurodéveloppement par l'identification de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale.

[265] Taylor *et al.*, **1994**.
[266] Rosenberg *et al.*, **2010**.

Chapitre 2

Hypothese & objectifs

La consommation d'alcool par la femme enceinte entraîne de multiples atteintes regroupées sous le terme de troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF), dont le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) représente la forme la plus sévère. Affectant en moyenne 1 enfant sur 1000 naissances en France, ce syndrome est associé à un retard de croissance *in utero*, des anomalies du développement cérébral, ainsi que des troubles du comportement, de l'apprentissage ou de l'attention chez l'enfant puis chez l'adulte. Caractérisé par la présence d'anomalies de la face, qui permettent une identification et une prise en charge précoce des enfants, le SAF représente un problème de santé publique majeur, constituant la première cause non génétique de handicap mental chez l'enfant. Dépourvus de dysmorphie faciale, les enfants TCAF échappent au diagnostic périnatal précoce, mais présentent des troubles du neurodéveloppement qui apparaissent progressivement avec l'âge, et qui sont le plus souvent détectés au cours de la scolarisation.

Il est clairement établi depuis de nombreuses années que l'alcoolisation *in utero* est responsable de multiples désordres neurodéveloppementaux, affectant l'ensemble des populations nerveuses. Cependant, il a été décrit dans la littérature que l'alcoolisation fœtale altérait également le processus d'angiogenèse, à la fois chez l'Homme et chez la Souris, provoquant une désorganisation vasculaire notamment traduite par une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux corticaux.

Au cours du neurodéveloppement, il existe une étroite communication entre les acteurs angiogéniques et les acteurs nerveux. Au-delà de la concomitance des processus d'angiogenèse et de neurogenèse, les vaisseaux fournissent aux cellules nerveuses, l'oxygène, les nutriments et les facteurs de croissance essentiels à leur développement. Plus récemment, une fine interaction entre les vaisseaux périventriculaires et la population oligodendrocytaire a été identifiée, les oligodendrocytes utilisant les vaisseaux cérébraux comme support de migration tangentielle. Compte-tenu de ces processus vasculo-associés, l'hypothèse d'une altération de l'angiogenèse corticale induite par l'alcool contribuant à des défauts de mise en place du lignage oligodendroglial a été émise.

L'objectif de mon projet de thèse visait donc à caractériser l'organisation des oligodendrocytes au niveau du cortex en développement en ciblant les interactions vasculaires, à évaluer l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur la répartition de ce profil, et sur la différenciation oligodendrocytaire et ses conséquences sur la substance blanche.

Par ailleurs, la littérature a mis en évidence l'existence d'un axe fonctionnel « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale. L'alcoolisation prénatale altère l'expression de marqueurs placentaires tels que le PlGF, biomarqueur majoritairement exprimé par le placenta, un organe transitoire mais indispensable au développement correct de la grossesse et du fœtus. Plus récemment, il a été décrit chez la Souris que la répression placentaire du PlGF mime la perturbation de la mise en place du réseau vasculaire cortical chez le fœtus. En perspective de mon projet de thèse, compte-tenu de l'existence de cet axe « placenta-cerveau », une modulation placentaire de l'expression du PlGF a été initiée afin d'évaluer l'influence de cet axe sur la mise en place du lignage oligodendroglial, et ouvrir la voie à des applications thérapeutiques potentielles de prévention des anomalies de migration des cellules nerveuses à la suite d'une alcoolisation *in utero*.

CHAPITRE 3

MATERIELS & METHODES

I. Lignée de souris et hébergement

Les souris NMRI (*Naval Medical Research Institute*) proviennent du laboratoire Janvier (Le Genest Saint Isle, France), et sont hébergées dans des cages en plexiglass avec nourriture et eau *ad libitum*. La température des salles d'hébergement est fixe (21 ± 1 °C) associée à un cycle jour/nuit de 12heures/12heures (les lumières étant allumées de 7h à 19h). Le sevrage, suivi du sexage des individus, est réalisé à P21. Les expérimentations sont réalisées suivant les recommandations du comité d'éthique français et des directives européennes (2010/63/UE), et sous la supervision d'investigateurs autorisés (B.J.G., & M.L., du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche ; Autorisation de projet : APAFIS#22136-2019092013438607 v4).

II. Traitement *in vivo* des mères gestantes et allaitantes

Une injection quotidienne d'éthanol (3g/kg ; dilué à 50 % (v/v) dans du NaCl 0,9 %) ou de NaCl (0,9 %) est réalisée en sous-cutanée du 15ème jour gestationnel (JG15) au JG20 (Jégou *et al*., 2012 **[264]** ; Lecuyer *et al*., 2017 **[173]**). Le jour de mise-bas (P0) et un jour après (P1), les mères allaitantes reçoivent une injection quotidienne suivant le même protocole. La dose d'éthanol circulante résultante correspond alors à 1,5 g/L de sang, 30 minutes après injection. Après 3 heures, l'alcoolémie de la femelle gestante est revenue au niveau basal (Jégou *et al*., 2012 **[264]**).

III. Evaluations comportementales

Les tests comportementaux ont été conduits selon un planning et un expérimentateur donné, afin de limiter de potentiels effets liés à la manipulation des animaux. Associé à l'évaluation comportementale, un suivi de poids a été réalisé pour chaque individu, de P2 à P10, puis à P15 et P45.

1. Evaluation des capacités sensorimotrices des souriceaux

La mise en place des capacités sensorimotrices des souriceaux a été évaluée à l'aide de deux tests (**Figure 29**) : le test de retournement (*righting reflex test* ; de P2 à P8) et le test de géotaxie négative (*negative geotaxis test* ; de P5 à P8).

Placé sur le dos, le test de retournement permet de mesurer le temps en seconde mis par le souriceau à se retourner sur ses quatre pattes. Par jour, chaque souriceau effectue deux essais, qui seront moyennés. Un *cut off*, soit une durée maximale du test, est fixée à 60 secondes, et conditionne l'arrêt de l'essai en cours.

Placé tête en bas sur une pente inclinée à 45°, le test de géotaxie négative évalue le temps en seconde mis par le souriceau à se retourner à 180°, soit tête en haut. Un essai est effectué par jour et par souriceau, le *cut off* étant fixé à 60 secondes.

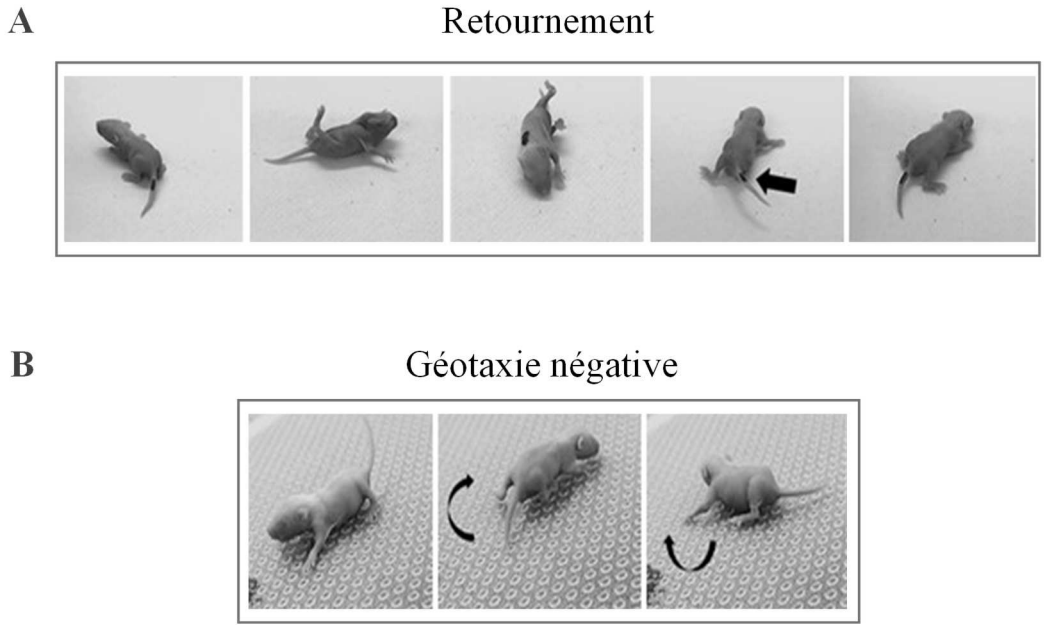


Figure 29 : Illustrations des tests utilisés pour l'évaluation sensorimotrice des souriceaux.

(A) Test de retournement ou *righting reflex test* réalisé chez le souriceau de P2 à P8. **(B)** Test de géotaxie négative ou *negative geotaxis test* réalisé chez le souriceau de P5 à P8.

2. Evaluation des capacités motrices chez la Souris à P15 et à P45

Les capacités motrices des Souris exposés *in utero* à l'alcool ou au NaCl ont été évaluées à P15 et à P45 *via* un test d'activité locomotrice (**Figure 30**), réalisé au sein de la plateforme comportementale (Service Commun d'Analyse Comportementale, SCAC) de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB ; Université Rouen Normandie). Préalablement, chaque individu est isolé dans une cage individuelle pendant 5 minutes, puis est déposé au centre du dispositif expérimental, une boîte carrée en plexiglass opaque de 50x50x38 cm (l x L x h cm) de côté. Ce test comportemental se base sur la tendance naturelle des souris à explorer un nouvel environnement. Au cours de chaque session test, d'une durée de 30 minutes, l'exploration environnementale réalisée par la souris est enregistrée par vidéo tracking, et le logiciel EthoVision XT (Noldus®) fournit un ensemble de paramètres préalablement établis (distance parcourue, temps d'activité, temps d'immobilité, etc.) au sein de deux zones auparavant définies (zone centrale *versus* zone périphérique).

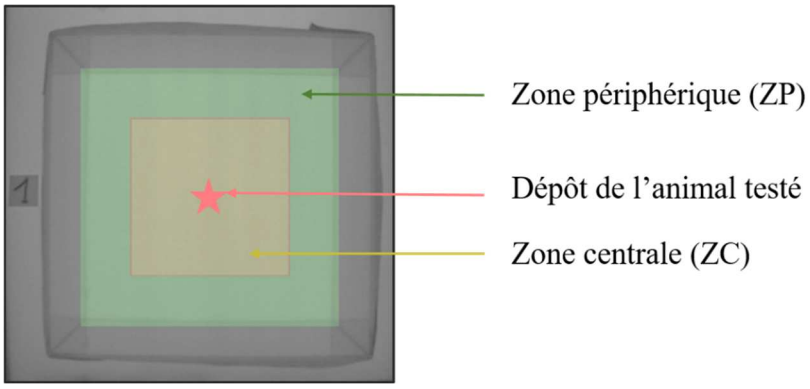


Figure 30 : Illustration du test d'activité locomotrice chez la Souris à P15 et à P45.

Le test d'activité locomotrice se base sur la tendance naturelle des Souris à l'exploration de leurs environnements. Ainsi, au travers un ensemble de paramètres, tels que la distance parcourue, le temps passé dans une zone d'étude ou encore le temps d'immobilité, la locomotion globale des individus est évaluée. Préalablement au test, 2 zones d'études sont définies au sein du dispositif : la zone périphérique (ZP) et la zone centrale (ZC), cette dernière représentant une zone d'inconfort pour la Souris. Enfin, l'étoile représente l'endroit où chaque individu est déposé au début de la session d'enregistrement.

IV. Evaluation moléculaire du lignage oligodendrocytaire

1. Approche par Western blot

Après extraction au 20ème jour embryonnaire (E20), à P2, P15 et P45, les hémisphères cérébraux ont été lysés à l'aide d'un tampon de lyse Tébu Bio© supplémenté à 1 % avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après 20 minutes sur glace, une centrifugation des lysats protéiques a été réalisée pendant 20 minutes à 12000g. Les surnageants ainsi obtenus ont été dosés selon la méthode de Bradford, la concentration protéique étant mesurée par spectrophotométrie à 595 nm, à l'aide d'une gamme étalon de *bovine serum albumin* (BSA). Cinquante microgrammes de protéines cérébrales complémentés avec du tampon Laemmli 2X (Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,8 ; SDS 8 % ; bleu de bromophénol 0,5 % ; glycérol 10 % ; β-mercaptoéthanol 10 %), ont été dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 minutes, puis déposés sur des gels de polyacrylamide 10 %, parallèlement au dépôt d'un marqueur de poids moléculaire. La migration a été réalisée à 250 V pendant 30 minutes dans un tampon de migration (Tris-Base ; Glycine ; SDS 10 %). A la suite de l'activation des gels pendant 5 minutes (Gel Doc EZ Imager™), les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose immergée dans un tampon de transfert (*trans-blot turo 5X transfert buffer*, éthanol) pendant 7 minutes à 25 V, à l'aide du système Trans-Blot Turbo™. Saturée dans une solution de blocage (*Tris buffer saline* Tween 20 (TBST) 0,1 % ; lait 5 %) pendant 1 heure afin d'éviter des interactions non-spécifiques entre les anticorps, la membrane a ensuite été incubée

pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires des protéines d'intérêt (**Tableau 1**). Après 3 rinçages de 10 minutes dans du TBST, une incubation de 1h30 à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à une *horseradish peroxyidase* (HRP) dirigés contre l'anticorps primaire a été réalisée. A l'aide du kit ECL et du système *ChemiDoc Imaging System* (*Biorad* ; Marnes-la-Coquette, France), les protéines ont été révélées par chemiluminescence. Le niveau d'expression de chaque protéine d'intérêt est quantifié après correction par la mesure du ratio sur la β-actine.

Anticorps primaire	Référence	Hôte	Fournisseur
CNPase	ab227218	Rabbit	Abcam
MBP	ab7349	Rat	Abcam
Olig2	ab136253	Rabbit	Abcam
PDGFRα	PA5-16571	Rabbit	ThermoFischer
β-actine	A5441	Mouse	Sigma-Aldrich

Anticorps secondaire HRP	Référence	Fournisseur
Goat anti Rat	sc-2065	Santa Cruz
Mouse anti Rabbit	sc-2357	Santa Cruz
Donkey anti Mouse	715.035.151	Jackson

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western blot

CNPase : 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase ; HRP : *horseradish peroxidase* ; MBP : *myelin basic protein* ; Olig2 : *oligodendrocyte transcription factor* 2 ; PDGFRα : *platelet-derived growth factor receptor* A.

2. Approche par qRT-PCR

A partir des hémisphères cérébraux isolés à E20, P2 et P15, les ARNm ont été extraits à l'aide du kit d'extraction *NucleoSpin RNA Plus* (Macherey-Nage ; Hoerdt, France). La concentration des échantillons et le calcul des ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} ont été déterminés à l'aide du Nanodrop 2000/2000c® (*Thermo Fischer Scientific* ; Massachusetts, USA). Afin de dégrader l'ADN contaminant restant, un traitement des échantillons à la DNase I a été réalisé. La rétro-transcription des ARNm a été réalisée à l'aide du kit *Reverse Transcription System* (*Promega* ; Madison, Wiconsin, USA), au travers l'incubation d'un microgramme d'ARNm avec un mélange réactionnel contenant le tampon de RT, le MgCl2 [25 mM], les dNTP, l'enzyme *avian myeloblastosis virus* RT (AMVRT) ainsi qu'un inhibiteur de RNase. Une fois les échantillons rétro-transcrits, ces derniers sont dilués au 1/10ème, et associés au mélange réactionnel d'amplification *SYBR Green PCR MIX* (*Biorad*, Californie, USA) et des amorces sens et anti-sens spécifiques des gènes d'intérêt étudiés et préalablement validées (**Tableau 2**).

Amorces	Séquences 5' → 3'
PDGFRα *f*	GACGTTCAAGACCAGCGAGTT
PDGFRα *r*	CAGTCTGGCGTGCGTCC
CNPase *f*	AGACAGCGTGGCGACTAGACT
CNPase *r*	GGGCTTCAGCTTCTTCAGGT
MBP *f*	ACGAGAACTACCCATTATG
MBP *r*	GATGGAGGTGGTGTTC
Olig2 *f*	AGCCAGGTTCTCCTC
Olig2 *r*	GGGCAGAAAAAGATCATC
GAPDH *f*	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
GAPDH *r*	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des séquences des amorces utilisées en qRT-PCR.
Les amorces ont été obtenues chez le fournisseur *Invitrogen*.

Réalisé à l'aide du lecteur *LightCycler*® 96W1.1 (Roche, Bâle, Suisse) le programme de PCR est défini comme suit : *(i)* 95°C pendant 3 minutes, 40 cycles alternant 10 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C, 97°C pendant 10 secondes, puis 65°C pendant 60 secondes, et enfin 1 seconde à 97°C. La méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permet le calcul de la quantité d'ADN complémentaire (ADNc). La glycéraldhéhyde-3phosphate (GAPDH) a été choisie comme gène de référence. Enfin, la dénomination « Ct » pour « *threshold cycle* » correspondant à la mesure de fluorescence où l'intensité du signal de fluorescence est supérieure au bruit de fond défini par le thermocycleur :

$\Delta\Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence (GAPDH)}}$

$\Delta\Delta Ct_{\text{échantillon}} = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{(moyenne des Ct du groupe choisi comme référence)}}$

V. Evaluation histologique des oligodendrocytes

1. Immunohistochimie

Après extraction des cerveaux aux différents âges d'intérêt (E20, P2, P15 et P45), les cerveaux sont successivement immergés dans du PFA 4 % pendant 1h, puis dans une solution de cryoprotection (saccharose dilué à 30 % dans du *phosphatate-buffered saline* (PBS)) pendant 72h. Les cerveaux sont par la suite congelés dans du 2-méthylbutane (VWR, Pennsylvanie, USA) à -35°C, puis conservés à -80°C avant utilisation. A l'aide du cryostat Leica CM 1950® (Nussloch, Allemagne), des coupes de cerveaux de 20 µm ont été réalisées. Afin de réaliser les marquages cibles, les coupes sont préalablement incubées à température ambiante pendant 45 minutes dans un tampon de perméabilisation (BSA 1 % ; Triton x100 3 % dans du PBS), puis

incubées une nuit à 4°C avec les anticorps primaires d'intérêts, dilués au 1/200ème (**Tableau 3**). Après 3 rinçages au PBS, les lames ont été incubées avec les anticorps secondaires Alexa Fluor® 488 et 594 correspondants, dilués au 1/400ème (**Tableau 3**). Après 3 nouveaux rinçages au PBS, le montage des lames sous lamelle a été réalisé avec un mélange PBS-glycérol 50 % (v/v), puis scellé à l'Eukitt®. A l'aide d'un microscope Leica DMI 600B couplé à une caméra et au logiciel Métamorph® (Roper Scientific, Downingtown, USA), d'un microscope Leica confocal TCS SP8 MP ou d'un *Thunder Imaging* CTR5500, les différents fluorochromes ont été visualisés.

Anticorps primaire	Référence	Hôte	Fournisseur
CD31/PECAM	cat 550274	Rat	BD-Pharmigen
CD34	790-2927	Mouse	ROCHE
CNPase	NB100-1935	Chicken	Novus Biological
Glut1	sc-1605	Goat	Santa Cruz
MBP	ab7349	Rat	Abcam
Olig2	ab136253	Rabbit	Abcam
PDGFRα	AF1062	Goat	R&D System

Anticorps secondaire	Référence	Fournisseur
Donkey anti Rabbit Alexa Fluor 594	A21207	ThermoFischer
Donkey anti Rat Alexa Fluor 594	A21209	
Chicken anti Rat Alexa Fluor 488	A21470	
Donkey anti Goat Alexa Fluor 488	A11055	
Goat anti Chicken Alexa Fluor 488	A11039	

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.

CD31 : *cluster of differenciation* 31 ; CNPase : 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase ; Glut1 : *glucose transporter* 1 ; MBP : *myelin basic protein* ; Olig2 : *oligodendrocyte transcription factor* 2 ; PDGFRα : *platelet-derived growth factor receptor* A ; PECAM : *platelet endothelial cell adhesion molecule*.

2. Quantification de la densité des cellules Olig2-positives au sein du corps calleux et des couches corticales

La densité des cellules Olig2-positives a été évaluée au sein du corps calleux, des couches corticales profondes et des couches corticales superficielles. A la suite d'un immunomarquage dirigé contre Olig2 aux stades E20, P2 et P15, et après acquisition des images, une région d'intérêt (ROI) a été définie dans chaque zone d'étude (corps calleux, couches corticales superficielles, couches corticales profondes) *via* l'utilisation du logiciel d'analyse d'images FIJI

(*Fiji Is Just ImageJ*). A l'aide de l'outil *multi-point*, les cellules Olig2-positives ont été dénombrées par seuillage au sein de chaque ROI. La densité a ensuite été déterminée par un ratio du nombre de cellules au sein de la ROI sur l'aire de la ROI. Le dénombrement cellulaire a été réalisé au sein de chaque zone d'étude de la zone fronto-pariétale, dans les deux hémisphères, sur trois coupes par individus (Léger *et al*., 2020 **[247]**).

3. Mesure du profil immuno-réactif des oligodendrocytes immatures et matures au sein des couches corticales

Afin de déterminer le profil d'expression des oligodendrocytes immatures et matures au sein des couches corticales, des immunomarquages ciblant les protéines CNPase et MBP ont été réalisés à P15. Après acquisition des images au sein de la zone fronto-pariétale, une quantification de l'intensité de fluorescence au sein des couches corticales a été réalisée en utilisant l'outil *linescan* du logiciel Metamorph®. Pour se faire, une répétition de 5 mesures d'intensité de fluorescence a été réalisée au sein d'une coupe par individu, avant d'être moyennée. Enfin, l'aire sous la courbe des intensités de fluorescence de chaque couche corticale a été évaluée. Une comparaison des distributions relatives des profils d'expression de la CNPase et de la MBP a été effectuée couche par couche.

4. Quantification des fibres MBP-positives et des faisceaux MBP-positif respectivement au sein des couches corticales et du striatum

A l'aide d'un immunomarquage réalisé à P15 ciblant la protéine MBP, les oligodendrocytes matures ont été visualisés au sein des structures étudiées. Après acquisition des images au niveau de la zone fronto-pariétale, une ROI a été définie au sein du cortex à l'aide du logiciel FIJI. Par la suite, une quantification par seuillage des fibres MBP-positives au cœur de cette ROI a été réalisée, donnant accès à une densité de fibres MBP-positives au sein des couches corticales. Des acquisitions supplémentaires au niveau du striatum ont été effectuées. Après définition d'une ROI, l'aire correspondante ainsi que le nombre d'objet au sein de cette ROI ont été obtenus à l'aide du logiciel FIJI, donnant accès à la densité de faisceaux MBP-positif au sein du striatum. L'ensemble des quantifications a été réalisé sur les deux hémisphères au sein d'une coupe par individu, et pour six individus.

5. Microscopie électronique des corps calleux chez la souris à P15

Afin de réaliser les acquisitions de microscopie électronique, une succession de fixation a été réalisée à partir des corps calleux extraits à P15, issus d'individus préalablement exposés

in utero au NaCl ou à l'éthanol. Ainsi, une première fixation des corps calleux a été réalisée à partir de glutaraldéhyde à 2 % (dans un tampon Sörensen + 1 % de saccharose) pendant une nuit. Après 3 rinçages de 10 minutes (tampon Sörensen/Saccharose/NaCl), une seconde fixation des corps calleux a été effectuée à l'aide de tétroxyde d'osmium à 1 % (dans un tampon Sörensen + NaCl). Une déshydratation progressive des échantillons *via* des expositions successives d'éthanol à concentration croissante a ensuite été réalisée, la déshydratation complète étant finalisée à la suite d'un bain de 1h acétonitrile/éthanol (vol/vol), suivi d'un bain de 1h d'acétonitrile. Pour terminer, l'inclusion en résine époxy des échantillons a été effectuée au travers des bains successifs résine/acétonitrile, avec une concentration croissante de résine comme suit : 25 % pendant 4h, 50 % pendant 1 nuit, 75 % pendant 4h, 90 % pendant 1h, puis résine pure pendant 1h. Enfin, un sixième bain de résine EPON pure a été effectuée pendant une nuit. A partir des blocs ainsi obtenus, des coupes semi-fines ont été réalisées, colorées à l'aide du bleu de toluidine, d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb dans le but d'améliorer le contraste et d'identifier les zones d'intérêt puis des coupes ultrafines ont été effectuées, et examinées au microscope électronique PHILIPS CM10.

6. Evaluation des profils axonaux myélinisés et des épaisseurs de gaine de myéline au sein du corps calleux

A partir des acquisitions de microscopie électronique de corps calleux de souris à P15 (grossissement x295), la densité des axones myélinisés a été quantifiée à l'aide du logiciel FIJI, *via* un dénombrement des axones myélinisés rapportés à l'aire de la ROI. La surface axonale myélinisée globale ainsi que l'épaisseur de la gaine de myéline ont été quantifiées dans un second temps sur des acquisitions à plus fort grossissement (x895).

7. Evaluation de l'orientation vasculaire et des interactions oligo-vasculaires

Afin d'évaluer les interactions entre les oligodendrocytes et les vaisseaux corticaux, un double immunomarquage a été réalisé à E20, P2 et P15, utilisant les anticorps primaires Olig2, CD31 ou Glut1 (**Tableau 3**). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope Leica confocal TCS SP8 MP, associées à une résolution 1024x1024 pixels et une compilation d'images en z. L'interaction oligo-vasculaire a été considérée comme effective lorsque la distance entre la partie la plus centrale de la cellule Olig2-positive et celle du vaisseau, est inférieure à 10 µm. Le dénombrement des cellules Olig2-positives associées aux vaisseaux, a été effectué selon le même protocole mis en place lors de l'évaluation de la densité Olig2-positive. Par ailleurs, l'orientation des vaisseaux corticaux a également été déterminée sur ces

mêmes images. Le dénombrement des interactions oligo-vasculaires a été réalisé dans la zone fronto-pariétale des deux hémisphères cérébraux, sur trois coupes par individus, et pour six individus.

VI. Influence des modulations placentaires sur l'axe placenta-cerveau & alcoolisation *in utero*

La surexpression placentaire du PlGF a été réalisée par la technique d'électroporation *in utero* à E13, puis le traitement des mères gestantes, à l'éthanol (3g/kg) ou au NaCl (0,9 %), a été réalisé du JG15 au JG20 (Lecuyer *et al*., 2017 **[173]**). Pratiquement, les souris gestantes ont été anesthésiées par un bolus d'isoflurane 5 %, et maintenues sous masque à 1,8 % d'isoflurane. Un contrôle thermique des souris a été réalisé pendant l'intégralité de la chirurgie. En application, après une désinfection de la peau de l'animal suite à un rasage des poils, ainsi que l'application d'un anesthésique local (lidocaïne), un champ stérile a été déposé sur l'abdomen des souris. Une laparotomie a été réalisée afin d'accéder aux embryons et aux placentas. Après identification des positions de chaque embryon au sein des cornes utérines, les injections des plasmides *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), codant la protéine fluorescente, et des plasmides lentiviraux d'activation ciblant le PlGF (*Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Activation* du PlGF (CRISPR-PlGF-Act) ; **Figure 31**) ont été effectuées à l'aide d'une pipette de verre standardisée par une jauge millimétrée (0,58 mm de diamètre interne, et 1,0 mm de diamètre externe) au sein des placentas.

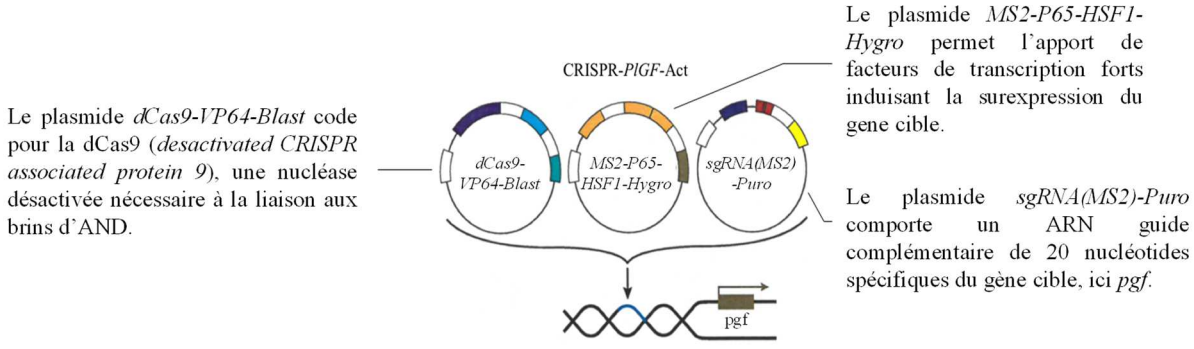


Figure 31 : Composition du complexe de plasmides lentiviraux d'activation (CRISPR-*PlGF*-Act).

La technologie CRISPR-Act (*Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Activation*) permet de surexprimer un gène cible, et se compose de 3 plasmides fonctionnant en synergie mais ayant des fonctions spécifiques respectives (SantaCruz Biotechnology, CA, USA).

Après injection, l'électroporation est réalisée *via* l'application d'un courant à l'aide d'une électrode en platine spécifique disposée de part et d'autre du placenta préalablement injecté (CUY650P5 ; Nepagene Co., Ichikawa, Japon). Après la transfection de trois placentas (soit trois embryons) par mère gestante, les cornes utérines ont été délicatement replacées au sein de la cavité abdominale. Le péritoine et la peau ont été suturés respectivement par surjet à point passé et par point simple, à l'aide d'un fil stérile (Prolène 6-0, ETHICON, Lidingö, Suède). Avant le réveil de l'animal, la suture a été nettoyée avec de la biseptine et 1 mL de NaCl 0,9 % a été injecté en sous cutané. Les souris ont été surveillées dans les heures suivant l'opération, et un contrôle des sutures a été réalisée à 24h post-chirurgie. Après traitement quotidien des mères gestantes à l'éthanol (3g/kg) ou au NaCl (0,9 %) de JG15 à JG20, une hystérectomie a été réalisée à JG20. Par la suite, les cerveaux des embryons et les placentas correspondants ont été prélevés afin d'évaluer, *via* des expériences d'immunohistochimie, de Western blot et de qRT-PCR, l'impact d'une modulation placentaire du PlGF en contexte d'alcoolisation maternelle sur le lignage oligodendrocytaire et les interactions oligo-vasculaires.

VII. Analyses statistiques

Le montage des figures et l'analyse statistique ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism® version 9.00 (La Jolla, CA). Les tests utilisés et les *p values* associées sont résumés au sein des articles originaux dans le *chapitre 4 – Résultats*. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Par ailleurs, bien qu'une analyse par sexe ait été réalisée, les résultats des mâles et des femelles ont été regroupés au sein des figures lorsqu'il n'a pas été identifié d'effet sexe. Les données dégroupées femelles/mâles peuvent être retrouvées au sein des résultats complémentaires des articles originaux (*Chapitre 4 – Résultats*).

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

Etude 1

In utero alcohol exposure impairs the vessel-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing neocortex

Brosolo M[1], Lecointre M[1], Laquerrière A[1,2], Janin F[1], Genty D[2], Lebon A[3], Lesueur C[1], Vivien D[4,5], Marret S[1,6], Marguet F[1,2], Gonzalez BJ[1]

En révision dans *Neurobiology of Disease*

La consommation d'alcool par la femme enceinte peut engendrer un syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) représentant la forme la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF). Outre un impact délétère sur de nombreuses cellules nerveuses, des travaux réalisés au sein du laboratoire ont mis évidence le rôle néfaste de l'alcool sur la cellule endothéliale et l'angiogenèse cérébrale. En particulier, l'exposition chronique à l'éthanol de souris gestantes au cours de la dernière semaine de gestation entraîne chez les nouveau-nés une perturbation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques de la famille du VEGF ainsi qu'une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux corticaux. Par ailleurs, les microvaisseaux périventriculaires constituent un support de migration tangentielle des oligodendrocytes. Cette étude repose sur l'hypothèse que l'altération de l'angiogenèse corticale induite par l'exposition prénatale à l'alcool pourrait induire un défaut de migration radiale et de maturation des oligodendrocytes corticaux, et par conséquent, contribuer aux déficits de myélinisation identifiés chez les enfants SAF.

Dans cet article, nous avons mis en évidence que :

- Des interactions oligo-vasculaires sont retrouvées au niveau des vaisseaux corticaux radiaux à la fois chez l'Homme et la Souris
- L'alcoolisation *in utero* altère l'organisation radiale du réseau vasculaire en période périnatale sans impacter l'association oligo-vasculaire
- Un défaut/retard de positionnement des oligodendrocytes au sein des couches corticales est retrouvé en période périnatale à la suite d'une alcoolisation *in utero*
- L'exposition prénatale à l'alcool perturbe l'expression de marqueurs de différenciation oligodendrocytaire, favorisant le maintien d'un profil oligodendrocytaire immature
- Une atteinte postnatale du processus de myélinisation est retrouvée à la suite d'une alcoolisation *in utero*
- Ces anomalies développementales sont associées à des troubles moteurs qui persistent chez l'adulte

Ces résultats démontrent l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes corticaux. Ils révèlent un défaut/retard de positionnement et de maturation oligodendrocytaire au sein des couches corticales et suggèrent que l'altération de l'organisation radiale des microvaisseaux pourrait contribuer à ces anomalies développementales.

RESEARCH ARTICLE

Original article

In utero alcohol exposure impairs the vessel-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing neocortex

Brosolo M[a], Lecointre M[a], Laquerrière A[a,b], Janin F[a], Genty D[b], Lebon A[c], Lesueur C[a], Vivien D[d,e], Marret S[a,f], Marguet F[a,b], Gonzalez BJ[a,*]

[a] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, F 76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

[b] Department of Pathology, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France

[c] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRacLeS-PRIMACEN, 76000 Rouen, France.

[d] Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France.

[e] Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

[f] Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France

Key words: FASD, vasculature, cell migration, cortical development, MBP

*Corresponding author:

E-mail address: bruno.gonzalez@univ-rouen.fr

ABSTRACT

Prenatal alcohol exposure (PAE) is a major cause of nongenetic mental retardation and can lead to fetal alcohol syndrome (FAS), the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). FASD infants present behavioral disabilities resulting from neurodevelopmental defects. Both grey and white matter lesions have been characterized and are associated to apoptotic death and/or ectopic migration profiles. In the last decade, it was shown that PAE impairs brain angiogenesis; the radial organization of cortical microvessels is lost. Concurrently, several studies reported that tangential migration of oligodendrocyte precursors (OPC) originating from ganglionic eminences is vasculo-associated. Because numerous migrating oligodendrocytes enter the developing neocortex, the present study aimed to determine if migrating OPC were interacting with radial cortical microvessels and if alcohol-induced vascular impairments were associated to altered positioning and differentiation of cortical oligodendrocytes. Using a 3D morphometric analysis, results revealed that during perinatal life, 15 to 40 % of Olig2-positive cells were in close association with radial cortical microvessels. This association was found in both mouse and human fetuses. Despite a perinatal vascular disorganization, PAE did not modify the vessel-association of Olig2-positive cells but impaired their positioning between deep and superficial cortical layers. At a molecular level, PAE markedly but transiently reduced the expression of CNPase and MBP, two differentiation markers of immature and mature oligodendrocytes. In particular, PAE inverted their distribution profiles in cortical layers V and VI and reduced the thickness of myelin sheath of efferent axons. These perinatal oligo-vascular defects were associated with motor disabilities that persisted in adults. Altogether, the present study provides the first evidence that Olig2-positive cells entering the neocortex are associated with radial microvessels. PAE disorganized the cortical microvasculature and delayed the positioning and differentiation of oligodendrocytes. Whereas most of these oligovascular defects occurred at perinatal life, offspring developed long-term motor troubles. Altogether, these data suggest that alcohol-induced oligo-vascular impairments may contribute to the neurodevelopmental troubles described in FASD.

1. Introduction

Despites public health messaging, nearly 10% of worldwide women consume alcohol during their pregnancy (Popova et al., 2019). Prenatal alcohol exposure (PAE) represents a major cause of nongenetic mental retardation, making alcohol consumption during pregnancy, an extremely important public health concern (Lange et al., 2017). Indeed, PAE can cause fetal alcohol syndrome (FAS), the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorders (FASD; Riley et al., 2011). FAS is characterized by a large set of physical and mental disorders including intrauterine growth retardation, craniofacial dysmorphism, neurodevelopmental defects and neurobehavioral troubles, such as learning or attention deficits (Riley et al., 2011). Although most FASD children frequently express life-long behavioural disabilities as FAS, they do not present morphological dysmorphism, leading to delayed diagnosis and medical care (Chasnoff et al., 2015).

At any stages of gestation, alcohol can be harmful and, even if it impacts numerous organs and cell types, its deleterious effects are highly noxious for the developing brain (Sulik et al., 2014). In particular, based on clinical research and animal model studies, it has been shown that PAE alters oligodendrocyte morphology and survival (Creeley et al., 2013; Dalitz et al., 2008; Newville et al., 2017). Thereby, Dalitz and co-workers identify attenuated processes and altered oligodendrocyte cell bodies in brains of sheep fetuses *in utero* exposed to alcohol (Dalitz et al., 2008). Similarly, the group of Olney showed that in macaque fetuses, PAE induces apoptosis of oligodendrocytes (Creeley et al., 2013). Furthermore, it is well established that *in utero* alcohol exposure can lead to persistent white matter abnormalities, leading to corpus callosum deformities visualised using diffusion tensor imaging both in rodents and human (Newville et al., 2017 ; Wozniak et al., 2009).

Beyond the main role of oligodendrocytes consisting in improving neuronal signal conduction along myelinated axons in the mature brain (Baraterio et al., 2016), a tight cell-cell interaction has been recently evidenced in the developing brain between microvessels and oligodendrocytes (Yuen et al., 2014). Indeed, in addition to their functions of oxygen, trophic factors and nutrient supplier, it is now established that cortical microvessels constitutes physical supports for nervous cell migration (Segara et al., 2019). Firstly described for GABAergic interneurons (Won et al., 2013), Tsai and co-workers more recently shown that, oligodendrocytes constitute a second population of nervous cell migrating using a vessel-associated process (Tsai et al., 2016). In particular, oligodendrocyte precursors migrate

tangentially to reach the developing corpus callosum (Tsai et al., 2016). Consistent with these neurodevelopmental data, *in vitro* studies previously showed that growth factor production by endothelial cells, such as BDNF or VEGF, takes part in proliferation and survival of oligodendrocytes (Aria et al., 2009). Jointly, oligodendrocytes promote vascular remodelling in white matter (Myamoto et al., 2014). Altogether, these data suggested that, as recently showed for GABAergic interneurons (Léger et al., 2020a), oligodendrocytes invading the cortical layers migrate along radial microvessels.

Several *in vivo* studies performed in adult mice and nonhuman primates showed that alcohol affects angiogenesis and vasculogenesis by altering wound healing and new vessel formation (Radek et al., 2005; Williams et al., 2008). *In vitro,* ethanol has also been shown to disrupt VEGF receptor signalling in cultured endothelial cells (Radek et al., 2008). More recently, *in vitro* and *in vivo* studies performed in the developing brain, have demonstrated that alcohol impairs brain angiogenesis causing a loss of the radial organization of cortical microvessels, a dysfunction of endothelial MM9 activity and a disruption of the vessel-associated migration of GABAergic interneurons (Jégou et al., 2012; Léger et al., 2020a and 2020b). At a mechanistic level, these effects are associated to a deregulation of the expression of the VEGF receptor 1 (VEGFR1) and the endothelial NMDA receptor (Léger et al., 2020a). These deleterious effects of *in utero* alcohol exposure on the cortical vasculature and the mispositioning of GABA interneurons were also described in human fetuses (Jégou et al., 2012; Marguet et al., 2020). However, the effect of PAE on oligovascular interactions remains unexplored.

Given the critical role of oligodendrocytes for neuronal signal conduction (Jäkel and Dimou, 2017), the recently described vessel-associated migration of oligodendrocytes in the developing corpus callosum (Tsai et al., 2016) and our recent data evidencing that alcohol impairs cortical angiogenesis and endothelial activity (Léger et al., 2020a and 2020b), we hypothesized that PAE would impair the vessel-associated positioning of migrating oligodendrocytes invading the developing cortex and the maturation of the oligodendrocytic lineage. To this purpose, first, we researched oligovascular interactions in the developing cortex of human fetuses and, second, used a mouse model of FASD to: *(i)* assess the effects of alcohol on oligovascular interactions and oligodendrocytes positioning on cortical layers, *(ii)* characterize the impact of prenatal alcohol exposure on oligodendrocyte maturation stages and,

(iii) determine if such neurodevelopmental defects would be associated to perinatal and adult behavioural troubles.

2. Material and methods

2.1. Control and alcohol-exposed human brains

In agreement with the local ethic committee and French laws, fetal brains used in this study (Fig. 1A) belong to a 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). Every cases were obtained with the written consent of the parents and autopsy procedures were performed according to standardized protocols. Clinical characteristics and cause of death of control and FAS patients are presented in Table 1.

2.2. In vivo treatment of pregnant and lactating mice

NMRI (Naval Medical Research Institute) mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Mice were kept in a temperature-controlled room (21 ± 1 °C) with a 12h/12h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) and free access to food and tap water. Pregnant NMRI mice received a daily subcutaneous injection of 0.9% NaCl or 3g/kg Ethanol diluted in 50% NaCl, vol/vol, from gestational day 15 (GD15) to GD20 (Fig. 1B). At parturition day (P0) and one day after parturition (P1), mothers received a daily injection of the same composition (Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017; Léger et al., 2020b). The administered dose of ethanol was based on a previous study (Jégou et al., 2012) and resulted in a blood alcohol level (BAL) of 1.5 g/L 30 min after the injection. This BAL value which is representative of drunkenness in human was below 0.5 g/L after 3 hours. Mice were used according to the French Ethical Committee recommendations and European directives 2010/63/UE, and experiments were carried under the supervision of authorized investigators (authorization no. APAFIS#22136-2019092013438607 v4 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

For immunohistochemistry, qRT-PCR and western blot experiments targeting differentiation markers of the oligodendrocyte lineage, brains from fetuses and pups were collected at embryonic day 20, postnatal day 2 (P2), P15 and P45.

2.3. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

From E20, P2 and P15 *in utero*-exposed cortices, RNA was column-purified according to the manufacturer's guidelines (Macherey-Nagel, Germany). After DNase digestion, cDNA was

prepared from 1 µg total RNA using random primers and Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (Promega, Madison). A master mix was prepared using sens and antisens primers (Invitrogen; Table 2) and SYBR Green PCR Mix (Biorad). Using a LightCycler® 96W1.1 machine (Roche; Bâle, Suisse), PCRs were performed using the cycle conditions: 95°C (180s), 95°C (10s) and 60°C (30s) for 40 cycles, 95°C (10s), 65°C (60s) and 97°C (1s). The comparative threshold cycle (Ct) method was used and cDNA amount in sample was expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control. GAPDH mRNA level was not affected by ethanol treatment.

2.4. Analysis by western blot of cortical extracts from mouse

Cortical extracts from control and *in utero* alcohol-exposed animals were microdissected and homogenized in ice-cold lysis buffer. Fifty micrograms of proteins extracts, determined by the Bradford assay, were denatured at 100°C for 5 minutes in Laemmli buffer (Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,8 ; SDS 8% ; bromophenol blue 0,5% ; glycerol 10% ; β-mercaptoethanol 10%), loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel. After separation, proteins were electrically transferred onto a nitrocellulose membrane (Biorad Laboratories, Marne la Coquette, France). The membrane was incubated with blocking solution (5% BSA or 5% milk in Tris-Buffer saline containing 0,05% Tween 20) at room temperature for 1h and incubated overnight with primary antibodies (Table 3). After incubation with the corresponding secondary antibody coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) immunoblotting detection system (Biorad Laboratories, Marne la Coquette, France). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (Biorad Laboratories, Marne la Coquette, France), and β-actin was used as a loading control. Commercial markers (Seeblue pre-stained standard; Invitrogen) were used as molecular weight standards.

2.5. Immunohistochemistry

In mice, brain sections previously fixed with 4% PFA in PBS were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies (Table 3) diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100). Slices were rinsed thrice with PBS for 10 min and incubated with the same incubation buffer containing the appropriate secondary antibody. By omitting the primary antibodies, control for non-specific binding of the secondary antibody was performed. Immunolabeled slices were visualized using Leica DMI 600B, Thunder Imaging System

CTR5500 or Leica TCS SP8 MP confocal microscope. Analyses were done using the *FIJI Is Just Image J* (FIJI) software.

In humans, immunohistochemistries were performed on 6-µm dewaxing brain sections, according to standardized protocols, identical in mice.

2.6. Quantification of immunoreactive profiles of differentiation markers of oligodendrocytes in cortical layers

Measurements of immature and mature oligodendrocytes immunoreactive profile in cortical layers were performed after immunostaining of P15 slices with CNPase and MBP antibodies, respectively (Table 3). After 10x magnification acquisitions, quantification of CNPase or MBP fluorescent intensity profiles in the developing cortex was performed in animals prenatally exposed to NaCl or ethanol, using the "line scan" tool of the Metamorph® software (Roper Scientific, Downingtown, USA). Then, the area under the curve of each cortical layers was evaluated. For a given cortex, a comparison of the distribution pattern of the CNPase (immature oligodendrocyte) and MBP (mature oligodendrocyte) was then performed.

2.7. Quantification of the Olig2-positive cell density in the developing cortical layers and corpus callosum

Measurement of the density of oligodendrocytes in cortical layers and corpus callosum was performed after immunostaining of E20, P2 and P15 slices using the Olig2 antibody (Table 3). Images were acquired at 10x magnification, and regions of interest (ROI) were defined within the superficial cortical layers, the deep cortical layers and the corpus callosum. Fluorometric analysis using the multi-point counting tool of the FIJI software gave access to the number of immunoreactive cells present in the ROI. Density was then determined by a ratio between the number of cells and the ROI area. The analysis was repeated to cover the corpus callosum, the superficial and deep cortical layers, in both hemispheres and in three slices per animal (Léger et al., 2020a).

2.8. Measurement of microvascular organization and oligo-vascular interactions in the developing cortex

The quantification of the angular orientation of cortical microvessels was performed in the fronto-parietal cortex of control and alcohol-exposed mice at E20, P2 and P15 as previously described (Jégou et al., 2012). Practically, a frame of lines was defined perpendicular to the cortical border (radial orientation). For microvessels parallel to these lines, the Metamorph

Software arbitrary attributed the angular value 0°. Maximal angular value affected was 90°. Angle values of cortical microvessels were then distributed in four classes [0-25°[, [25-50°[,[50-75°[and [75-90°[.

The quantification of vessel-associated oligodendrocytes was performed in human and mouse brain slices after double immunostaining with Olig2 (oligodendrocytic lineage) and CD31, Glut1 or CD34 (endothelial cells) antibodies (Table 3). In human, experiments were conducted on a control fetal brain at GW30 and on a FAS fetal brain at GW29. In mouse, experiments were performed in cortex slices at E20, P2 and P15. Z stacks acquisitions were done and saved in TIFF format using a Leica TCS SP8 MP confocal microscope. Afterwards, Z-stack series of images were loaded into IMARIS imaging software 9.0.2 (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D reconstruction (sVideo 1 and 2). To validate a vessel-oligodendrocytes interaction, the maximal distance between the center part of Olig2-positive cells and the center part of the vessel was fixed at 10 µm.

2.9. Quantification of MBP-positive fibres in the cortical layers and MBP-positive bundles in the striatum

After immunostaining of P15 mouse brain slices with MBP antibody (Table 3), high resolution images were acquired at 10x magnification using a Thunder Imaging System CTR5500. Images were loaded in the FIJI software and a thresholding of the immunoreactive MBP fibers was done in each ROI of the cortex, giving access to the thresholded fiber area/ROI area ratio. Similarly, a quantification of MBP-positive bundles was performed in the striatum at the same stage. Morphometric analysis gave access to the number of immunoreactive bundles per ROI area.

2.10. Electronic microscopy and quantification of axonal myelinated fibres and myelin sheath thicknesses in the corpus callosum at P15

Electron microscopy ultrastructural studies were carried out according to standardized protocols (Roux et al., 2014). Briefly, cortices obtained from P15 corpus callosum of neonates previously *in utero*-exposed to NaCl or ethanol were fixed in a 2% glutaraldehyde solution, postfixed with 1% osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were stained with toluidine blue, uranyl acetate and lead citrate to enhance contrast, and examined under a PHILIPS CM10 electron microscope. Axonal myelinated fibres density and myelin sheath thickness in the corpus callosum was performed at P15 after electronic microscopy acquisitions at 120x and 295x magnification FIJI software gave access to the area and number

of object (myelinated fibres) within the ROI and to ROI area ratio, performed in four plans per animal. Myelin sheath thickness was evaluated using FIJI lines tools.

2.11. Behavioural evaluations

Each mouse was submitted to the same series of behavioural tests, respecting the same schedule in order to limit the potential confounding factors linked to animal manipulations. Following the last day of treatment, weight tracking was recorded daily from P2 to P10 and, subsequently, at P15 and P45 (sFig. 1). Because in human, white matter lesions, such as leucomalacia, are frequently associated to motor disabilities (Volpe et al., 2009), behavioural tests were focused on sensorimotor impairments.

2.11.1. Behavioural evaluation of pup sensorimotor disabilities

From P2 to P8, the righting reflex test consists in the evaluation of a reflexive sensorimotor ability task (Daher et al., 2017; Syed et al., 2016). Practically, pups were placed supine on a plane surface and their mean time to restore a normal prone position on two consecutive trials was noted. The cut-off time per trial was set at 60 seconds, and value was the mean of 2 successive trials.

From P5 to P8, the negative geotaxis test is a vestibular and body coordination task (Daher et al., 2017; Syed et al., 2016). The animals were placed on a 20° tilted plane, with their head facing downwards, and the mean time to realize a full rotation of 180°, face up, was measured in each group. The latency for a semi rotation (90°) was also counted. The cut-off time per trial was set at 60 seconds.

2.11.2. Evaluation of the locomotor activity

Locomotor activity of control and *in utero* alcohol-exposed mice was assessed at P15 and P45. Animals were isolated for 5 min in individual cages before being placed in individual 50 x 50 x 38 cm compartments sound-attenuated and temperature-regulated (20±1°C) room to limit anxiety. This test takes advantage of a rodent's natural tendency to explore a new environment. The recording apparatus was connected to a computer to process the data. Distance travelled was measured by video tracking using EthoVision XT logiciel (Noldus®) during a 30-min period. Data were expressed by 10-min segments and the whole recording period.

2.12. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the biostatistics Prism software (GraphPad® Software, La Jolla, CA). Tests used and *p values* were summarized in the Table 4 and Table 5.

Error bars in the graphs represent SEM. Females and males were identified. However, when results showed no sex differences, data were pooled on the same figure. Unpooled data are provided in the supplementary figures 3, 4, 7, 8 and 9.

3. Results

3.1. Vessel association of Olig2-positive cells persists in human FAS cortices

Previous studies reported that PAE impairs the cortical vasculature in the developing human brain (Jégou et al., 2012). This effect which is also retrieved in mouse is associated with a dysfunction of cortical endothelial cells (Léger et al., 2020b). Because migrating oligodendrocytes use microvessels as guides (Tsai et al., 2016), we explored if PAE altered the oligovascular association (Fig. 2). Double immunostaining experiments with Olig2 and CD34 antibodies were done in a FAS 29GW fetus (Fig. 2A). Confocal acquisitions performed in the deep cortical layers supported that some Olig2-positive cells were vessel-associated (Fig. 2B; arrows) whereas several other Olig2-positive cells were at distance (Fig. 2A,B; arrowhead). To validate the vessel-association, Z-stack acquisitions were realized and a 3D map built (Fig. 2C-E). Rotation around the vessel axis and quantification of the oligo-vascular distances indicated that, in deep cortical layers, about 6% of the Olig2-positive cells were vessel-associated (Fig. 2C-E; Fig. 2J; sVideo 1). Similarly, experiments were conducted in a control 30GW (Fig. 2F-H). Morphometric analysis showed that, as observed in the FAS case, several Olig2-positive cells were vessel-associated (Fig. 2G,H; arrow). Quantitative analysis revealed a higher percentage of vessel-associated Olig2 cells in the control fetus (15.79%; Fig. 2I). Nevertheless, considering *i)* the scarcity of human tissues and *ii)* the frequent multi-intoxication profiles of human FAS fetuses, pre-clinical experiments were conducted using a mono-intoxication model of PAE.

3.2. PAE impairs the cortical vasculature but not the Olig2-vascular association

In order to evaluate the consequence of PAE on oligo-vascular interactions, double immunolabeling experiments targeting Olig2 and CD31 were performed in the developing cortex at three developmental stages E20, P2 and P15 (Fig. 3). As performed for human fetuses, 3D Imaris maps were built to validate and quantify oligo-vascular associations (Fig. 3A,B). Such approach was required to exclude false-associated cells (Fig. 3B; arrowheads and sVideo 2). Two parameters were quantified, the vascular organization and the percentage of Olig2-positive cells associated with microvessels (Fig. 3C-N).

Regarding the vascular organization, at E20 and P2, radial microvessels (angle class [0-25[) were majority in the developing cortex (Fig. 3C-E and Fig. 3G-I). PAE significantly reduced and disorganized the cortical vasculature at both stages (Fig. 3E; Chi square NaCl E20 *vs* Eth E20, df : 9.709, 3 ; *p=0.0212 and Fig. 3I; Chi square NaCl P2 *vs* Eth P2, df : 8.536, 3 ; *p=0.0361). At P15, whereas radial microvessels remained majority (Fig. 3K-M), no significant effect of PAE on the vascular organization of the cortex was found anymore (Fig. 3M; Chi square NaCl P15 *vs* Eth P15, df : 0.8597, 3 ; p=0.8351). Concerning the oligo-vascular interactions, PAE did not modify the percentage of associated cells whatever the stage and the cortical region considered (Fig. 3F,J,N).

3.3. PAE transiently altered the positioning of oligodendrocytes in the developing cortex

Because, on one hand, the microvascular organization was impaired by PAE and, on another hand, oligo-vascular association preserved, we hypothesized that Olig2-positive cells could present positioning defects as recently described for GABAergic interneurons (Léger et al., 2020b; Marguet et al., 2020). A time-course quantification of the density of Olig2-positive cells was performed at E20, P2 and P15 (Fig. 4). In control condition, Olig2-positive cells were present in deep (DCL) and superficial (SCL) cortical layers and their density markedly increased from E20 to P2 in both regions (Fig. 4A,C,D; ****p<0.0001). Afterwards, a significant decrease occurred from P2 to P15 (Fig. 4C,D; ****p<0.0001). No significant effect of PAE was observed on the density of Olig2-positive cells whatever the stage considered (Fig. 4C,D; black bars). Quantification of the SCL/DCL ratio showed that, in control condition, a marked increase occurred between E20 and P2, reflecting the progressive invasion of the SCL by migrating oligodendrocytes (Fig. 4E; ****p<0.0001). PAE reduced the SCL/DCL ratio at both P2 (Fig. 4E-G; *p<0.05) and P15 (sFig. 2F). Similar analysis was performed in the corpus callosum and did not showed significant effect of PAE on the density of Olig2-positive cells (sFig. 2D). Altogether, these data indicate that Olig2-positive cells progressively invade the neocortex according to regionalized and timeline ways. During the postnatal period, PAE impaired the balance of Olig2-positive cells positioned in the deep and superficial cortical layers.

3.4. PAE altered the expression of differentiation markers of the oligodendrocyte lineage in the developing cortex

According to clinical data, consumption of alcohol during pregnancy can lead to white matter impairments (Mattson et al., 2011). Because studies performed in nonhuman primates

supported stage-dependent vulnerability of oligodendrocytes to alcohol (Creeley et al., 2013), we studied, by RT-PCR and western blot, the effect of PAE on the expression of differentiation markers of the oligodendrocyte lineage at stages where oligo-vascular defects were observed (E20-P15; Fig. 5). PDGFRα was used as a marker of progenitors (OPC) and pre-oligodendrocytes (Pre-OL), CNPase as a transition marker from Pre-OL to immature oligodendrocytes, MBP as a marker of mature oligodendrocytes and Olig2 as a full lineage marker (Fig. 1C). In control condition, PDGFRα mRNA expression significantly increased from E20 to P2 and, subsequently, decreased to P15 (Fig. 5A; ****$p<0.0001$). CNPase and MBP expression progressively increased from E20 to P15 (Fig. 5B,C; ****$p<0.0001$) while a bell shape profile of mRNA Olig2 expression was observed (Fig. 5D). PAE differently impacted the expression of these markers: no effect was found concerning mRNA expression of PDGFRα and Olig2 (Fig. 5A,D; black bars), even not significant, a decrease of CNPase expression was quantified at P15 (Fig. 5B; black bars) and finally, a reduction of MBP expression was firstly detected at P2 and became significant at P15 (Fig. 5C; black bars; ##$p<0.01$). RT-PCR quantifications were systematically performed considering females and males (sFig. 3). While data were, most of the time, similar between the two sexes, one result showed sex-dependent specificity. Indeed, the inhibitory effect of PAE on MBP expression was more pronounced in females (sFig. 3E; ##$p<0.01$).

Western blot experiments revealed that PAE did not modify the expression of PDGFRα and Olig2 (Fig. 5E,F,I). CNPase protein levels were reduced by PAE at all stages E20 ($p<0.05$), P2 ($p<0.01$) and P15 (Fig. 5E,G). MBP was not detected by western blot at E20 and P2 whereas at P15, PAE induced a marked decrease of MBP protein levels (Fig. 5E,H; **$p<0.01$). As performed for RT-PCR experiments, western blot data were expressed considering females and males at E20, P2 and P15 (sFig. 4). While results were very close between both sexes, the inhibitory effect of PAE on MBP protein levels was more pronounced in females (sFig. 4J). Altogether, these data indicate that PAE differently impaired the expression of maturation markers of oligodendrocytes in the developing cortex, affecting in particular CNPase and MBP, indicators of immature and mature oligodendrocytes, respectively.

3.5. PAE inverted the distribution profiles of CNPase and MBP in the developing cortex

Whereas RT-PCR and western blot experiments provide data regarding expression levels, the use of tissue homogenates did not make possible to determine if specific cortical areas were affected. To research evidence of alcohol-induced impairments of oligodendrocyte maturation

in the developing cortex, we established the distribution profiles of CNPase and MBP immunoreactivities at P15 (Fig. 6). In control condition, linescan acquisitions showed that CNPase immunoreactivity was distributed in all cortical layers (Fig. 6A,C). Quantification of the areas under the curve (AUC) indicated that the CNPase-related signal was higher in layers V and VI (Fig. 6D; *p<0.05). Similarly, the cortical distribution of the MBP-like signal was performed at P15 (Fig. 6E-H). In control mice, the MBP-associated signal was maximal in layer VI and progressively decrease up to layer I (Fig. 6G). PAE induced a significant decrease of the MBP-integrated signal in the cortical layer VI (Fig. 6H; *p<0.05). Interestingly, the comparative analysis of CNPase and MBP profiles indicated that, in control condition, linescan curves intersected at the level of layer V (Fig. 6I). In contrast, in the PAE group, CNPase and MBP profiles never intersected (Fig. 6J). Accordingly, the MBP/CNPase ratio was significantly reduced in layer VI after PAE (Fig. 6K; **p<0.01). Altogether, these data indicate that effects of PAE quantified by RT-PCR and western blot reflected impairment of the maturation profiles of oligodendrocytes along cortical layers.

3.6. PAE impaired axonal myelination of efferent cortical axons

Axons from cortical pyramidal cells constitute efferent projections and belongs to inter-hemispheric and corticofugal pathways (Usrey and Sherman, 2019). In order to determine if the modification of the CNPase/MBP ratio evidenced at P15 in the developing cortex was associated to alteration of corticofugal pathways, we explored the effects of PAE on striatal myelinated (MBP-positive) bundles at P15 (sFig. 5A,B). Whereas PAE induced an increase of MBP-positive bundles density (sFig. 5C; *p<0.01), it induced a significant decrease of their areas (sFig. 5D; **p<0.01). Accordingly, the distribution of MBP-positive bundles showed that PAE increased the proportion of small size bundles (sFig. 5E). Surprinsingly, the effects of PAE evidenced at P15 on striatal bundles were not retrieved at P45 (adult mice; sFig. 6). Because efferent cortical fibers run through the corpus callosum, we performed electronic microscopy acquisitions at P15 to quantify the impact of PAE on myelinated axons (Fig. 7). When compared to the control condition, PAE induced a decrease of the density of myelinated axons (Fig. 7A,C,E; *p<0.05). This effect was associated with a marked reduction of the thickness of the myelin sheath (Fig. 7B,D,F; ***p<0.001). Furthermore, measurement of axonal section areas indicated that PAE increased the percentage of small size axons (Fig. 7G). Altogether, these data indicate that the decrease of MBP expression after PAE is associated with both neuronal (reduced axon density) and oligodendrocyte (reduced myelin sheath) impairments.

3.7. PAE induced neonatal sensorimotor disabilities and persistent locomotor disorders

In several human pathologies and animal models, impaired myelination is associated to motor disabilities, although not exclusively (Niu et al., 2021; Ueda et al., 2018). To investigate if PAE oligo-vascular impairments identified in the perinatal period are correlated to sensorimotor disorders, behavioural tests were conducted in PAE-exposed neonates from P2 to P8 (Fig. 8A,B; sFig. 7), at P15 (sFig. 8) and P45 (Fig. 8C-H and sFig. 9). In control neonates, the righting reflex test showed that latency to turn from the supine position to a normal prone position regularly decreased from P2 to P8 (Fig. 8A; black curve). In contrast, PAE neonates presented at P2 a tonic profile characterized by a propensity to rapidly return in prone position (Fig. 8A; ****p<0.001). However, no evolution of the latency to turn was measured until P6 (Fig. 8A; dotted curve). At P6, PAE neonates were substantially less rapid to turn than control neonates (Fig. 8A; ***p<0.01). While observed in both females and males, the effect of PAE was more pronounced in females (sFig. 7A,B). In the negative geotaxis test, no effect of PAE was quantified whatever the stage and the sex considered (Fig. 8B; sFig. 7C,D). To assess long-term motor effects of PAE, locomotor activity was analysed at P15 (sFig. 8) and P45 using an open-field (Fig. 8C-H; sFig. 9). At P15, PAE had no significant effect on the locomotor activity of both females and males measured in the entire compartment as well as in peripheral and central areas (sFig. 8). Furthermore, PAE did not impair the time spent in the central zone (sFig. 8G-I). At P45 (adult stage), PAE induced a marked reduction of the distance travelled by mice (Fig. 8C,F; red line tracking; ****p<0.001 after 30 min). A similar effect was found when central and peripheral regions were separately analysed (Fig. 8D,E). To determine if the decrease of the travelled distance resulted from a slower travel speed or to longer periods of immobility, mobility maps were analysed (Fig. 8F; false color scale). PAE induced a significant increase of the period of immobility (Fig. 8G; ****p<0.001 after 30 min). These periods of immobility were essentially observed in the peripheral part of the open field (Fig. 8H). The effects of PAE on the locomotor activity was similar between females and males (sFig. 9 A-D; *p<0.05 and ***p<0.001, respectively).

4. Discussion

The present study revealed the following highlights, *i)* as shown for cortical interneurons, oligodendrocytes invading cortical layers are associated with radial microvessels, *ii)* the vessel-association of Olig2-positive cells is found in humans and mice, *iii)* despite a vascular disorganization induced by PAE, the vessel-association of Olig2-positive cells persisted, *iv)*

PAE transiently impaired the distribution of Olig2-positive cells between deep and superficial cortical layers, *v)* the effect of PAE on the cortical positioning of Olig2-positive cells was associated with a dysregulation of the expression of differentiation markers of oligodendrocytes, *vi)* PAE induced myelination deficits associated with long term behavioural disabilities (Fig. 9).

It is well established in the literature that alcohol consumption during pregnancy can lead to neurodevelopmental disabilities (Chasnoff et al., 2015; Riley et al., 2011) and, in particular, to white matter defects (Donald et al., 2015; Lebel et al., 2011; Riley et al., 1995). Recently, several studies showed that PAE delayed maturation of oligodendrocytes (Darbinian et al., 2021). For example, it has been described that prenatal alcohol exposure is associated with delayed oligodendrocytes maturation in human fetal brain. Nevertheless, processes involved in these developmental defects are far to be understood. In the last decade, major discoveries have been made regarding modalities of tangential migration of immature oligodendrocytes (Tsai et al., 2016). Indeed, migrating OPC generated in ganglionic eminences reach the developing corpus callosum using periventricular tangential microvessels as guides (Tsai et al., 2016). In addition, numerous oligodendrocytes also invade and populate the cortical layers although their migration modalities remain unclear (Choe et al., 2014). We recently evidenced in both human and animal models that PAE disorganised the radial organization of cortical microvessels (Jégou et al., 2012; Lecuyer et al., 2017; Li et al., 2021). Regarding our recent data and those from Tsai and co-workers, it was tempting to speculate a vascular link in the deleterious effects of PAE on oligodendrocyte differentiation.

4.1. Radial microvessels support cortical oligodendrocytes

During brain development, immature GABAergic interneurons and oligodendrocytes share similarities starting with their migration (Luhmann et al., 2015; Paredes et al., 2018; Segara et al., 2019). Contrasting to the large majority of cortical glutamatergic neurons, most cortical GABAergic interneurons are generated in ganglionic eminences and reach the neocortex using a vessel-associated tangential migration mode (Luhmann et al., 2015; Won et al., 2013). In particular, migrating interneurons arriving tangentially from the pial migratory route use radial microvessels in an outside-in direction to populate superficial cortical layers (Léger et al., 2020a). At a mechanistic level, the endothelial NMDA receptor has been shown to contribute in the control of this migration process by activating the MMP9 activity (Léger et al., 2020a). Similarly, cortical oligodendrocytes are generated in ganglionic eminences (Kessaris et al.,

2006) and, as demonstrated by Tsai and co-workers, they use periventricular microvessels to reach tangentially the corpus callosum and, subsequently, cortical layers (Tsai et al., 2016). At a mechanistic level, it has been reported a strong communication between endothelial cells and oligodendrocytes including activation of the Wnt pathway (Tsai et al., 2016; Yuen et al., 2014). For example, a reduction of Wnt activity induced an altered angiogenic response resulting in white matter defects (Chavali et al., 2020). In the present study, a 3D-modelisation approach performed on cortices from human fetuses and mouse neonates, evidenced that up to 15% and 40% of Olig2-positive cells were respectively associated with radial microvessels. Although additional experiments such as timelaps studies would be interesting, these data suggest that, as recently shown for GABAergic interneurons, radial cortical microvessels constitute a migration support for immature oligodendrocytes entering the neocortex.

4.2. Effects of prenatal alcohol exposure on cortical vasculature and vessel-associated oligodendrocytes

In human, consumption of alcohol by pregnant women is frequently associated with a poly-intoxication behaviour associating alcohol, tobacco, cannabis…. (Forray et al., 2016). In order to clarify the effects of alcohol exposure on brain vasculature and Olig2-vessel association, we used a TCAF-like mono-intoxication preclinical model previously characterized (Jégou et al., 2012 ; Lecuyer et al., 2017; Léger et al., 2020b). In particular alcohol exposure during the last days of mouse gestation (GD15 to birth) has been shown to induce cortical vascular impairments without the characteristic facial dysmorphisms described in FAS models (Petrelli *et al*, 2018). Surprisingly, a time-course study of the cortical vascular development at three developmental stages (E20, P2 and P15) revealed that PAE impaired the cortical vasculature at E20 and P2 but that this effect was not retrieved at P15 anymore. A possible interpretation of these data would be that the absence of alcohol exposure from P2 to P15, at a period where cortical angiogenesis is still going on (Harb et al., 2013), attempted vascular impairments. In order to test this hypothesis, it would be interesting to investigate if an early postnatal alcohol exposure (from P3 to P15), corresponding to third trimester of pregnancy in humans, could durably impair cortical microvasculature (Kelly et al., 1990; Xu et al., 2018).

Several studies from the literature established that *in utero* alcohol-exposure impaired the survival and the positioning of different cell types such as interneurons (Léger et al., 2020b) and oligodendrocytes (Creeley et al., 2013). However, considering that migration of these two cell types is vessel-associated (Dejana and Betsholtz, 2016; Tsai et al., 2016), we explored if

PAE could impair the vessel-association of oligodendrocytes. Data revealed that, whatever the stage considered from E20 to P15 and despite vascular disorganization, *in utero* alcohol exposure did not modify the proportion of Olig2-positive cells associated to cortical microvessels. Altogether, these results suggest that *i)* the recruitment process of oligodendrocytes with microvessels is not affected by alcohol and *ii)* if oligodendrocyte are still vessel-associated and the microvascular network disorganized, then the positioning of Olig2-positive cells could be impaired.

4.3. PAE induced a transient oligodendrocyte mispositioning on cortical layers

During brain development, vascular network is established before OPC emergence (Daneman et al., 2009). Therefore, alcohol-induced vascular defects could lead to a wrong migratory route for nervous cells. Consistent with this hypothesis, it has been recently shown in human and mouse models that PAE induces a mispositioning of GABAergic interneurons (Léger et al., 2020b; Marguet et al., 2020). Using preclinical models, it was shown that alcohol, in addition to disorganizing microvessels, impaired the activity of endothelial cells such as glutamate-induced calcium mobilization and *in situ* activation of endothelial metalloproteinases (MMP9; Léger et al., 2020a). These effects were, at least in part, mimicked by invalidation of the endothelial NMDA receptor (Léger et al., 2020b). In line with these data, our experiments showed an imbalance of Olig2-positive cells in the developing cortex at birth (P2). After PAE, a greater proportion of oligodendrocytes was found in deep cortical layers than in superficial cortical layers. Again, as found for microvasculature, this effect was significant at P2 and, even if still observed, attenuated at P15. Altogether these data suggest that, in our model of PAE, ethanol delayed the positioning of oligodendrocytes entering cortical layers.

4.4. PAE impaired the differentiation profile of cortical oligodendrocytes

In order to determine whether effects of PAE on the cortical distribution of oligodendrocytes were associated to differentiation defects, we explored the expression and distribution of PDGFRα, CNPase and MBP which are representative of different maturation stages of the lineage (Baraterio et al., 2016). Western blot analyses revealed that PAE markedly reduced the expression of CNPase, a myelin-associated enzyme, and MBP, a major constituent of the myelin sheath (Baraterio et al., 2016). Again, these effects were stage dependent i.e. CNPase reduction was maximum at P2 while the effect of PAE on MBP was firstly found at P15 and vanished at adulthood. As suggested by transient vascular impairments and transient Olig2 positionning, these data support a delay of the late differentiation of oligodendrocytes. In

agreement with these results, Cantacorps et al. (2017) also found a reduction of several myelin markers after prenatal and early neonatal alcohol exposure in mice. In the same way, late exposition to alcohol, in a binge drinking model, also reduced myelin marker expression (Rice et al., 2019) indicating a high sensitivity of oligodendrocytes to ethanol whatever the alcohol exposure protocol. Regarding clinical research, a recent study described an increase of progenitor markers and a decrease of mature oligodendrocyte markers (Darbinian et al., 2021) in the brain of fetuses prenatally exposed to alcohol. Even if performed from microdissected extracts, RT-PCR and western blot experiments do not inform on the cortical maturation profile of oligodendrocytes. Focusing on immature (CNPase-positive) and mature (MBP-positive) oligodendrocytes, scanline analysis were performed in the developing cortex at P15 and showed that the highest level of intensity profiles corresponding to mature oligodendrocytes was found in cortical layers V and VI (Tan et al., 2009). PAE reversed the CNPase and MBP intensity profiles, especially in layer VI supporting that effects of alcohol on CNPase and MBP expression affected cell populations present in layer VI. Altogether, these data indicate that the mispositioning of Olig2-positive cells observed in deep cortical layers after PAE is associated with an immature-like oligodendrocyte profile.

4.5. PAE induced transient white matter damages but long-term locomotor impairments

Axon myelination is required for a correct nerve impulse conduction, neuronal integrity and metabolic support (Fields and Dutta, 2019; Philips and Rothstein, 2017). In humans, it has long been established that *in utero* alcohol exposure alters corpus callosum formation leading to global white matter reduction (Sowell et al.; 2002) and, for the more severe cases, to callosal agenesis (Lebel et al., 2011; Riley et al., 1995). The present data revealed that at P15, PAE induced a significant reduction of *i)* MBP expression in cortical layers, *ii)* a reduction of myelin sheath and axonal sections in the corpus callosum and *iii)* a disorganization of myelinated bundles in the striatum, a corticofugal target. Again, as found for microvasculature disorganization, and expression of differentiation markers, these effects significantly observed at P15 were attenuated in adult mice supporting a recovery process. Interestingly, a recent study showed a very similar disorganization of axonal fibres in the rat corpus callosum after alcohol exposure (Newville et al., 2022). However, two main differences emerged between the two studies: first, contrasting with our data, in the study from Newville and co-workers the myelination impairments persisted in adult rats and, second, authors used a postnatal (P3-P15) window of exposure rather than a prenatal (E15-Birth) as we did. Altogether, these data suggest that the later occurred the exposure, lesser would be the recovery.

In human, FAS corresponds the more severe expression of FASD and it is characterized by morphological abnormalities such as facial dimorphism (Riley et al., 2011), neurodevelopmental impairments such as reduction of the corpus callosum volume (Darbinian et al., 2022) and behavioural troubles (De Avila et al., 2020; Kleiber et al., 2011). By using fine morphometric and imagery tools, several research groups tried to correlate dismorphism and/or neurodevelopmental defects with behavioural disorders in order to improve diagnosis (Biffen et al., 2018; Fan et al., 2016). However, the early diagnosis of FASD remains challenging and numerous infants are still undiagnosed until school age (Chasnoff et al., 2015). Interestingly, the present data showed, using a FASD model of prenatal alcohol exposure, that neonates which presented marked perinatal oligovascular impairments subsequently developed long term behavioural deficits (reduced locomotor activity; Cantacorps et al., 2017).

In conclusion, it is now well established that prenatal alcohol exposure represents a main cause of neurobehavioral troubles. Numerous studies have focused on nerve cells, ignoring the recently evidenced neurovascular dysfunction. On one hand, it is now demonstrated that cortical microvessels are altered by PAE both in humans and mice. On another hand, oligodendrocytes require microvessels to reach the neocortex from ganglionic eminences. Using an *in utero* exposure model of FASD, the present study provides the first evidence that, PAE induced a transient disorganization of the cortical microvasculature whereas the vessel-association of immature oligodendrocytes was preserved. Concomitantly, a mispositioning and a delayed differentiation profile of oligodendrocytes were observed in cortical layers. Whereas most of these morphometric and developmental parameters were transient and observed in the two first postnatal weeks, offspring will develop long-term motor behavioural deficits. Altogether, these data support that alcohol-induced vascular defects recently described in human neonates may provide new research avenues for the early diagnosis of FASD infants. Supplementary figures to this article can be found online.

Support

This work was supported by Normandy University (UMR1245), Rouen University, Institut National de la Santé et Recherche Médicale (INSERM, UMR1245 ; UMR-S U1237), Rouen University Hospital, Fondation de France, Blood & Brain Institute, ANR AlcoBrain. MB was a recipient of a fellowship from the French Research Ministry of Research and Higher Education.

Declaration of Competing Interest

None.

References

Barateiro A, Brites D, Fernandes A, 2016. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. Curr Pharm Des. 22, 656-79.

Biffen SC, Warton CMR, Lindinger NM, Randall SR, Lewis CE, Molteno CD, Jacobson JL, Jacobson SW, Meintjes EM., 2018. Reductions in Corpus Callosum Volume Partially Mediate Effects of Prenatal Alcohol Exposure on IQ. Front Neuroanat. 11, 132.

Cantacorps 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.

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

Chavali M, Ulloa-Navas MJ, Pérez-Borredá P, Garcia-Verdugo JM, McQuillen PS, Huang EJ, Rowitch DH., 2020. Wnt-Dependent Oligodendroglial-Endothelial Interactions Regulate White Matter Vascularization and Attenuate Injury. Neuron. 108, 1130-1145.e5.

Choe Y, Huynh T, Pleasure SJ., 2014. Migration of oligodendrocyte progenitor cells is controlled by transforming growth factor β family proteins during corticogenesis. J Neurosci. 34, 14973-83.

Creeley CE, Dikranian KT, Johnson SA, Farber NB, Olney JW., 2013. Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain. Acta Neuropathol Commun. 1, 23.

Daher I, Le Dieu-Lugon B, Dourmap N, Lecuyer M, Ramet L, Gomila C, Ausseil J, Marret S, Leroux P, Roy V, El Mestikawy S, Daumas S, Gonzalez B, Leroux-Nicollet I, Cleren C., 2017. Magnesium Sulfate Prevents Neurochemical and Long-Term Behavioral Consequences of Neonatal Excitotoxic Lesions: Comparison Between Male and Female Mice. J Neuropathol Exp Neurol. 76, 883-897.

Dalitz P, Cock M, Harding R, Rees S., 2008. Injurious effects of acute ethanol exposure during late gestation on developing white matter in fetal sheep. Int J Dev Neurosci. 26, 391-9.

Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, Barres BA., 2009. Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 106:641-6. Erratum in: Proc Natl Acad Sci USA. 2009. 106, 6422.

Darbinian N, Darbinyan A, Merabova N, Bajwa A, Tatevosian G, Martirosyan D, Zhao H, Selzer ME, Goetzl L., 2021. Ethanol-mediated alterations in oligodendrocyte differentiation in the developing brain. Neurobiol Dis. 148, 105181.

Darbinian N, Selzer ME., 2022. Oligodendrocyte pathology in fetal alcohol spectrum disorders. Neural Regen Res. 17, 497-502.

De Ávila MAP, Gonçalves RM, Nascimento ECC, Cabral LDM, Vilela FC, Giusti-Paiva A., 2020. Prenatal exposure to alcohol impairs social play behavior in adolescent male mice. Neurotoxicology. 79, 142-149.

Dejana E, Betsholtz C., 2016. NEURODEVELOPMENT. Oligodendrocytes follow blood vessel trails in the brain. Science. 351, 341-2.

Donald KA, Eastman E, Howells FM, Adnams C, Riley EP, Woods RP, Narr KL, Stein DJ., 2015. Neuroimaging effects of prenatal alcohol exposure on the developing human brain: a magnetic resonance imaging review. Acta Neuropsychiatr. 27, 251-69.

Fan J, Jacobson SW, Taylor PA, Molteno CD, Dodge NC, Stanton ME, Jacobson JL, Meintjes EM., 2016. White matter deficits mediate effects of prenatal alcohol exposure on cognitive development in childhood. Hum Brain Mapp. 37, 2943-58.

Fields RD, Dutta DJ., 2019. Treadmilling Model for Plasticity of the Myelin Sheath. Trends Neurosci. 42, 443-447.

Forray A., 2016. Substance use during pregnancy. F1000Res. 5:F1000 Faculty Rev-887.

Harb R, Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J., 2013. In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. J Cereb Blood Flow Metab. 33, 146-56.

Jäkel S, Dimou L., 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. Front Cell Neurosci. 11, 24.

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, 952-60.

Kelly SJ, Mahoney JC, West JR., 1990. Changes in brain microvasculature resulting from early postnatal alcohol exposure. Alcohol. 7, 43-7.

Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. Nat Neurosci. 9, 173-9.

Kleiber ML, Wright E, Singh SM., 2011. Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. Behav Brain Res. 223, 376-87.

Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J, Burd L, Popova S., 2017. Global Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorder Among Children and Youth: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Pediatr. 171, 948-956.

Lebel C, Roussotte F, Sowell ER., 2011. Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. Neuropsychol Rev. 21, 102-18.

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, 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 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, 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. 145, 105074.

Li J, Li C, Loreno EG, Miriyala S, Panchatcharam M, Lu X, Sun H., 2021. Chronic Low-Dose Alcohol Consumption Promotes Cerebral Angiogenesis in Mice. Front Cardiovasc Med. 8, 681627.

Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W., 2015. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. Front Cell Neurosci. 9, 4.

Marguet F, Friocourt G, Brosolo M, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A., 2020. Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans. Acta Neuropathol Commun. 8, 208.

Marinelli C, Bertalot T, Zusso M, Skaper SD, Giusti P., 2016. Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage. Front Cell Neurosci. 10, 27.

Mattson SN, Crocker N, Nguyen TT., 2011. Fetal alcohol spectrum disorders: neuropsychological and behavioral features. Neuropsychol Rev. 21, 81-101.

Miyamoto N, Pham LD, Seo JH, Kim KW, Lo EH, Arai K., 2014. Crosstalk between cerebral endothelium and oligodendrocyte. Cell Mol Life Sci. 71, 1055-66.

Newville J, Howard TA, Chavez GJ, Valenzuela CF, Cunningham LA., 2022. Persistent myelin abnormalities in a third trimester-equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. Alcohol Clin Exp Res. 46, 77-86.

Newville J, Valenzuela CF, Li L, Jantzie LL, Cunningham LA., 2017. Acute oligodendrocyte loss with persistent white matter injury in a third trimester equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. Glia. 65, 1317-1332.

Niu J, Yu G, Wang X, Xia W, Wang Y, Hoi KK, Mei F, Xiao L, Chan JR, Fancy SPJ., 2021. Oligodendroglial ring finger protein Rnf43 is an essential injury-specific regulator of oligodendrocyte maturation. Neuron. 109, 3104-3118.e6.

Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodóvar C., 2018. Neurovascular Communication during CNS Development. Dev Cell. 45, 10-32.

Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG., 2018. Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. Biochem Cell Biol. 96, 131-147.

Philips T, Rothstein JD., 2017. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. J Clin Invest. 127, 3271-3280.

Popova S, Lange S, Shield K, Burd L, Rehm J., 2019. Prevalence of fetal alcohol spectrum disorder among special subpopulations: a systematic review and meta-analysis. Addiction. 114, 1150-1172.

Radek KA, Kovacs EJ, Gallo RL, DiPietro LA., 2008. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295, H174-84.

Radek KA, Matthies AM, Burns AL, Heinrich SA, Kovacs EJ, Dipietro LA., 2005. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 289, H1084-90.

Rice J, Gu C., 2019. Function and Mechanism of Myelin Regulation in Alcohol Abuse and Alcoholism. Bioessays. 41, e1800255.

Riley EP, Infante MA, Warren KR., 2011. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. Neuropsychol Rev. 21:73-80.

Riley EP, Mattson SN, Sowell ER, Jernigan TL, Sobel DF, Jones KL., 1995. Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. Alcohol Clin Exp Res. 19, 1198-202.

Roux C, Lesueur C, Aligny C, Brasse-Lagnel C, Genty D, Marret S, Laquerrière A, Bekri S, Gonzalez BJ., 2014. 3-MA inhibits autophagy and favors long-term integration of grafted Gad67-GFP GABAergic precursors in the developing neocortex by preventing apoptosis. Cell Transplant. 23, 1425-50.

Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, Acker-Palmer A., 2019. Neurovascular Interactions in the Nervous System. Annu Rev Cell Dev Biol. 35, 615-635.

Sowell ER, Thompson PM, Mattson SN, Tessner KD, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW., 2002. Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. Cereb Cortex. 12, 856-65.

Sulik KK., 2014. Fetal alcohol spectrum disorder: pathogenesis and mechanisms. Handb Clin Neurol. 125, 463-75.

Syed F, John PJ, Soni I., 2016. Neurodevelopmental consequences of gestational and lactational exposure to pyrethroids in rats. Environ Toxicol. 31, 1761-1770.

Tan SS, Kalloniatis M, Truong HT, Binder MD, Cate HS, Kilpatrick TJ, Hammond VE., 2009. Oligodendrocyte positioning in cerebral cortex is independent of projection neuron layering. Glia. 57, 1024-30.

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, 379-84.

Ueda Y, Misumi S, Suzuki M, Ogawa S, Nishigaki R, Ishida A, Jung CG, Hida H., 2018. Disorganization of Oligodendrocyte Development in the Layer II/III of the Sensorimotor

Cortex Causes Motor Coordination Dysfunction in a Model of White Matter Injury in Neonatal Rats. Neurochem Res. 43, 136-146.

Usrey WM, Sherman SM., 2019. Corticofugal circuits: Communication lines from the cortex to the rest of the brain. J Comp Neurol. 527, 640-650.

Volpe JJ., 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol. 8, 110-24.

Williams JK, Baptista PM, Daunais JB, Szeliga KT, Friedman DP, Soker S., 2008. The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. Alcohol Clin Exp Res. 32, 155-61.

Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhal A, Szabó G, Vasudevan A., 2013. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. Nat Commun. 4, 2149.

Wozniak JR, Muetzel RL, Mueller BA, McGee CL, Freerks MA, Ward EE, Nelson ML, Chang PN, Lim KO., 2009. Microstructural corpus callosum anomalies in children with prenatal alcohol exposure: an extension of previous diffusion tensor imaging findings. Alcohol Clin Exp Res. 33, 1825-35.

Xu W, Hawkey AB, Li H, Dai L, Brim HH, Frank JA, Luo J, Barron S, Chen G., 2018. Neonatal Ethanol Exposure Causes Behavioral Deficits in Young Mice. Alcohol Clin Exp Res. 42, 743-750.

Yuen TJ, Silbereis JC, Griveau A, Chang SM, Daneman R, Fancy SPJ, Zahed H, Maltepe E, Rowitch DH., 2014. Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. Cell. 158, 383-396.

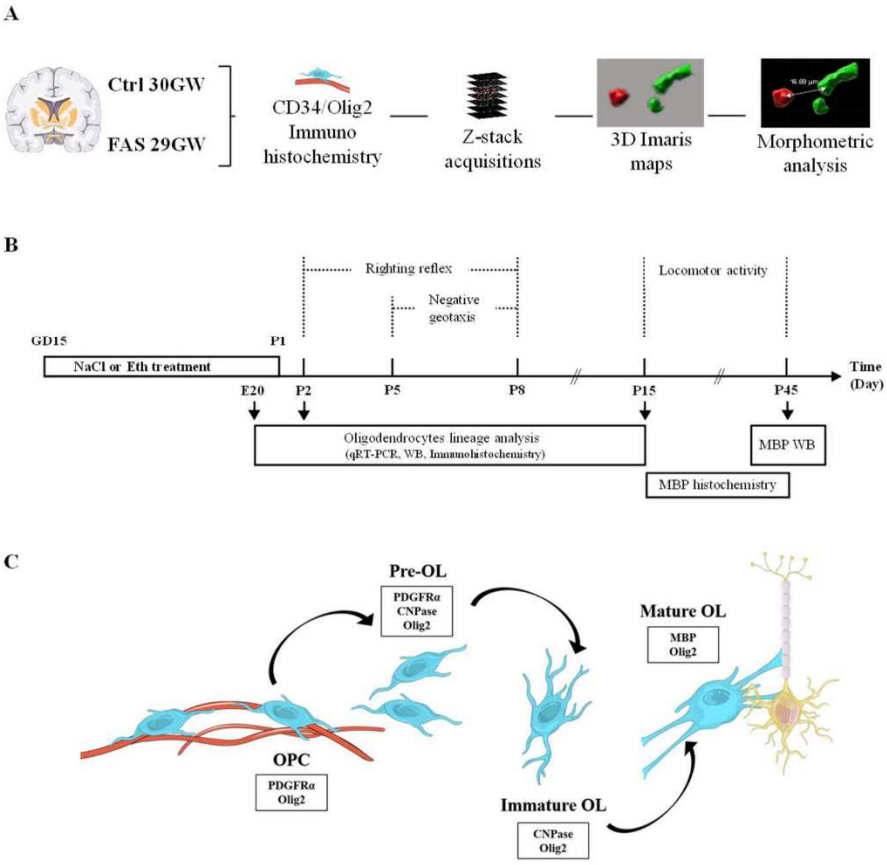


Figure 1, Brosolo et al.

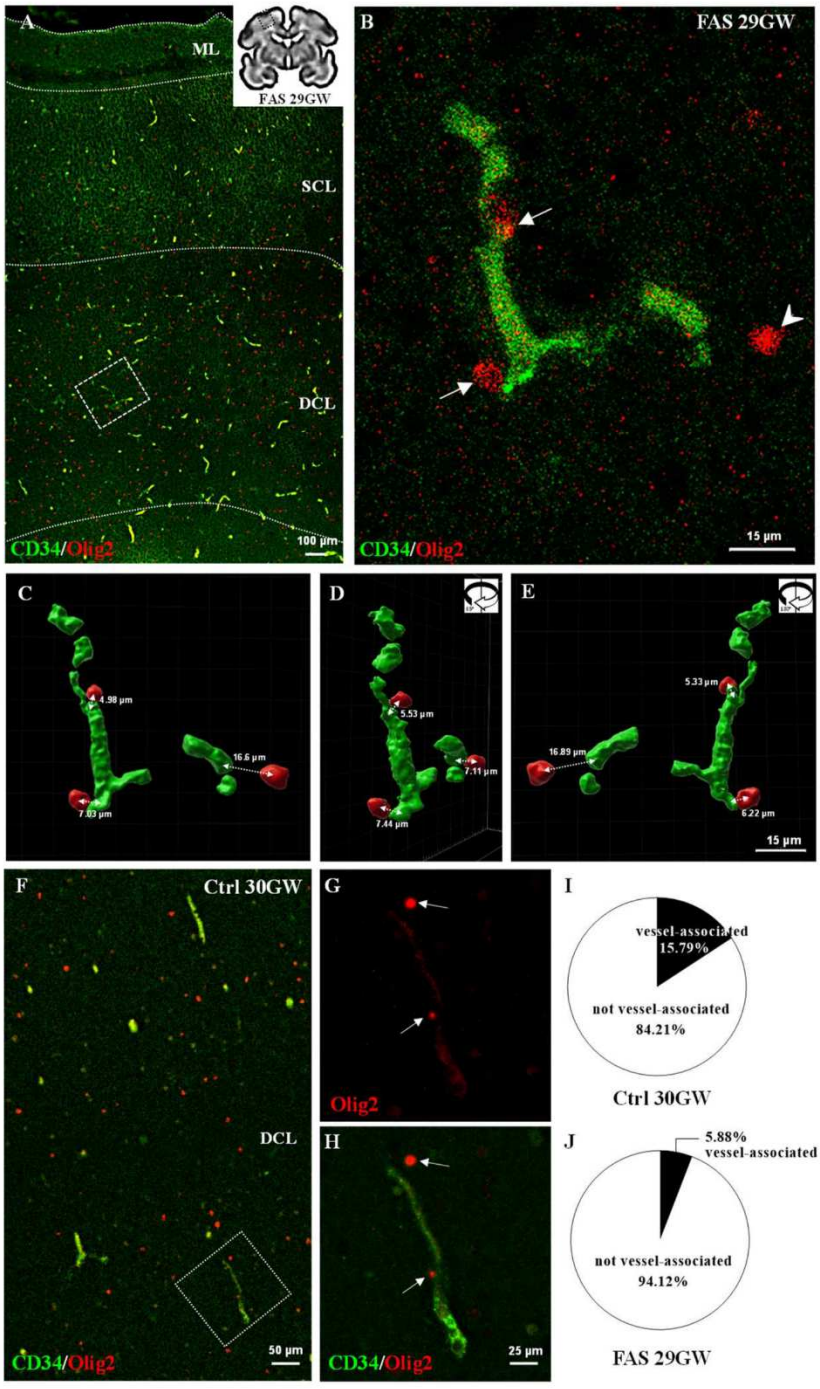


Figure 2, Brosolo et al.

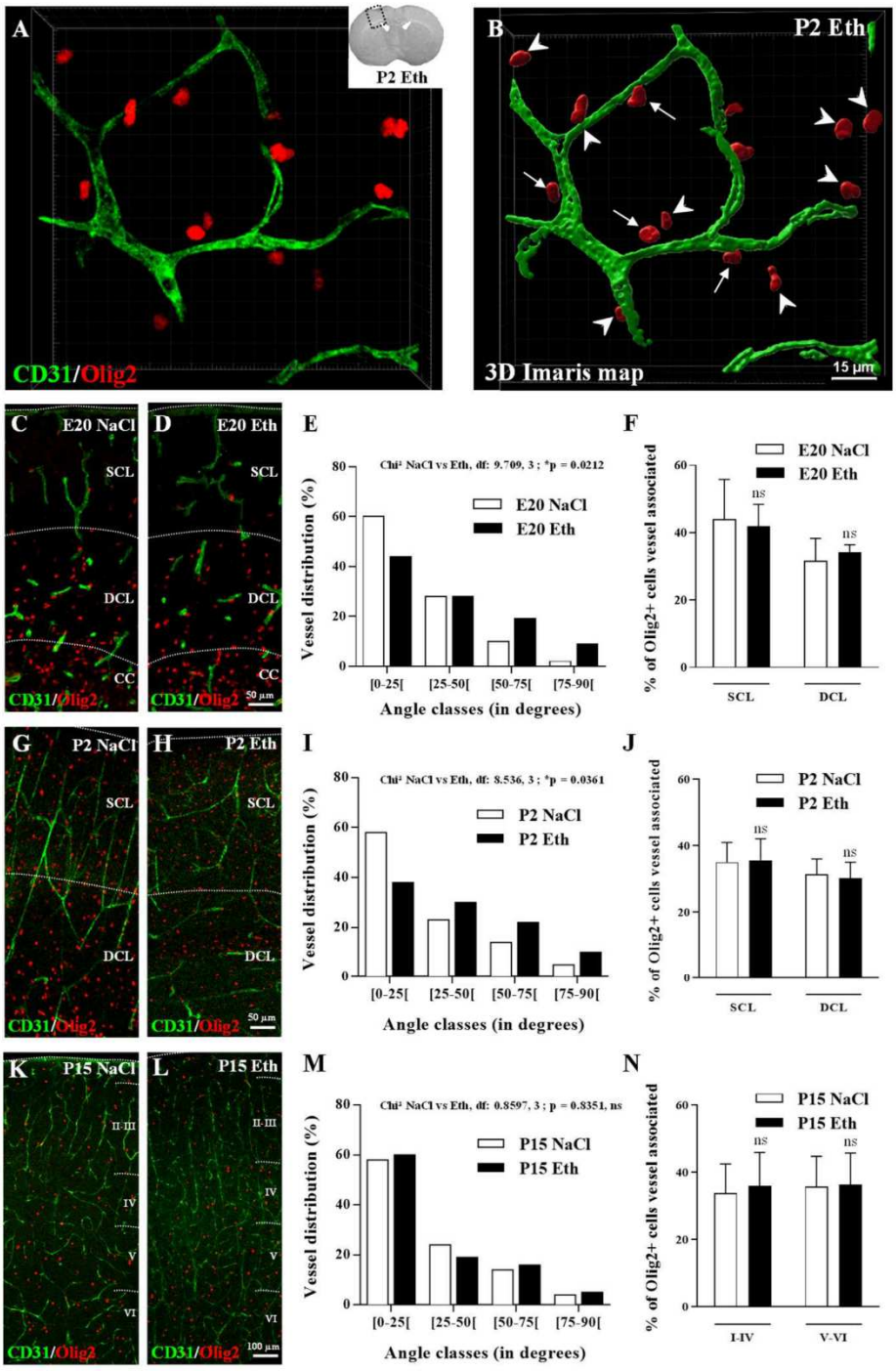


Figure 3, Brosolo et al.

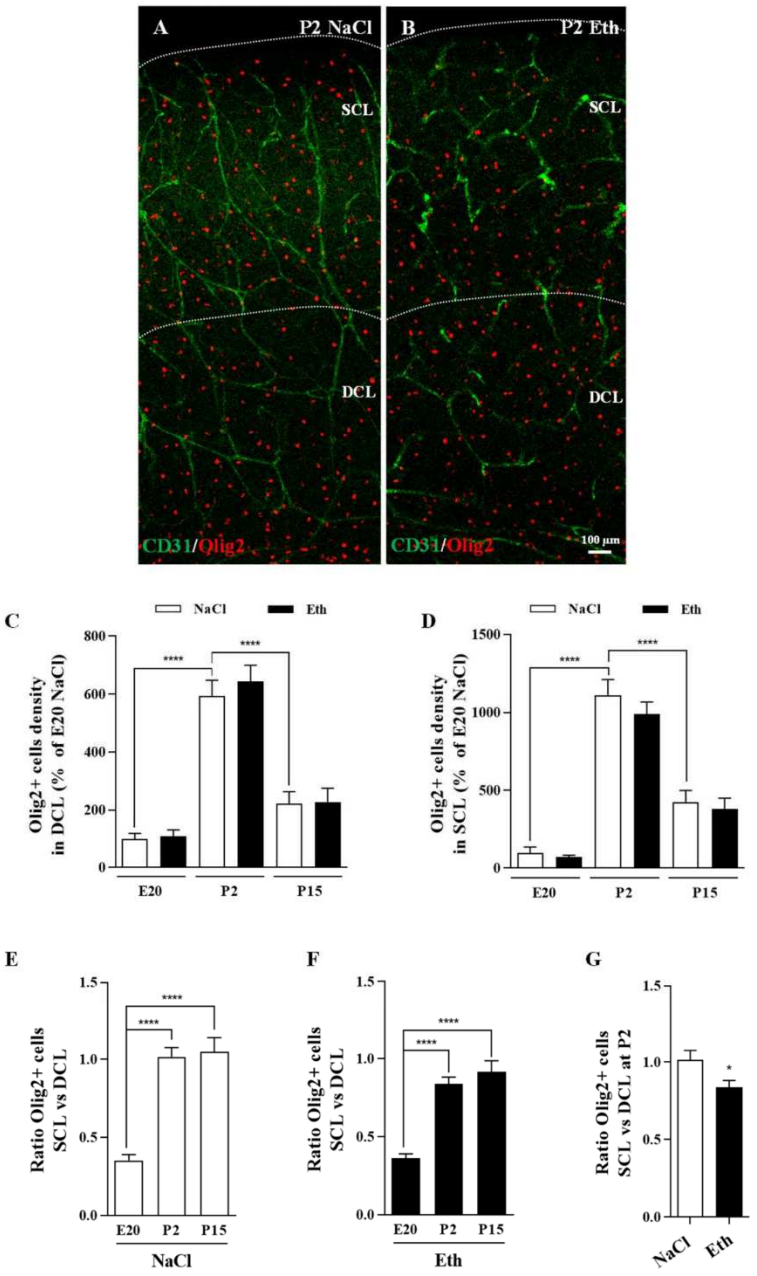


Figure 4, Brosolo et al.

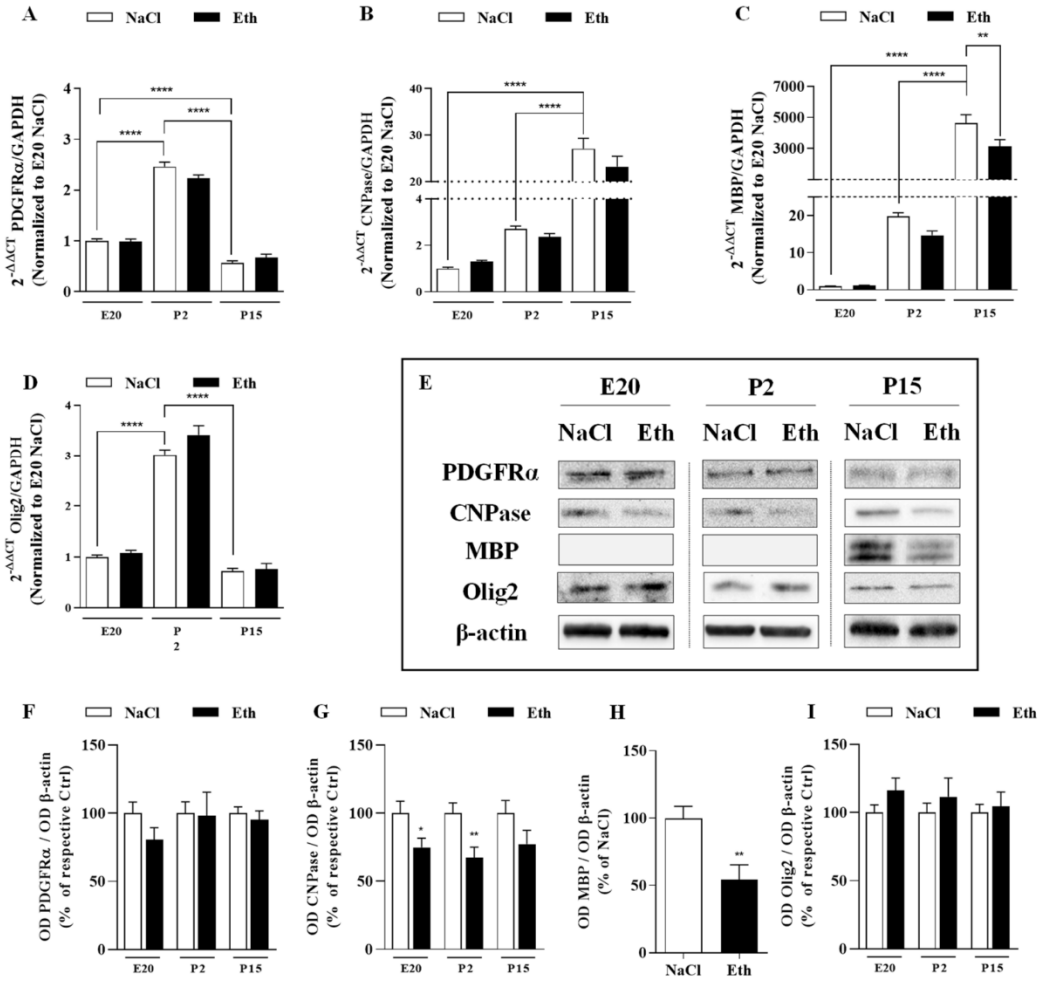


Figure 5, Brosolo et al.

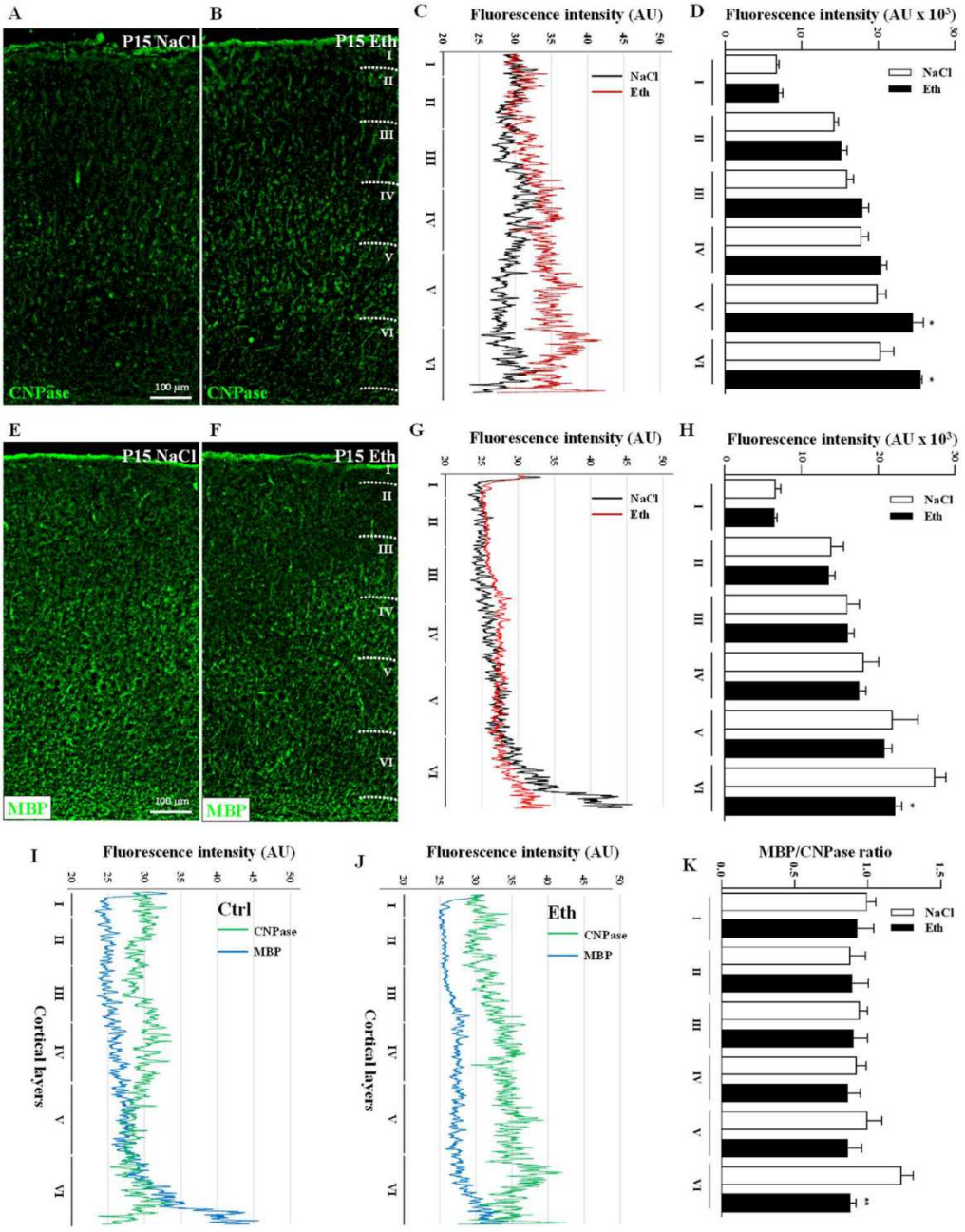


Figure 6, Brosolo et al.

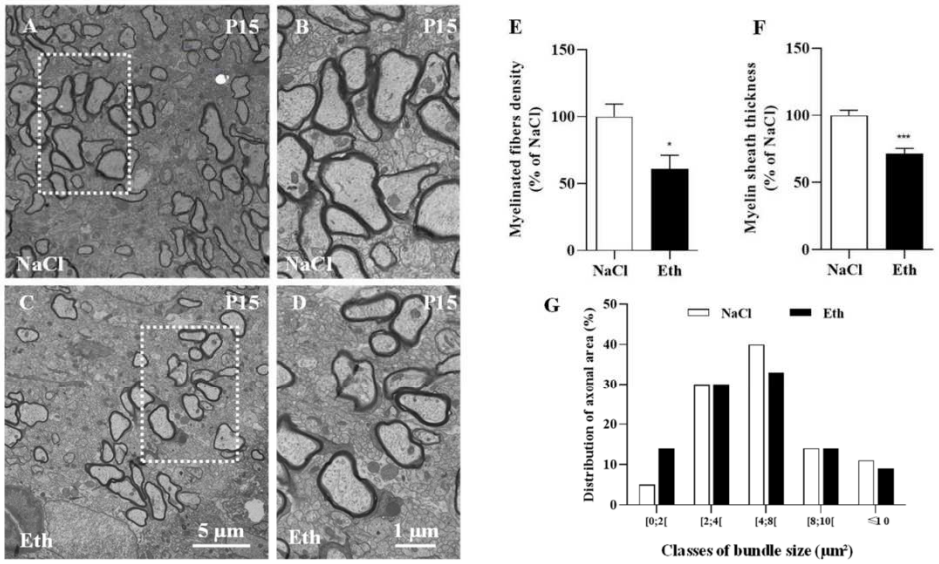


Figure 7, Brosolo et al.

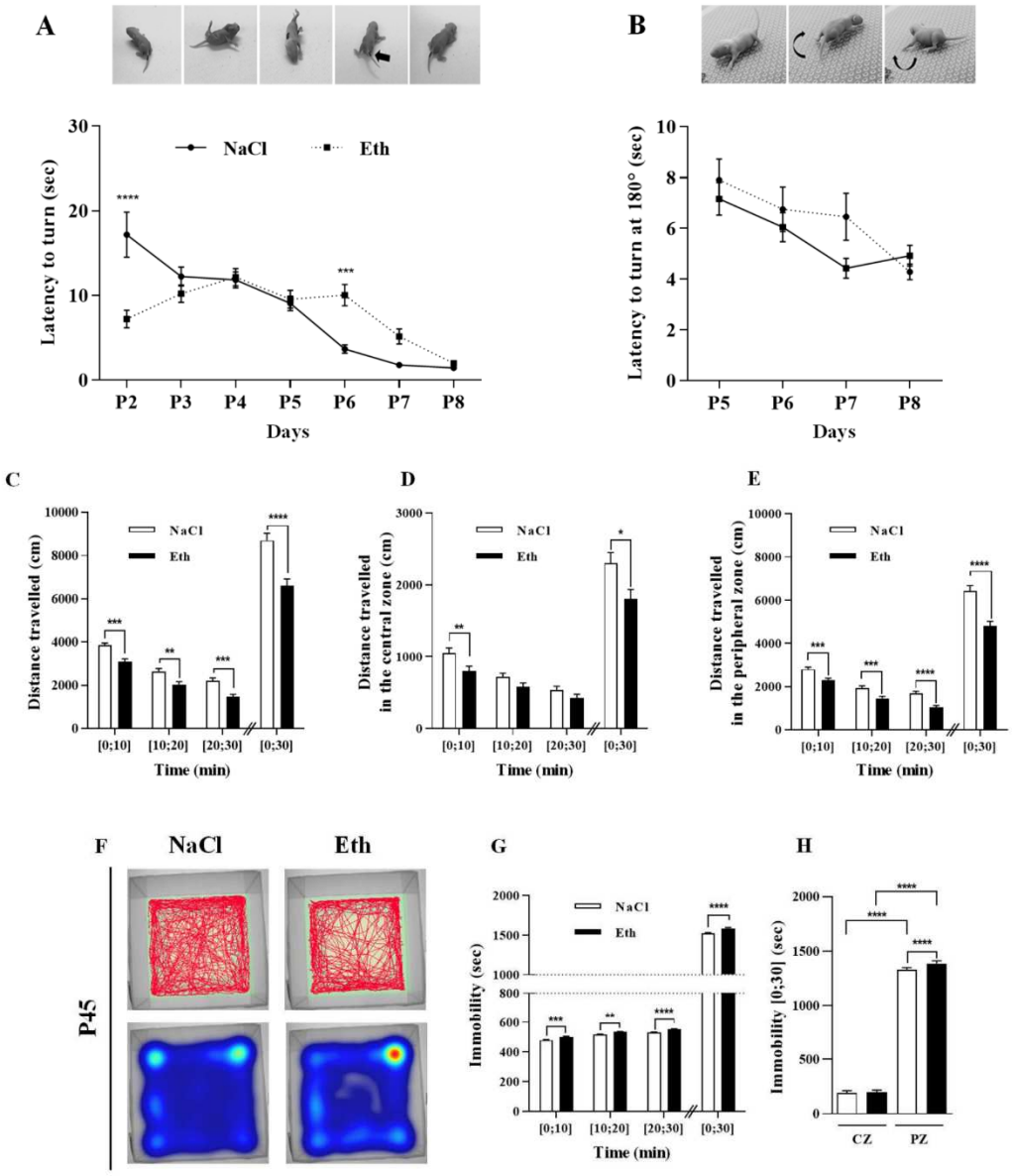


Figure 8, Brosolo et al.

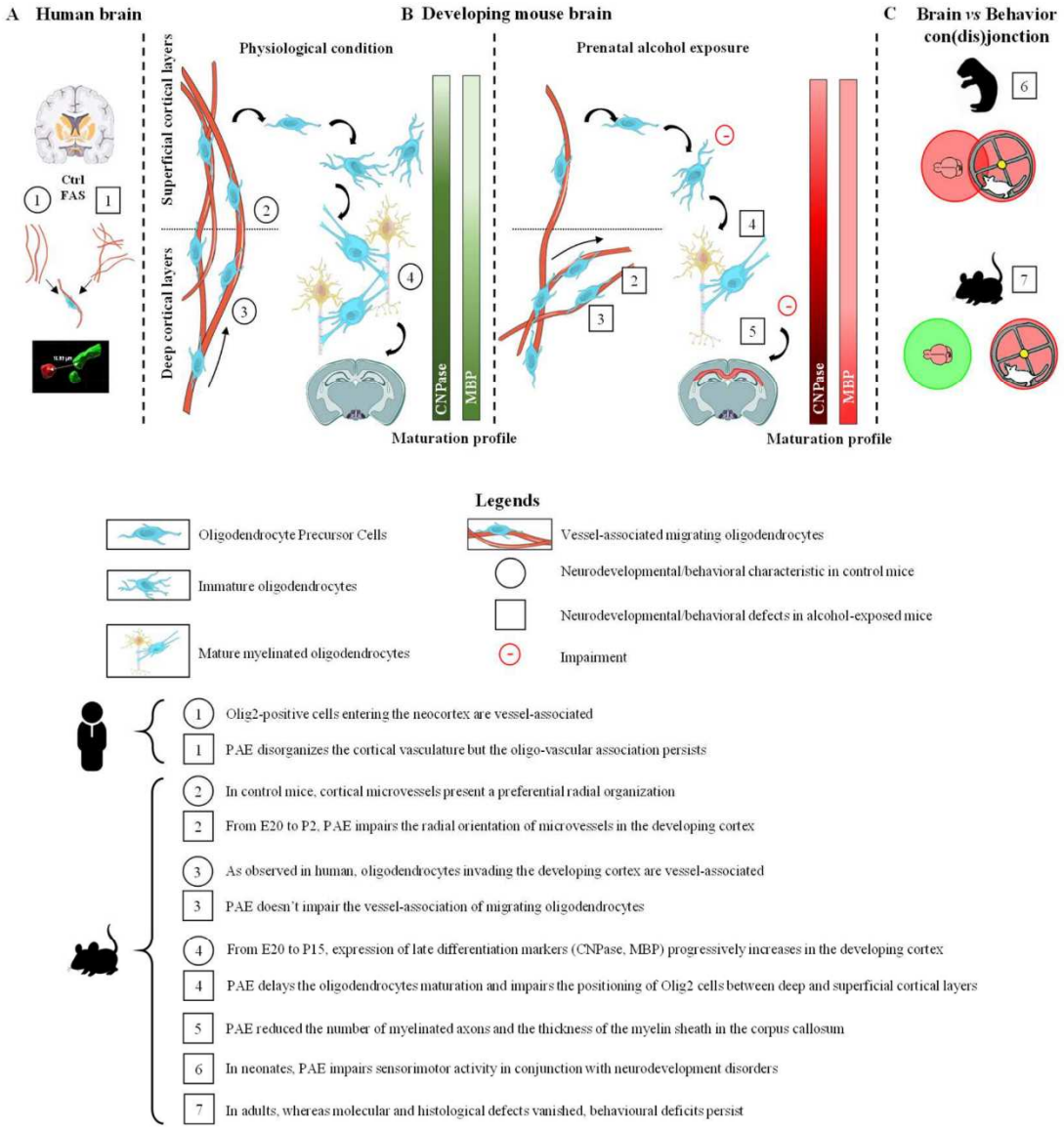
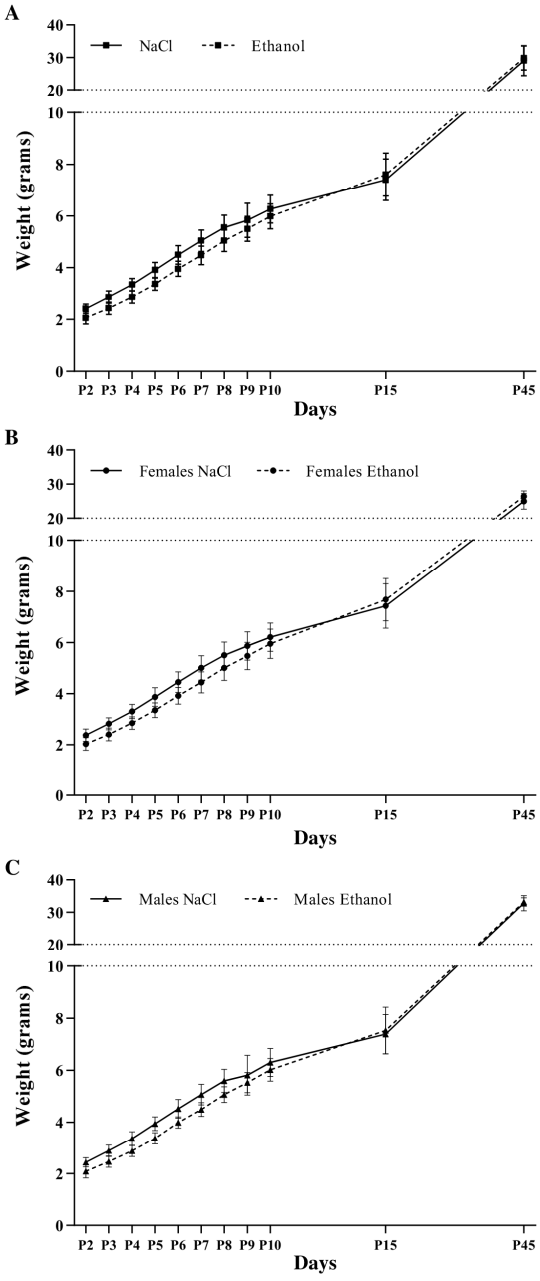
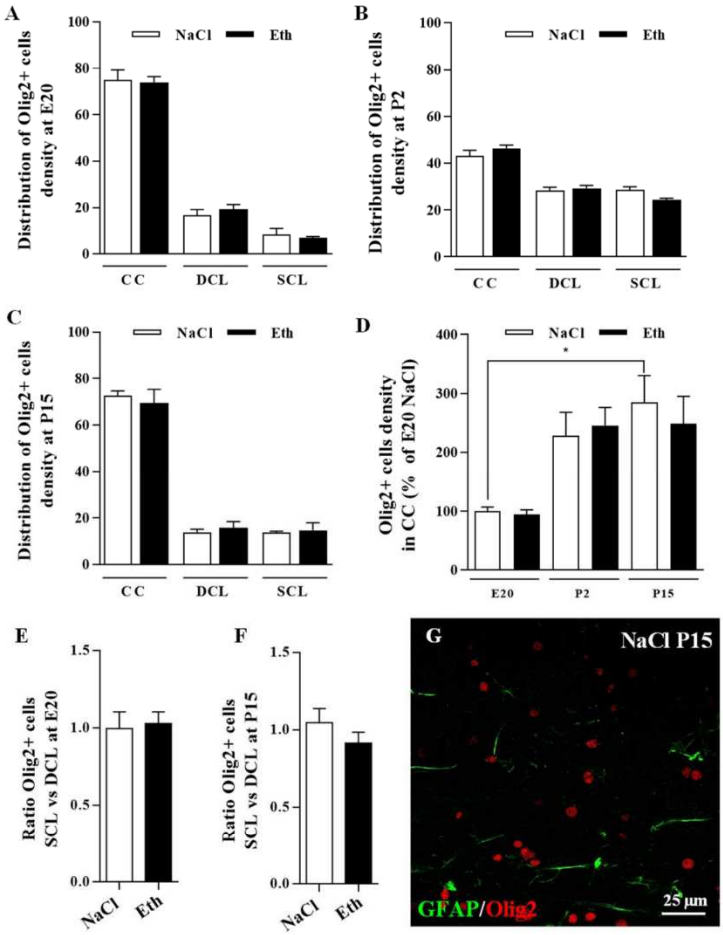


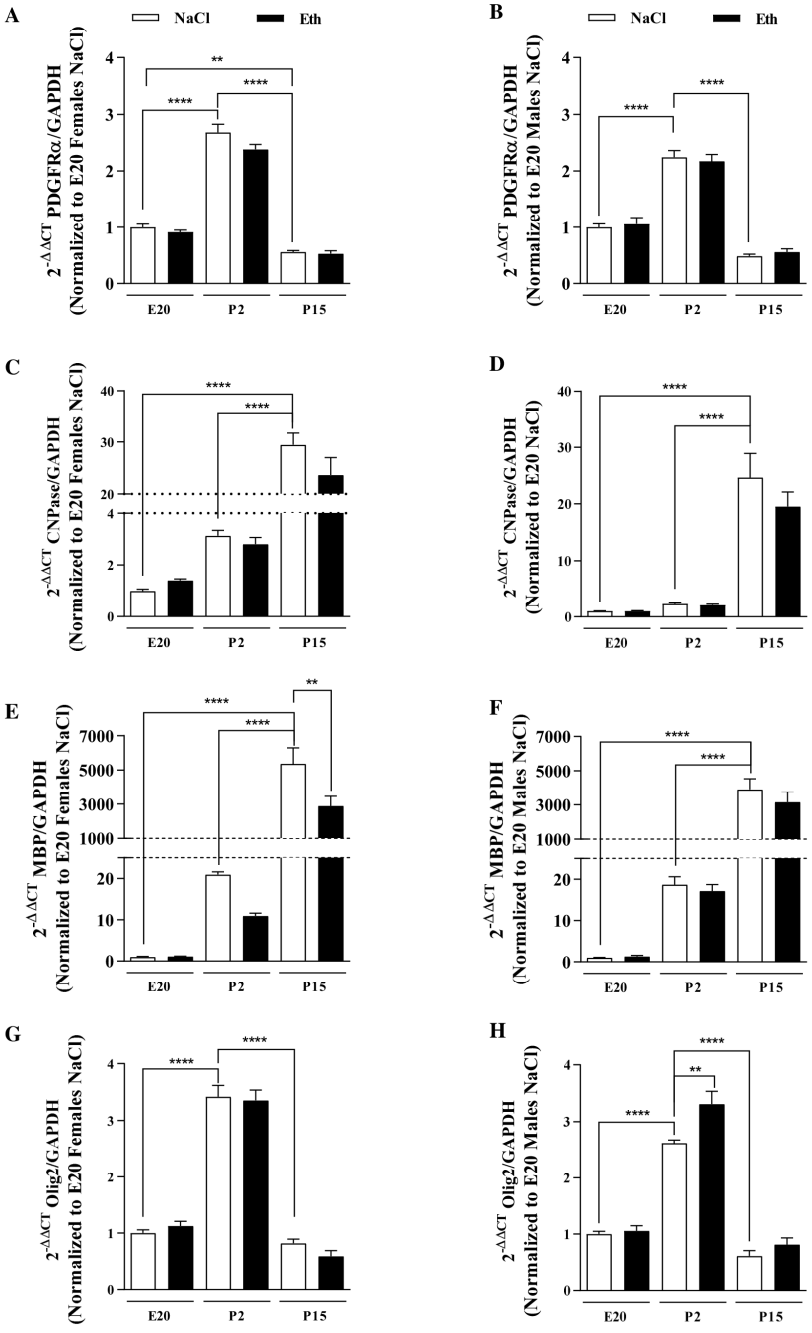
Figure 9, Brosolo et al.



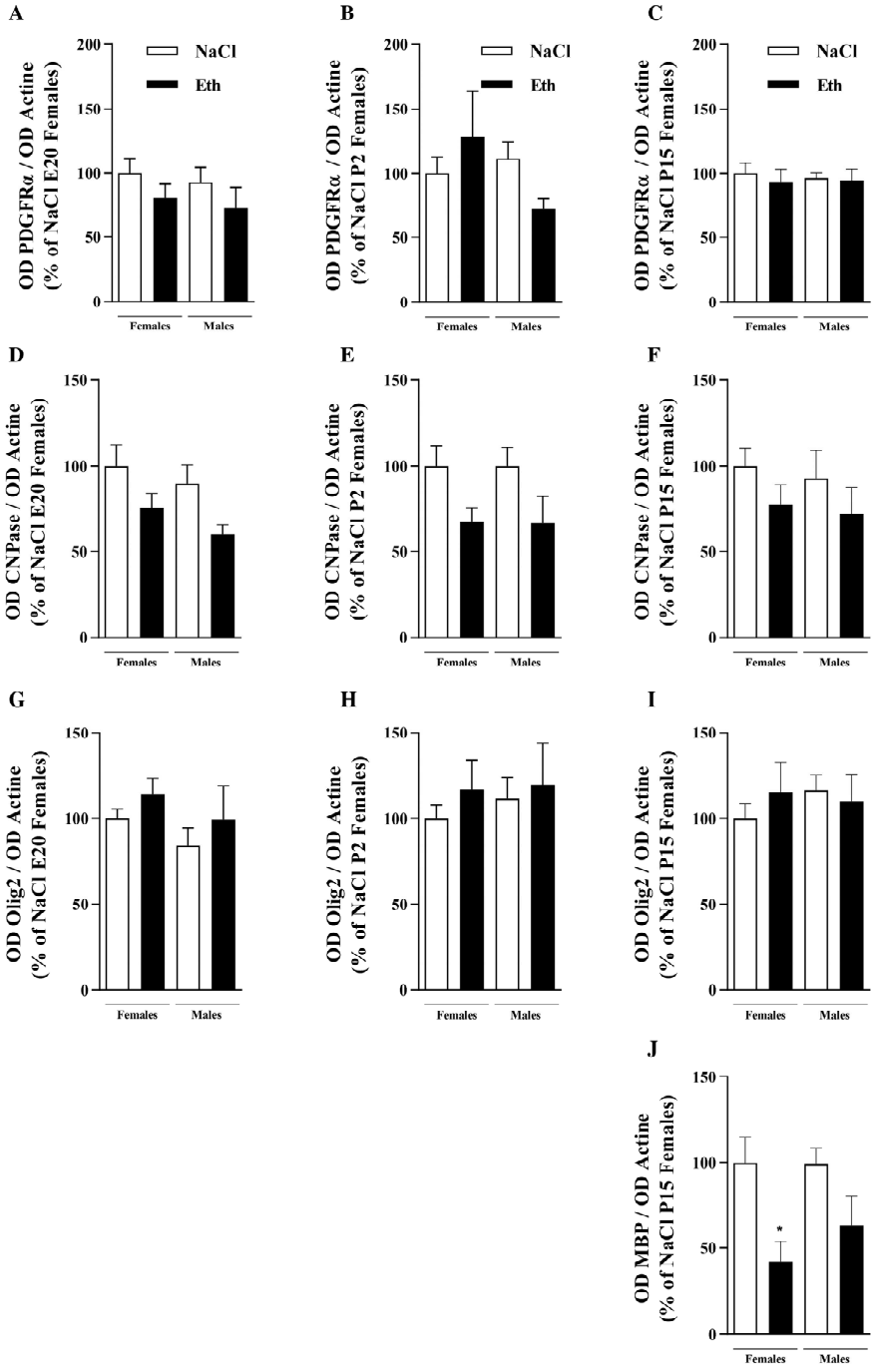
Suppl. figure 1, Brosolo et al.



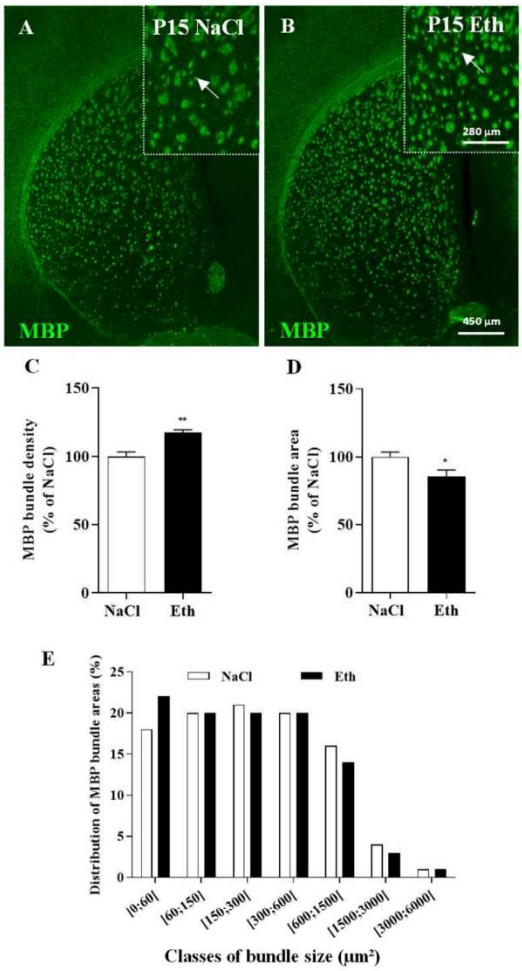
Suppl. figure 2, Brosolo et al.



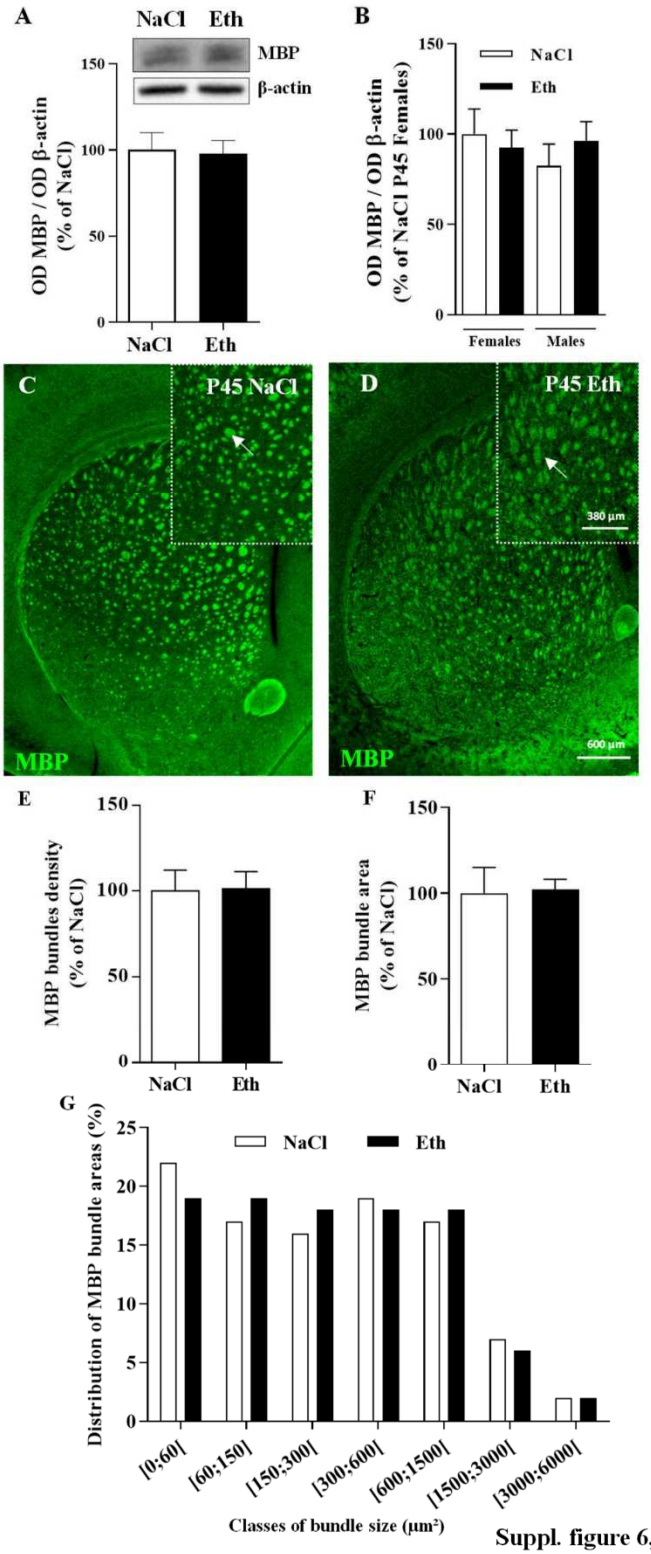
Suppl. figure 3, Brosolo et al.



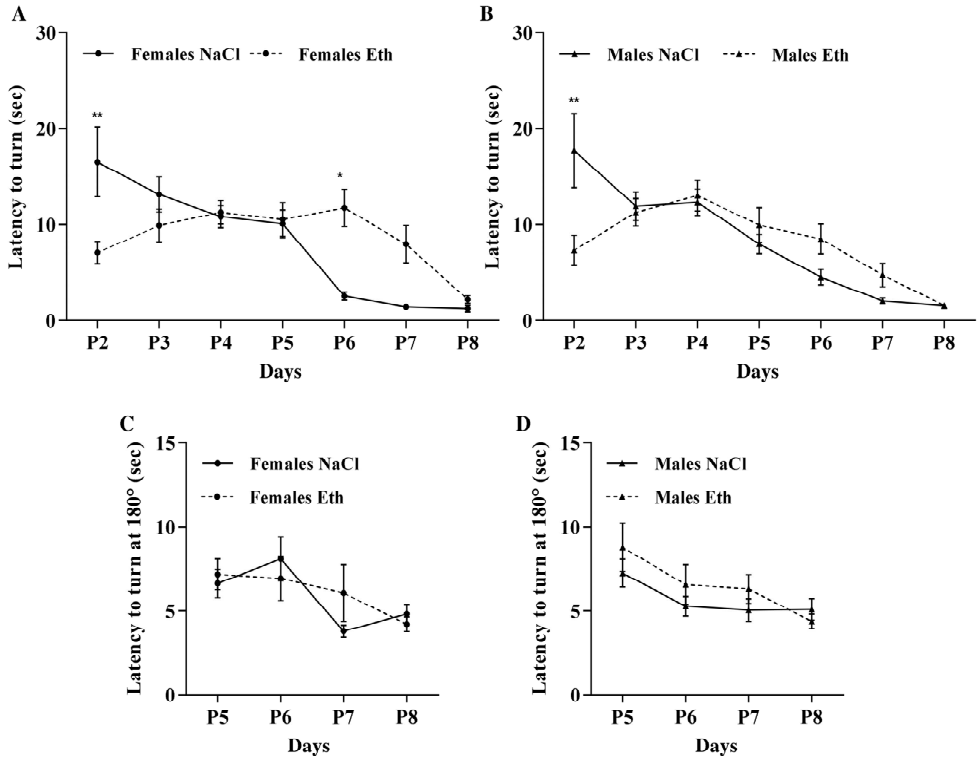
Suppl. figure 4, Brosolo et al.



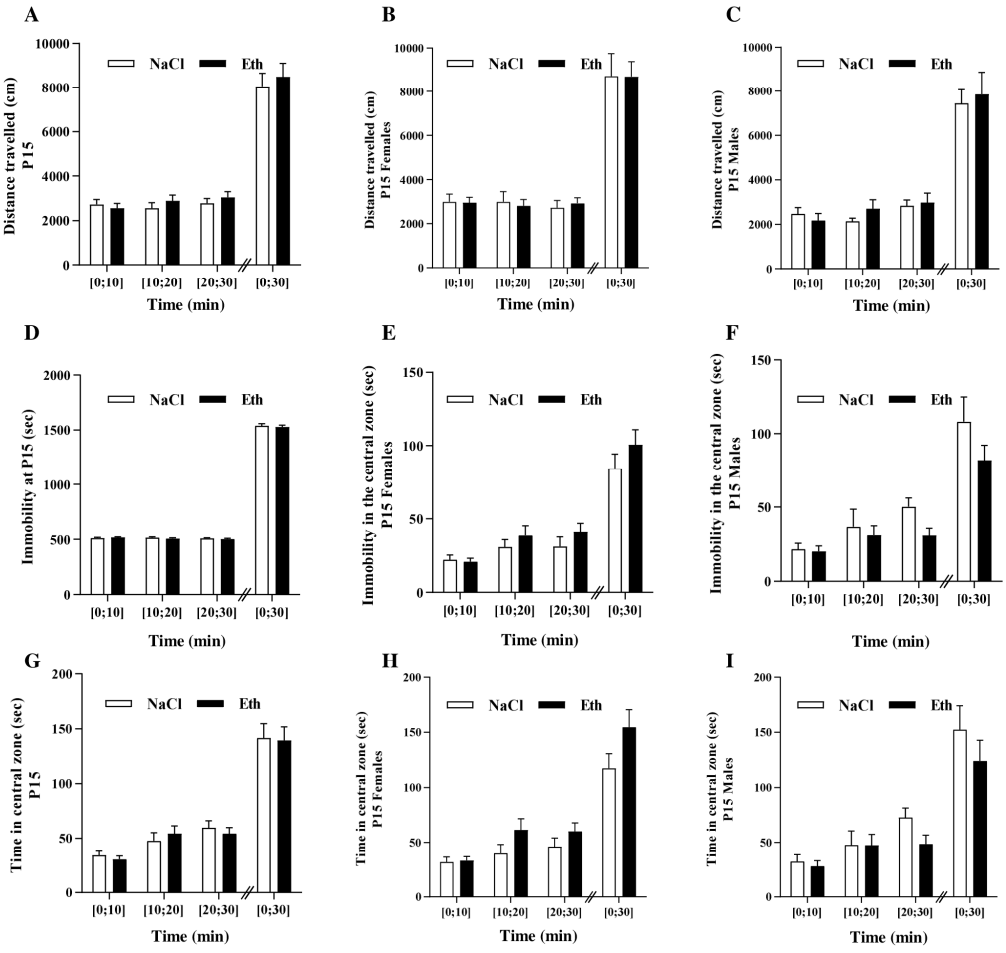
Suppl. figure 5, Brosolo et al.



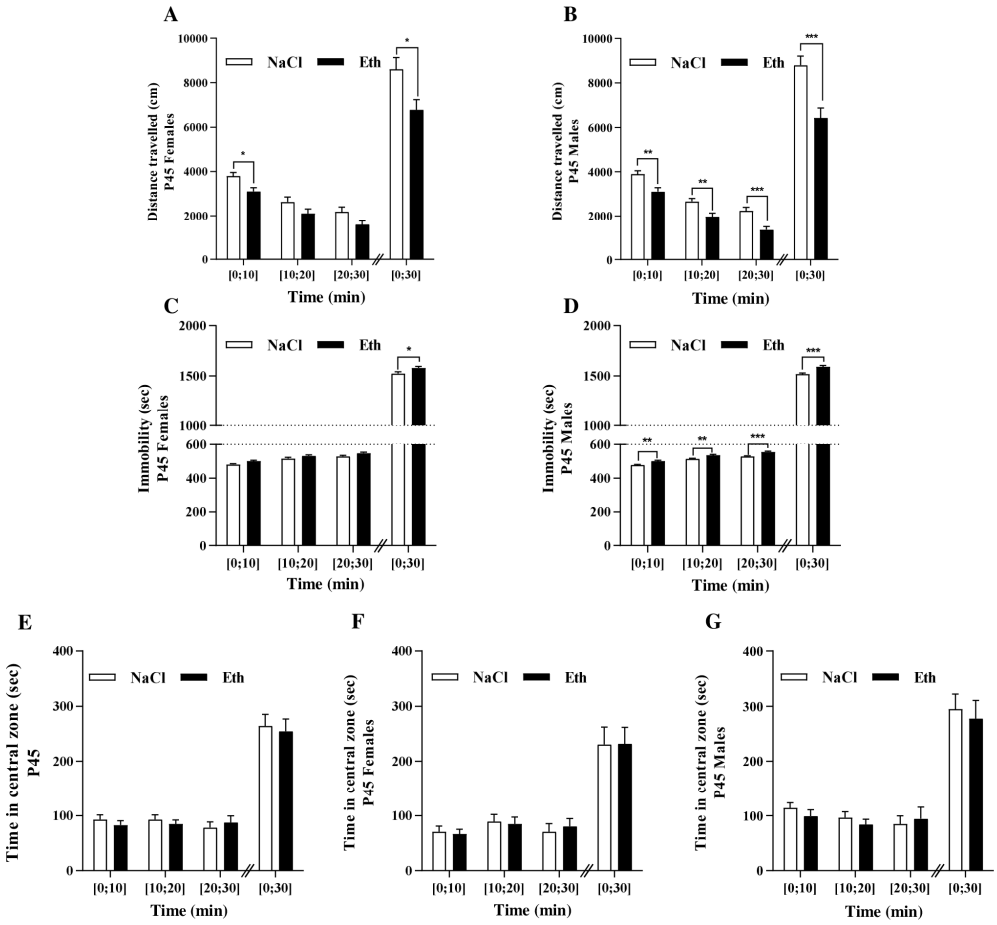
Suppl. figure 6, Brosolo et al.



Suppl. figure 7, Brosolo et al.



Suppl. figure 8, Brosolo et al.



Suppl. figure 9, Brosolo et al.

Figure Legends

Fig. 1. A,B. Graphical description of the experiments conducted in human brains from control and alcohol-exposed fetuses (A) and in the preclinical model of FASD (B). **C.** Maturation markers used in the study that representative of the four main stages of oligodendrocyte differentiation described in the literature (Marinelli et al., 2016). CD34: Cluster of differentiation 34; CNPase: 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; Eth: ethanol; Ex: Embryonic day x; GD15: gestational day15; GW: gestational weeks; MBP: myelin basic protein; Olig2: oligodendrocyte transcription factor 2; OL: oligodendrocyte; OPC: oligodendrocyte progenitors cells ; PDGFRα: platelet-derived growth factor-α; Pre-OL: pre-oligodendrocytes; Px: postnatal day x; q-RTPCR: reverse transcription polymerase chain reaction; WB: western blot.

Fig. 2. Oligo-vascular interactions in the human fetal cortex. **A.** Immunohistochemistry experiments targeting Olig2 and CD34 in human neocortices from a FAS fetus at gestational week 29 (29GW). **B.** Focus on one vessel (x40), presenting associated (arrows) and non-associated (arrowheads) Olig2-positive cells. **C-E.** 3D IMARIS reconstruction of Z-stacks acquired from B. The 3D map is visualized under three different angles (0°; 65°; 180°). Morphometric analysis consisted in measuring the distance between Olig2-positive nuclei and the center of the microvessel (dotted bareline). **F-H.** Visualization of oligo-vascular interactions in the control fetus (Ctrl) at 30GW at low (F) and high (G,H) magnification. **I,J.** Quantification of the number of vessel-associated Olig2-positive cells in the deep cortex of control (I) and FAS (J) fetuses.

Fig. 3. Effect of PAE on oligo-vascular interactions in the neocortex of mouse neonates. **A.** Visualization by double immunolabeling of Olig2-positive cells and microvessels (CD31) in the developing cortex at P2 (A). **B**. 3D map reconstruction of the Z-stack acquisition shown in A. Cells in interaction with microvessels (distance < 10 µm) are indicated by arrows. Olig2-positive cells at distance of microvessels are indicated by arrowheads. A video is provided as supplementary file to clearly objectivize cell distances. **C,D**. Immunohistochemistry experiments visualizing the association of Olig2-positive cells with radial microvessels in control (C) and alcohol-exposed (D) cortices at E20. **E**. Distribution of microvessel orientation (angle classes) in the developing cortex of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at E20. Statistical analysis was done using the $\chi 2$ test. **F**. Percentage of Olig2-positive cells associated with microvessels in the developing superficial (SCL) and deep (DCL) cortical

layers of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at E20. Statistical analysis was done using the two way ANOVA test. **G,H**. Immunohistochemistry experiments visualizing the association of Olig2-positive cells with radial microvessels in control (G) and alcohol-exposed (H) cortices at P2. **I**. Distribution of microvessel orientation (angle classes) in the developing cortex of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at P2. Statistical analysis was done using the $\chi 2$ test. **J**. Percentage of Olig2-positive cells associated with microvessels in the developing superficial (SCL) and deep (DCL) cortical layers of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at P2. Statistical analysis was done using the ANOVA test. **K,L**. Immunohistochemistry experiments visualizing the association of Olig2-positive cells with radial microvessels in control (G) and alcohol-exposed (H) cortices at P15. **M**. Distribution of microvessel orientation (angle classes) in the developing cortex of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at P15. Statistical analysis was done using the $\chi 2$ test. **N**. Percentage of Olig2-positive cells associated with microvessels in cortical layers I-IV and V-VI of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) mice at P15. Statistical analysis was done using the ANOVA test. CC : corpus callosum; DCL : deep cortical layers; SCL : superficial cortical layers; Eth : ethanol, I-VI : cortical layers I to VI.

Fig. 4. Effects of PAE on the whole density of Olig2-positive cells in the developing cortex. **A,B**. Visualization of Olig2-positive cells in the developing cortex at P2 of control (A) and alcohol-exposed (B) fetuses. Olig2-positive cells were observed in both superficial (SCL) and deep (DCL) cortical layers. Microvessels were visualized using CD31 immunolabeling. **C,D**. Time course of the density of Olig2-positive cells in deep (C) and superficial (D) cortical layers of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) fetuses at E20, P2 and P15. **E,F.** Ratio of Olig2-positive cell densities between superficial and deep cortical layers in control (E) and alcohol-exposed (F) fetuses at E20, P2 and P15. **G**. Comparison of SCL/DCL ratio between control and alcohol groups at P2. ****$p < 0.0001$, two way ANOVA test followed by Tukey's post-test ; *$p < 0.05$ *vs* control using the unpaired t test. DCL : deep cortical layers; SCL : superficial cortical layers; Eth : Ethanol.

Fig. 5. Effects of PAE on the expression of differentiation markers of the oligodendrocyte lineage. **A-D**. Effect of PAE on mRNA expression of PDGFRα (A), CNPase (B), MBP (C) and Olig2 (D) in cortical extracts from control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) fetuses at E20, P2 and P15 pups. ****$p < 0.0001$, **$p < 0.01$ *vs* control, two way ANOVA test followed by Tukey's post-test. **E-I**. Effect of PAE on protein expression of PDGFRα (E, F), CNPase (E, G), MBP (E, H) and Olig2 (E, I) in cortical extracts from control (white bars) and alcohol-

exposed (black bars) fetuses at E20, P2 and P15 pups. MBP was not detected by western blot at E20 and P2. *p<0.05, **p<0.01 vs control using the unpaired t test.

Fig. 6. Effects of PAE on the cortical distribution profile of CNPase and MBP immunoreactivities. **A,B**. Visualization of CNPase-positive cells in the developing cortex of control (A) and *in utero* alcohol-exposed (B) mice at P15. **C**. Distribution profiles by scanline analysis of the CNPase immunoreactivity in cortical layers of control (black curve) and *in utero* alcohol-exposed (red curve) mice at P15. **D**. Quantification of the relative distribution of CNPase immunoreactivity between the cortical layers of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P15. **E,F**. Visualization of MBP-positive cells in the developing cortex of control (E) and *in utero* alcohol-exposed (F) mice at P15. **G**. Distribution profiles by scanline analysis of the MBP immonoreactivity in cortical layers of control (black curve) and *in utero* alcohol-exposed (red curve) mice at P15. **H**. Quantification of the relative distribution of the MBP immunoreactivity between cortical layers of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P15. **I,J**. Compared analysis of the CNPase (green curves) and MBP (blue curves) distribution profiles in control (I) and *in utero* alcohol-exposed (J) mice at P15. **K**. Comparison of the MBP/CNPase ratio in the cortical layers from control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P15. *p<0.05, **p<0.01 vs control using unpaired t test. Crtl : Control ; Eth : Ethanol.

Fig. 7. Effects of PAE on axonal myelination in the corpus callosum. **A-D.** Visualization by electronic microscopy of myelinated axons at low (A,C) and high (B,D) magnification in transverse sections of corpus callosums from control (A,B) and *in utero* alcohol-exposed mice at P15. **E**. Quantifications of the density of myelinated fibres in the corpus callosum of control (white bar) and *in utero* alcohol-exposed (black bar) mice at P15. *p<0.05 *vs* control using unpaired t test. **F**. Quantification of the myelin sheath of axons in the corpus callosum of control (white bar) and *in utero* alcohol-exposed (black bar) mice at P15. ***p<0.001 *vs* control using unpaired t test. **G**. Distribution of myelinated axon areas in the corpus callosum of control (white bar) and *in utero* alcohol-exposed (black bar) mice at P15. Areas of axonal sections were distributed in 5 classes ranging from]0-2] to >10 µm². Statistical analysis was done using $\chi 2$ test. NaCl: Control ; Eth: Ethanol.

Fig. 8. Effects of PAE on sensorimotor disabilities. **A**. Time course quantification of the latency to turn from supine to prone position of control (black line) and alcohol-exposed (dotted line) neonates. The righting reflex test was done from P2 to P8. ***p<0.001, ****p<0.0001 *vs*

control group using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test. **B**. Time course quantification of the latency to turn from face-down to face-up position of control (black line) and alcohol-exposed (dotted line) neonates. The negative geotaxis tests was done from P5 to P8. Statistical analysis was done using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test. **C-F**. Quantification of the distance travelled by control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P45. Distance covered was measured during the first 30 min of recording and analysed in the whole (C), central (D) and peripheral (E) zones of the open field. **F**. Visualization of the tracking and heat maps used to quantify distance travelled and immobility of control (NaCl) and *in utero* alcohol-exposed (Alcohol) mice at P45. False color scale visualizes low (blue) and high (red) durations of immobility. **G,H**. Quantification of immobility of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P45. Immobility was measured during the first 30 min of recording and analysed in the whole (G), central (H) and peripheral (H) zones of the open field. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$ *vs* control using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test and unpaired t test.

Fig. 9. Graphical abstract integrating neurodevelopmental highlights from the present study. **A-C**. Data from non-exposed and *in utero* exposed to alcohol are respectively represented by circled and squared numbers. Each symbol is described in the graph legend.

Supplementary Figure Legends

sFig. 1. A-C. Follow-up from P2 to P45 of weight gain in control (NaCl) and *in utero* alcohol-exposed (Ethanol) mice. Data were expressed as mean ± SEM from pooled females and males (A), females (B) and males (C). Two way ANOVA test followed by Tukey's post-test.

sFig. 2. Effects of PAE on the whole density of Olig2-positive cells in the developing cortex. **A-C**. Comparison of the density of Olig2-positive cells in the corpus callosum (CC), deep (DCL) and superficial (SCL) cortical layers from control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) fetuses at E20 (A), P2 (B) and P15 (C). **D**. Time course of the density of Olig2-positive cells in the corpus callosum (CC) of control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) fetuses at E20, P2 and P15. **E,F**. Comparison of SCL/DCL ratio between control and alcohol groups at E20 (E) and P15 (F). **G**. Double immunohistochemistry visualizing GFAP-positive (green signal) and Olig2-positive (red signal) cells. Note the absence of co-localization supporting that Olig2-positive cells belong to the oligodendrocyte lineage. *p<0.05, two way ANOVA test followed by Tukey's post-test; CC: corpus callosum; DCL: deep cortical layers; SCL: superficial cortical layers; Eth: ethanol; NaCl: control.

sFig. 3. A-H. Effect of PAE on mRNA expression of PDGFRα (A,B), CNPase (C,D), MBP (E,F) and Olig2 (G,H) in cortical extracts from control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) females (A,C,E,G) and males (B,D,F,H) at E20, P2 and P15. ****p < 0.0001, **p < 0.01 using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test.

sFig. 4. Effect of PAE on protein expression of PDGFRα (A-C), CNPase (D-F), Olig2 (G-I) and MBP (J) in cortical extracts from control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) females and males at E20 (A,D,G), P2 (B,E,H) and P15(C,F,I,J). at E20, P2 and P15 pups. MBP was not detected by western blot at E20 and P2. *p< 0.05 *vs* control using two-way ANOVA test followed by Tukey's post-test. NaCl: control; Eth: Ethanol.

sFig. 5. Effects of PAE on MBP-positive bundles in the developing striatum at P15. **A,B**. Visualization by immunohistochemistry of MBP-positive bundles in the developing striatum in control (A) and *in utero* alcohol-exposed (B) mice. Inserts visualize bundles at higher magnification. **C**. Quantification of bundle density in control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P15. **D**. Quantification of mean bundle areas in control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P15. **E**. Distribution of bundle sizes in control (white

bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P15. *p<0.05, **p<0.01 *vs* control using unpaired t test. NaCl: control; Eth: Ethanol.

sFig. 6. Effects of PAE on MBP expression in adult mice. **A,B**. Quantification by western blot of MBP expression in the neocortex of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice at P45. Data were expressed without considering sex (A) or differentiating between females and males (B). **C,D**. Visualization by immunohistochemistry of MBP-positive bundles in the developing striatum in control (A) and *in utero* alcohol-exposed (B) adult mice. Inserts visualize bundles (arrows) at higher magnification. **E**. Quantification of bundle density in control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P45. **F**. Quantification of mean bundle areas in control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P45. **G**. Distribution of bundle sizes in control (white bars) and alcohol-exposed (black bars) striatum at P45. Statistical analysis revealed no significant differences.

sFig. 7. A,B. Time course quantification from P2 to P8 of the latency to turn from supine to prone position of control (black line) and *in utero* alcohol-exposed (dotted line) neonates using the righting reflex test. Data were expressed differentiating females (A) and males (B). *p<0.05, **p<0.01 *vs* control group using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test. **C,D**. Time course quantification from P5 to P8 of the latency to turn from face-down to face-up position of control (black line) and alcohol-exposed (dotted line) neonates using the negative geotaxis tests. Data were expressed differentiating females (C) and males (D). Statistical analysis was done using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test. Statistical analysis revealed no significant differences.

sFig. 8. Effect of ethanol on locomotor activity at P15. **A-C**. Distance travelled during 30 minutes by control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice in the entire open-field without considering the sex of animals (A) and differentiating between females (B) and males (C). **D-F**. Quantification of immobility of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice during 30 minutes without considering the sex of animals (D) and differentiating between females (E) and males (F). **G-I**. Time spent by control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice in central zone of the open-field during 30 minutes without considering the sex of animals (G) and differentiating between females (H) and males (I). Statistical analysis revealed no significant differences. NaCl group vs Ethanol group, using the two way ANOVA test followed by Tukey's post-test and unpaired t test. Values are expressed as the mean ± SEM.

sFig. 9. Effect of ethanol on locomotor activity at adulthood (P45). **A,B**. Distance travelled during 30 minutes by control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice in the entire open-field and differentiating between females (A) and males (B). **C,D**. Quantification of immobility of control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice during 30 minutes and differentiating between females (C) and males (D). **E-G**. Time spent by control (white bars) and *in utero* alcohol-exposed (black bars) mice in central zone of the open-field during 30 minutes without considering the sex of animals (E) and differentiating between females (F) and males (G). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 *vs* control using two way ANOVA test followed by Tukey's post-test and unpaired t test.

sVideo 1. Video visualizing oligo-vascular interactions in the neocortex of a FASD 29GW fetus after IMARIS 3D modelling of Olig2-positive cells and CD34-positive microvessels.

sVideo 2. Video visualizing oligo-vascular interactions in P2 mouse neocortex after IMARIS 3D modelling of Olig2-positive cells and CD31-positive microvessels.

Table 1. Clinical and morphological characteristics of control and alcohol exposed fetuses.

Cases	Term	Morphological characteristics	Cause of death
Control case	30 GW	None	Cord prolapse
FAS case	29 GW	Anteversed nostrils and pointed nose Ear anomalies Indistinct philtrum Retrognathism	*In utero* fetal death Cardiopathy

Table 2. Primers used for qRT-PCR experiments. GAPDH was used as internal control.

Primers	**Sequences 5' to 3'**
PDGFRα *f*	GACGTTCAAGACCAGCGAGTT
PDGFRα *r*	CAGTCTGGCGTGCGTCC
CNPase *f*	AGACAGCGTGGCGACTAGACT
CNPase *r*	GGGCTTCAGCTTCTTCAGGT
MBP *f*	ACGAGAACTACCCATTATG
MBP *r*	GATGGAGGTGGTGTTC
Olig2 *f*	AGCCAGGTTCTCCTC
Olig2 *r*	GGGCAGAAAAAGATCATC
GAPDH *f*	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
GAPDH *r*	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA

Table 3. Antibodies used for immunohistochemitry and western blot experiments.

Antibodies	Trade reference	Purified species	Supplier	Dilution	Solution of incubation
CD31/PECAM	IHC: cat 550274	Rat	BD-Pharmigen	1/200	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
CD34	IHC: 790-2927	Mouse	ROCHE	Prediluted	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
CNPase	IHC: NB100-1935 WB: Ab227218	Chicken Rabbit	Novus Biological Abcam	1/200 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% TBST)
GFAP	IHC : Ab10062	Mouse	Abcam	1/200	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Glut1	IHC: SC 1605	Goat	Santa Cruz	1/200	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
MBP	IHC: Ab7349 WB: Ab7349	Rat	Abcam	1/200 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% TBST)
Olig2	IHC: Ab136253 WB: Ab136253	Rabbit	Abcam	1/200 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% TBST)
PDGFRα	IHC: AF1062 WB: PA5-16571	Goat Rabbit	R&D System ThermoFisher	1/200 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% TBST)
β-Actin	WB: A5441	Mouse	Sigma- Aldrich	1/5000	Milk (5% in TBST)

Table 4. Main figures statistical analysis. The tests used, the number of independent experiments, the number of measures per experiment and p values are detailed for each experiments. Error bars in the graphs represent SEM.

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001
Fig. 3E Distribution of cortical vessels orientation at E20	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 9.709, 3 p=0.0212*
Fig. 3F Olig2-positive cells vessel associated at E20	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 0.5432 ; p= 0.7594 ; ns Zones F 9.934 ; p= 0.2014 ; ns Treatment F 0.0022 ; p= 0.9844 ; ns

Fig. 3I Distribution of cortical vessels orientation at P2	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 8.536, 3 p=0.0361*
Fig. 3J Olig2-positive cells vessel associated at P2	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 0.1072 ; p= 0.8721 ; ns Zones F 2.679 ; p= 0.4240 ; ns Treatment F 0.01191 ; p= 0.9572 ; ns
Fig. 3M Distribution of cortical vessels orientation at P15	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.8597, 3 p=0.8351 ; ns
Fig. 3N Olig2-positive cells vessel associated at P15	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 0.0406 ; p= 0.9366 ; ns Zones F 0.09556; p= 0.9030 ; ns Treatment F 0.1317 ; p= 0.8862 ; ns
Fig. 4C Olig2-positive cells density in deep cortical layers (DCL)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 0.1787 ; ns Ages F 83.29 ; p<0.0001**** Treatment F 0.1792 ; p= 0.5833 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 4D Olig2-positive cells density in superficial cortical layers (SCL)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 0.2338 ; ns Ages F 85.87 ; p<0.0001**** Treatment F 0.5127 ; p= 0.3070 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 4E Ratio Olig2-positive SCL vs DCL in NaCl	One way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA F 26.88 ; p<0.0001**** Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 4F Ratio Olig2-positive SCL vs DCL in Ethanol	One way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA F 32.53 ; p<0.0001**** Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 4G Ratio Olig2-positive SCL vs DCL at P2	Unpaired t-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent	NaCl *vs* Eth p<0.05*

		animals per treatment	
Fig. 5A PDGFRα Q-RTPCR on cortical extracts	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.7139 ; p<0.05* Ages F 88.81 ; p<0.0001**** Treatment F 0.07787 ; p=0.3898 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 5B CNPase Q-RTPCR on cortical extracts	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.5603 ; ns Ages F 81.99 ; p<0.0001**** Treatment F 0.2806 ; p=0.2440 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 5C MBP Q-RTPCR on cortical extracts	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 2.643 ; p<0.05* Ages F 69.65 ; p<0.0001**** Treatment F 1.300 ; P<0.05* Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P15 NaCl vs P15 Eth p<0.01**
Fig. 5D Olig2 Q-RTPCR on cortical extracts	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.4516 ; ns Ages F 87.84 ; p<0.0001**** Treatment F 0.5053 ; p= 0.0529 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
Fig. 5F Western blot PDGFRα on cortical extracts	Unpaired t-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	E20 NaCl *vs* E20 Eth p= 0.1169 ; ns P2 NaCl *vs* P2 Eth p= 0.9255 ; ns P15 NaCl *vs* P15 Eth p=0.5642 ; ns
Fig. 5G Western blot CNPase on cortical extracts	Unpaired t-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	E20 NaCl *vs* E20 Eth p< 0.05* P2 NaCl *vs* P2 Eth p<0.01** P15 NaCl *vs* P15 Eth p=0.1092 ; ns
Fig. 5H Western blot MBP on P15 cortical extracts	Unpaired t-test	n = 16 animals per treatment Males = 8 Females = 8	P15 NaCl *vs* P15 Eth p< 0.01**
Fig. 5I Western blot Olig2 on cortical extracts	Unpaired t-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	E20 NaCl *vs* E20 Eth p= 0.1349 ; ns P2 NaCl *vs* P2 Eth p=0.4744 ; ns P15 NaCl *vs* P15 Eth p=0.7280 ; ns
Fig. 6D	Unpaired t-test	n = 5	P15 NaCl *vs* P15 Eth in cortical layers V ; p<0.05*

CNPase fluorescent intensity on cortical layers at P15		at least 5 measures per animals per treatment	P15 NaCl *vs* P15 Eth in cortical layers VI ; $p<0.05^{*}$
Fig. 6H MBP fluorescent intensity on cortical layers at P15	Unpaired t-test	n = 5 at least 5 measures per animals per treatment	P15 NaCl *vs* P15 Eth in cortical layers VI ; $p<0.05^{*}$
Fig. 6K MBP/CNPase ratio of fluorescent intensity on cortical layers at P15	Unpaired t-test	n = 5 at least 5 measures per animals per treatment	P15 NaCl *vs* P15 Eth in cortical layers VI ; $p<0.01^{**}$
Fig. 7E Myelinated fibers density	Unpaired t test	n=6 at least 4 ROI analysed from 6 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth $p<0.05^{*}$
Fig. 7F Myelin sheath thickness	Unpaired t test	n=6 at least 4 ROI analysed from 6 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth $p<0.001^{***}$
Fig. 7G Distribution of axonal area	Chi-square test	n=6 at least 4 ROI analysed from 6 independent animals per treatment	Chi-square, df 5.134, 4 p=0.2738 ; ns
Fig. 8A Latency to turn in the righting reflex test over time	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA F 8.347 ; p<0.0001**** Ages F 29.45 ; p<0.0001**** Treatment F 0.007081 ; p= 0.8196 ; ns Tukey's P2 NaCl vs P2 Eth $p<0.0001^{****}$ P6 NaCl vs P6 Eth $p<0.001^{***}$
Fig. 8B Latency to turn at 180° in negative geotaxis test over time	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA F 1.366 ; p= 0.2517 ; ns Ages F 7.252 ; p<0.0001**** Treatment F 0.7704 ; p= 0.1288 ; ns
Fig. 8C Distance travelled in the entire compartment at P45 in three	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13	ANOVA F 0.1014 ; p=0.8279 ; ns Time F 49.21 ; p<0.0001**** Treatment F 12.87 ; p<0.0001**** Tukey's

consecutive 10-minutes periods		Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.001*** P45 NaCl vs P45 Eth [10;20] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [20;30] p<0.001***
Fig. 8C Distance travelled in the entire compartment at P45 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p<0.0001****
Fig. 8D Distance travelled in the central zone at P45 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA F 0.8366 ; p=0.4107 ; ns Time F 27.57 ; p<0.0001**** Treatment F 5.535 ; p<0.001*** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.01**
Fig. 8D Distance travelled in the central zone at P45 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p<0.05*
Fig. 8E Distance travelled in the peripheral zone at P45 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA F 0.2576 ; p=0.6161 ; ns Time F 48.61 ; p<0.0001**** Treatment F 13.85 ; p<0.0001**** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.001*** P45 NaCl vs P45 Eth [10;20] p<0.01*** P45 NaCl vs P45 Eth [20;30] p<0.0001****
Fig. 8E Distance travelled in the peripheral zone at P45 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p<0.0001****
Fig. 8G Immobility in the entire compartment at P45 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA F 0.1019 ; p=0.8272 ; ns Time F 49.32 ; p<0.0001**** Treatment F 12.74 ; p<0.0001**** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.001*** P45 NaCl vs P45 Eth [10;20] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [20;30] p<0.0001****
Fig. 8G Immobility in the entire compartment at P45 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p<0.0001****

Fig. 8H Immobility over 30 minutes at P45 in the central and peripheral zone	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA F 0.05429 ; p<0.0001**** Zone F 99.67 ; p<0.0001**** Treatment F 0.07582 ; p<0.0001**** Tukey's P45 NaCl CZ vs P45 NaCl PZ [0;30] p<0.0001**** P45 Eth CZ vs P45 Eth PZ [0;30] p<0.0001**** P45 NaCl PZ vs P45 Eth PZ [0;30] p<0.0001****

Table 5. Supplementary figures statistical analysis. The tests used, the number of independent experiments, the number of measures per experiment and p values are detailed for each experiments. Error bars in the graphs represent SEM.

Experiments	**Test**	**n** **independents experiments**	**p value** ***p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001**
sFig. 1A Weight tracking	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth	ANOVA Interaction F 0.07278 ; p= 0.0695 ; ns Ages F 96.85 ; p<0.0001**** Treatment F 0.04493 ; p<0.0011**
sFig. 1B Weight tracking in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.2042 ; p<0.0001**** Ages F 98.32 ; p<0.0001**** Treatment F 0.03235 ; p<0.0058**
sFig. 1C Weight tracking in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.03507 ; p= 0.0532 ; ns Ages F 99.12 ; p<0.0001**** Treatment F 0.04785 ; p<0.0001****
sFig. 2A Distribution of olig2-positive cells density at E20	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.1845, 2 p=0.9119 ; ns
sFig. 2B Distribution of olig2-positive cells density at P2	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.6670, 2 p=0.7164 ; ns

sFig. 2C Distribution of olig2-positive cells density at P15	Chi-square test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.2403, 2 p=0.8868 ; ns
sFig. 2D Olig2-positive cells density in corpus callosum (CC)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	ANOVA Interaction F 1.155 ; p= 0.7371 ; ns Ages F 46.33 ; p<0.0001**** Treatment F 0.1407 ; p= 0.7861 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.05*
sFig. 2E Ratio Olig2-positive cells SCL *vs* DCL at E20	Unpaired t-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth p= 0.8080 ; ns
sFig. 2F Ratio Olig2-positive cells SCL *vs* DCL at P15	Unpaired t-test	n=5 at least 3 slices analysed from 5 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth p= 0.2843 ; ns
sFig. 3A PDGFRα Q-RTPCR on cortical extracts in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.4193 ; p= 0.2107 ; ns Ages F 91.77 ; p<0.0001**** Treatment F 0.6680 ; p<0.05* Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.01**
sFig. 3B PDGFRα Q-RTPCR on cortical extracts in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.2666 ; p= 0.6127 ; ns Ages F 89.74 ; p<0.0001**** Treatment F 0.04027 ; p= 0.7008 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
sFig. 3C CNPase Q-RTPCR on cortical extracts in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 1.261 ; p= 0.1089 ; ns Ages F 86.04 ; p<0.0001**** Treatment F 0.5934 ; p= 0.1456 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
sFig. 3D CNPase Q-RTPCR on cortical extracts in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 1.100 ; p= 0.4469 ; ns Ages F 73.55 ; p<0.0001**** Treatment F 0.5546 ; p= 0.3680 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****

sFig. 3E MBP Q-RTPCR on cortical extracts in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 5.676 ; p<0.05* Ages F 62.39 ; p<0.0001**** Treatment F 2.766 ; p<0.05* Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P15 NaCl *vs* P15 Eth p<0.01**
sFig. 3F MBP Q-RTPCR on cortical extracts in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.8260 ; p= 0.5474 ; ns Ages F 74.87 ; p<0.0001**** Treatment F 0.3841 ; p= 0.4552 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
sFig. 3G Olig2 Q-RTPCR on cortical extracts in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.4205 ; p= 0.2810 ; ns Ages F 91.81 ; p<0.0001**** Treatment F 0.05686 ; p= 0.5554 ; ns Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001****
sFig. 3H Olig2 Q-RTPCR on cortical extracts in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.1477 ; p= 0.0607 ; ns Ages F 85.54 ; p<0.0001**** Treatment F 1.934 ; p<0.01** Tukey's E20 NaCl *vs* P2 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P15 NaCl p<0.0001**** P2 NaCl *vs* P2 Eth p<0.01**
sFig. 4A Western blot PDGFα on cortical extracts at E20	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.0003 ; p= 0.9926 ; ns Sexes F 1.342 ; p= 0.5465 ; ns Treatment F 9.226 ; p= 0.1216 ; ns
sFig. 4B Western blot PDGFα on cortical extracts at P2	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 9.615 ; p= 0.1141 ; ns Sexes F 4.287 ; p= 0.2844 ; ns Treatment F 0.2702 ; p= 0.7858 ; ns
sFig. 4C Western blot PDGFα on cortical extracts at P15	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.4724 ; p= 0.7210 ; ns Sexes F 0.09618 ; p= 0.8718 ; ns Treatment F 1.518 ; p= 0.5231 ; ns
sFig. 4D Western blot CNPase on cortical extracts at E20	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.1520 ; p= 0.8242 ; ns Sexes F 3.724 ; p= 0.2766 ; ns Treatment F 16.17 ; p<0.05*
sFig. 4E Western blot CNPase on	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8	ANOVA Interaction F 2^{e-005}; p= 0.9979 ; ns Sexes F 0.2077 ; p= 0.7914 ; ns Treatment F 24.25 ; p<0.01**

cortical extracts at P2		Females = 8	
sFig. 4F Western blot CNPase on cortical extracts at P15	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.02871 ; p= 0.9221 ; ns Sexes F 1.100 ; p= 0.5462 ; ns Treatment F 12.49 ; p<0.05*
sFig. 4G Western blot Olig2 on cortical extracts at E20	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.007199 ; p= 0.9607 ; ns Sexes F 5.868 ; p= 0.1658 ; ns Treatment F 5.416 ; p= 0.1825 ; ns
sFig. 4H Western blot Olig2 on cortical extracts at P2	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 0.2240 ; p= 0.8086 ; ns Sexes F 0.6667 ; p= 0.6765 ; ns Treatment F 1.844 ; p= 0.4890 ; ns
sFig. 4I Western blot Olig2 on cortical extracts at P15	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 2.079 ; p= 0.4452 ; ns Sexes F 0.5403 ; p= 0.6960 ; ns Treatment F 0.3442 ; p= 0.7551 ; ns
sFig. 4J Western blot MBP on cortical extracts at P15	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 1.476 ; p= 0.4459 ; ns Sexes F 1.289 ; p= 0.4760 ; ns Treatment F 26.90 ; p<0.01** Tukey's P15 NaCl Females *vs* P15 Eth Females p<0.05*
sFig. 5C MBP bundles density in the striatum at P15	Unpaired t-test	n=5 at least 2 slices analysed from 5 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth p<0.01**
sFig. 5D MBP bundles aera in the striatum at P15	Unpaired t test	n=5 at least 2 slices analysed from 5 independent animals per treatment	NaCl *vs* Eth p<0.05*
sFig. 5E Distribution of MBP bundle areas at P15	Chi-square test	n=5 at least 2 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.7006, 6 p=0.9945 ; ns
sFig. 6A Western blot MBP on cortical extracts at P45	Unpaired t test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	NaCl *vs* Eth p=0.8722 ; ns

sFig. 6B Western blot MBP on cortical extracts at P45	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	ANOVA Interaction F 3.029 ; p= 0.3630 ; ns Sexe F 1.184 ; p= 0.5677 ; ns Treatment F 0.2588 ; p= 0.7889 ; ns
sFig. 6E MBP bundles density at P45	Unpaired t test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	NaCl *vs* Eth p=0.9345 ; ns
sFig. 6F MBP bundles area at P45	Unpaired t test	n = 16 animals per age and per treatment Males = 8 Females = 8	NaCl *vs* Eth p=0.8946 ; ns
sFig. 6G Distribution of MBP bundle areas at P45	Chi-square test	n=5 at least 2 slices analysed from 5 independent animals per treatment	Chi-square, df 0.5808, 6 p=0.9967 ; ns
sFig. 7A Latency to turn in the righting reflex test over time in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA Interaction F 12.98 ; p<0.0001**** Ages F 23.86 ; p<0.0001**** Treatment F 0.2173 ; p= 0.4094 ; ns Tukey's P2 NaCl Females vs P2 Eth Females p<0.01** P6 NaCl Females vs P6 Eth Females p<0.05*
sFig. 7B Latency to turn in the righting reflex test over time in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA Interaction F 6.634 ; p<0.001*** Ages F 31.56 ; p<0.0001**** Treatment F 0.02647 ; p= 0.7511 ; ns Tukey's P2 NaCl Males vs P2 Eth Males p<0.01**
sFig. 7C Latency to turn at 180° in negative geotaxis test over time in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA Interaction F 2.311 ; p= 0.3707 ; ns Ages F 8.6 ; p<0.05* Treatment F 0.09161 ; p= 0.7237 ; ns
sFig. 7D Latency to turn at 180° in negative geotaxis test over time in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 37 in NaCl ; n = 37 in Eth Females NaCl = 17 Females Eth = 18 Males NaCl = 20 Males Eth = 19	ANOVA Interaction F 1.337 ; p= 0.5579 ; ns Ages F 9.388 ; p<0.01** Treatment F 1.147 ; p= 0.1838 ; ns
sFig. 8A Distance travelled in the entire compartment at P15 in three	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13	ANOVA Interaction F 0.9559 ; p= 0.5032 ; ns Time F 1.036 ; p= 0.4752 ; ns Treatment F 0.3930 ; p= 0.4525 ; ns

consecutive 10-minutes periods		Males Eth = 12	
sFig. 8A Distance travelled in the entire compartment at P15 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] ; p= 0.6181 ; ns
sFig. 8B Distance travelled in the entire compartment at P15 in three consecutive 10-minutes periods in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.5178 ; p= 0.8421 ; ns Time F 0.2977 ; p= 0.9058 ; ns Treatment F 0.0008 ; p= 0.9815 ; ns
sFig. 8B Distance travelled in the entire compartment at P15 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] ; p= 0.9880 ; ns
sFig. 8C Distance travelled in the entire compartment at P15 in three consecutive 10-minutes periods in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 2.556 ; p= 0.3876 ; ns Time F 5.312 ; p= 0.1435 ; ns Treatment F 0.3875 ; p= 0.5911 ; ns
sFig. 8C Distance travelled in the entire compartment at P15 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] ; p= 0.7254 ; ns
sFig. 8D Immobility in the entire compartment at P15 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 0.7857 ; p= 0.5684 ; ns Time F 1.232 ; p= 0.4131 ; ns Treatment F 0.3417 ; p= 0.4836 ; ns
sFig. 8D Immobility in the entire compartment at P15 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p= 0.6407 ; ns
sFig. 8E Immobility in the entire compartment at	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12	ANOVA Interactions F 0.7385 ; p= 0.7819 ; ns Time F 0.1376 ; p= 0.9551 ; ns Treatment F 0.4325 ; p= 0.5925 ; ns

P15 in three consecutive 10-minutes periods in Females		Males NaCl = 13 Males Eth = 12	
sFig. 8E Immobility in the entire compartment at P15 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p= 0.7238 ; ns
sFig. 8F Immobility in the entire compartment at P15 in three consecutive 10-minutes periods in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 2.0 ; p= 0.4775 ; ns Time F 5.456 ; p= 0.1380 ; ns Treatment F 0.2101; p= 0.6932 ; ns
sFig. 8F Immobility in the entire compartment at P15 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p= 0.7942 ; ns
sFig. 8G Time spent in the central zone at P15 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.7809 ; p=0.5334 ; ns Time F 12.02 ; p<0.001*** Treatment F 0.01559 ; p=0.8741 ; ns
sFig. 8G Time spent in the central zone at P15 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p=0.9003 ; ns
sFig. 8H Time spent in the central zone at P15 in three consecutive 10-minutes periods in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 2.331 ; p=0.3926 ; ns Time F 11.46 ; p<0.05* Treatment F 5.116 ; p<0.05*
sFig. 8H Time spent in the central zone at P15 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p=0.0881 ; ns
sFig. 8I Time spent in the central zone at P15 in three	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12	ANOVA Interactions F 2.412 ; p=0.3644 ; ns Time F 14.00 ; p<0.01** Treatment F 1.987 ; p=0.1982 ; ns

consecutive 10-minutes periods in Males		Males NaCl = 13 Males Eth = 12	
sFig. 8I Time spent in the central zone at P15 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p=0.3343 ; ns
sFig. 9A Distance travelled in the entire compartment at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.1131 ; p= 0.9200 ; ns Time F 45.45 ; p<0.0001**** Treatment F 9.742 ; p<0.001*** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.05*
sFig. 9A Distance travelled in the entire compartment at P45 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p<0.05*
sFig. 9B Distance travelled in the entire compartment at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.1656 ; p= 0.8297 ; ns Time F 53.00 ; p<0.0001**** Treatment F 16.29 ; p<0.0001**** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [10;20] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [20;30] p<0.001***
sFig. 9B Distance travelled in the entire compartment at P45 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p<0.001***
sFig. 9C Immobility in the entire compartment at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 0.08662 ; p= 0.9394 ; ns Time F 44.76 ; p<0.0001**** Treatment F 9.509; p<0.001***
sFig. 9C Immobility in the entire compartment at P45 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p<0.05*

sFig. 9D Immobility in the entire compartment at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interaction F 0.2050 ; p= 0.7875 ; ns Time F 54.01 ; p<0.0001**** Treatment F 16.33 ; p<0.0001**** Tukey's P45 NaCl vs P45 Eth [0;10] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [10;20] p<0.01** P45 NaCl vs P45 Eth [20;30] p<0.001***
sFig. 9D Immobility in the entire compartment at P45 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P15 NaCl vs P15 Eth [0;30] p<0.001***
sFig. 9E Time spent in the central zone at P45 in three consecutive 10-minutes periods	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 0.9409 ; p=0.5118 ; ns Time F 0.3515 ; p=0.7781 ; ns Treatment F 0.1230 ; p=0.6755 ; ns
sFig. 9E Time spent in the central zone at P45 over 30 minutes	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p=0.7584 ; ns
sFig. 9F Time spent in the central zone at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Females	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 0.6145 ; p=0.8102 ; ns Time F 3.321 ; p=0.3257 ; ns Treatment F 0.001637 ; p=0.9733 ; ns
sFig. 9F Time spent in the central zone at P45 over 30 minutes in Females	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p=0.9815 ; ns
sFig. 9G Time spent in the central zone at P45 in three consecutive 10-minutes periods in Males	Two way ANOVA Tukey post-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	ANOVA Interactions F 1.335 ; p=0.6192 ; ns Time F 2.766 ; p=0.3730 ; ns Treatment F 0.3924 ; p=0.5959 ; ns
sFig. 9G Time spent in the central zone at P45 over 30 minutes in Males	Unpaired t-test	n = 25 in NaCl ; n = 24 in Eth Females NaCl = 12 Females Eth = 12 Males NaCl = 13 Males Eth = 12	P45 NaCl vs P45 Eth [0;30] p=0.6839 ; ns

Etude 2

Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed fetuses

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]

In press dans *Acta Neuropathologica Communications*

Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF), qui représente la forme la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF), se caractérise par l'existence d'une dysmorphie faciale et constitue la première cause de retard mental acquis. La prise en charge des enfants TCAF s'avère particulièrement délicate en raison de l'éventail de troubles engendrés par l'alcoolisation fœtale : déficits moteurs et cognitifs, troubles de l'apprentissage, de l'attention ou encore de la mémorisation. Diagnostiquée chez l'Homme par imagerie médicale, l'exposition *in utero* à l'alcool provoque des lésions de la substance blanche, indispensable à la conduction nerveuse et la modulation de l'activité neuronale. Les avancées récentes dans le domaine des interactions oligo-vasculaires suggèrent que ces atteintes de la substance blanche pourraient résulter d'un impact direct sur les oligodendrocytes. A partir d'une cohorte de fœtus exposés *in utero* à l'alcool, cette étude a visé à évaluer chez l'Homme l'impact d'une consommation maternelle d'alcool sur le profil développemental de deux marqueurs du lignage oligodendroglial, PDGFRα et Olig2 entre la 15ème et la 37ème semaine de grossesse.

Dans cet article, nous avons mis en évidence que :

- A l'exception du stade le plus précoce, l'exposition prénatale à l'alcool provoque une accumulation des précurseurs oligodendrocytaires (PDGFRα-positifs) au niveau des éminences ganglionnaires et de la plaque corticale
- La densité des cellules Olig2-positives est plus faible au sein du cortex chez les individus exposés *in utero* à l'alcool par rapport aux individus non-exposés

Ces résultats démontrent un fort impact de l'alcoolisation *in utero* sur le lignage oligodendroglial au cours du développement chez l'Homme. Ils renforcent l'hypothèse d'un défaut majeur de génération et de différenciation des oligodendrocytes, pouvant en partie expliquer les atteintes cognitives et comportementales des enfants et des adultes exposés *in utero* à l'alcool.

RESEARCH ARTICLE

Acta Neuropathologica Communications

Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed foetuses

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed foetuses
Article Type:	Research
Funding Information:	
Abstract:	Prenatal alcohol exposure is a major cause of neurobehavioral disabilities. MRI studies in humans have shown that alcohol is associated with white matter microstructural anomalies but these studies focused on myelin abnormalities only after birth. Only one of these studies evaluated oligodendrocyte lineage, but only for a short period during human foetal life. As data are lacking in humans and alcohol is known to impair oligodendrocyte differentiation in rodents, the present study aimed to compare by immunohistochemistry the expression of PDGFR-α and Olig2 in the ganglionic eminences and the frontal cortex of foetuses exposed to alcohol from 15 to 37 weeks' gestation with that of age-matched controls. Before birth, PDGFR-α expression was strongly increased in the ganglionic eminences and the cortex of all foetuses exposed to alcohol except at the earliest stage. No massive generation of Olig2 immunoreactive cells was identified in the ganglionic eminences until the end of pregnancy and the density of Olig2-positive cells within the cortex was consistently lower in foetuses exposed to alcohol than in controls. This study provides further evidence of major oligodendrocyte lineage impairment at all stages of brain development upon prenatal alcohol exposure including defective or delayed generation and maturation of oligodendrocyte precursors.
Corresponding Author:	Florent Marguet, MD Department of Pathology, Rouen University Hospital Rouen Cedex, FRANCE
Corresponding Author E-Mail:	florent.marguet@hotmail.fr
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Department of Pathology, Rouen University Hospital
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Florent Marguet, MD PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Florent Marguet, MD PhD
	Mélanie Brosolo
	Gaëlle Friocourt
	Fanny Sauvestre
	Pascale Marcorelles
	Céline Lesueur
	Stéphane Marret
	Bruno J Gonzalez
	Annie Laquerrière
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	Catherine Creeley State University of New York at Fredonia creeley@fredonia.edu

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Specialized in neuroanatomy and preclinical and clinical research on the effects of drug exposure on the developing fetal/neonatal brain.
	Lee Anna Cunningham University of New Mexico Health Sciences Center leeanna@salud.unm.edu Has published two majors papers about the subject in mouse model of fetal alcohol spectrum disorder
	Marianna Bugiani Amsterdam UMC Vrije Universiteit Amsterdam Neuroscience m.bugiani@amsterdamumc.nl Neuropathologist, expert in white matter dieases
Additional Information:	
Question	**Response**
Is this study a clinical trial?<hr>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.	No

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Click here to access/download;Manuscript;article def 26 01 22.doc

Click here to view linked References

Title

Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed foetuses

Authors

Florent Marguet [(1)], Mélanie Brosolo [(2)], Gaëlle Friocourt [(3)], Fanny Sauvestre [(4)], Pascale Marcorelles [(5)], Céline Lesueur [(2)], Stéphane Marret [(6)], 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)] Inserm UMR1078, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé; Etablissement Français du Sang (EFS) Bretagne; Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU Brest, Hôpital Morvan, Brest, France.

[(4)] Department of Pathology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.

[(5)] 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.

[(6)] 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

Dr Florent Marguet

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: florent.marguet@hotmail.fr

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

Running title: Foetal Alcohol Syndrome and Oligodendrocyte lineage

Abstract word count: 200 words

Number of figures and tables: 4 figures and 3 tables

1 supplementary figure

Abstract

Prenatal alcohol exposure is a major cause of neurobehavioral disabilities. MRI studies in humans have shown that alcohol is associated with white matter microstructural anomalies but these studies focused on myelin abnormalities only after birth. Only one of these studies evaluated oligodendrocyte lineage, but only for a short period during human foetal life. As data are lacking in humans and alcohol is known to impair oligodendrocyte differentiation in rodents, the present study aimed to compare by immunohistochemistry the expression of PDGFR-α and Olig2 in the ganglionic eminences and the frontal cortex of foetuses exposed to alcohol from 15 to 37 weeks' gestation with that of age-matched controls. Before birth, PDGFR-α expression was strongly increased in the ganglionic eminences and the cortex of all foetuses exposed to alcohol except at the earliest stage. No massive generation of Olig2 immunoreactive cells was identified in the ganglionic eminences until the end of pregnancy and the density of Olig2-positive cells within the cortex was consistently lower in foetuses exposed to alcohol than in controls. This study provides further evidence of major oligodendrocyte lineage impairment at all stages of brain development upon prenatal alcohol 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 [43]. The diagnosis of Foetal Alcohol Syndrome (FAS), the most severe form of foetal alcohol spectrum disorders (FASD), is based on three characteristics including *in utero* growth retardation (IUGR), 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 [41].

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 rodents and in humans 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 [25, 26, 31, 32, 34]. Microstructural abnormalities as assessed by fractional anisotropy occur throughout the corpus callosum and have been correlated with impaired cognition [49]. A few years ago, it has been suggested in one MRI study that PAE is associated with reduced white matter microstructural integrity from the neonatal period [10]. Whereas all these studies 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 except for one study concerning cases restricted to a short foetal period (12.2 to 21.4 weeks of gestation) [9]. As imaging studies indicate widespread white matter fibre tract anomalies in children and adults with FASD, it has been emphasized that PAE likely impacts on the programming of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) [18, 48]. In the CNS, myelin is formed by processes emanating from OLs which are engaged or are preparing to engage in myelination [7, 39]. 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 pregnancy, this process takes place mainly during the first 30 years of postnatal life in humans [4, 25, 50].

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 [7, 13]. Proliferating neural stem cells commit to the OL lineage under the influence of the transcription factors Olig1, Olig2, Nkx2.2, and Sox10 [13, 47]. *In vitro* studies have also revealed a primary role of Sonic Hedgehog (Shh) signalling by promoting expansion and specification of pluripotent progenitors into Olig2-positive late OPCs and immature OLs [35].

In rodents, the first wave of OPCs originates in the anterior entopeduncular area followed by two other waves arising from the lateral and caudal ganglionic eminences (LGE and CGE) [24]. 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 ab-luminal endothelial surface of blood vessels, *via* Wnt-Cxcr4 (chemokine receptor 4) allowing them to crawl along and jump between vessels [45].

PDGF signalling is essential for controlling the proliferation and differentiation of OPCs [5] 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 foetuses 10 weeks of gestation (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 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 [37]. PDGFR-α is rapidly downregulated when OPCs differentiate into non proliferating OLs, contrary to oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (Olig2) which is expressed in OPCs, pre-OLs and OLs, knowing that increase in OL number during development depends on OPC proliferative capacities [11, 42]. OL lineage progression in cerebral white matter occurs similarly in humans and in rodents, being mostly composed of pre-OLs around 18–27 weeks of gestation in humans and of increasingly abundant MBP-positive cells in full-term infants [3].

Human antenatal data concerning the generation and differentiation of OLs upon PAE are lacking even though alcohol is known to impair OL differentiation. Therefore, the aim of the present study was to compare immunohistochemical techniques PDGFR-α and Olig2 expression in the GE and CP of foetuses with PAE by comparison with age-matched controls. The objective was to confirm the pre-existing results in humans and to provide information regarding oligodendroglial lineage development over an extended neurodevelopmental period.

Patients and methods

Patients

As previously reported [28], 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). In each case, the parents gave their informed written consent for neuropathological studies. Autopsies were carried out in accordance with our local ethic committee and the French law.

Ten foetal control brains ranging from 16 to 36 WG were selected. Main clinical and morphological characteristics are presented in Table 1. 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* foetal death (IUFD), 2 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 foetal 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 foetal FAS or FASD brains ranging from 15 to 37 WG whose clinical and morphological characteristics are presented in Table 2 were also studied. Causes of death were IUFD in 6 cases, TOP for foetal malformations in 7 cases and post-natal early death in the remaining case.

Methods

Autopsies had been performed according to standardized protocols [20]. Developmental age was evaluated by means of organ weights [17], 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 [16]. Macroscopic analysis of gyration was assessed by means of the atlas of Feess-Higgins and Larroche [14]. After fixation into a zinc-10% formalin buffer solution for at least one month, brain sections were obtained from all cortical areas and deep subcortical structures. Seven-micrometer paraffin embedded sections were stained using Haematoxylin-Eosin. The morphology of the different brain structures analysed was consistent with the foetal age.

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 Olig2-positive populations, double immunolabelling was performed using Olig2 and either PDGFR-α, GABA, MAP2 or GFAP within the GE at 15-16 WG, a developmental stage in which some Olig2 positive cells could belong to other lineages than OL. Fluorescent-conjugated antibodies Alexafluor-488 and -592 were obtained from Molecular Probes (Eurogene, Or, USA). Coverslips were mounted in DAPI-containing Vectashield (Vector laboratories, Cambridgeshire, UK). Images were acquired with the Leica laser scanning confocal microscope TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Results

FAS Patient's clinical and morphological characteristics

Among the 14 cases exposed to alcohol, 3 (21%) had intra uterine growth retardation (IUGR). All but 2 cases (86%) had cranio-facial dysmorphism which was characteristic of FAS in half of these cases [40]. Five cases (36%) had microcephaly with a brain weight $\leq 3^{rd}$ percentile. Nine cases (57%) had other CNS anomalies already described in FAS and FASD patients, such as myelomeningocele, arhinencephaly, polymicrogyria, neuronal heterotopias and cerebellar anomalies (see Table 2). Clastic lesions were observed in 5 cases (36%) and. five other cases had associated visceral anomalies (anterior coelosomia, hydronephrosis, unilateral pelvic dilatation and tetralogy of Fallot).

In 7 cases, daily chronic alcohol intake was self-reported by the mother (50%) and 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. [40]. Ten mothers (71%) had co-morbidities notably multidrug addiction, antiepileptic drugs and psychotic traits. Among the 7 seven cases in which alcohol intake was suspected, 6 cases had FAS craniofacial dysmorphism. Microcephaly was present in 3 cases, and other CNS lesions in 5 cases. Two cases had IUGR.

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 summarised 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 (Fig. 1a and 1b). Indeed, at 15-16 WG, PDGFR-α expression remained

lower in the medial ganglionic eminences (MGE), LGE and CP of FASD brains contrary to controls (Fig. 2a-2d) in which more than 60% of cells were observed. From 20 WG, PDGFR-α cell numbers were higher than in controls in all structures studied (Fig. 2e-2l).

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 less numerous in the FASD brain (Fig. 3a and 3b). Moreover, Olig2 immunoreactivity was essentially identified in the MGE of the FASD brain and not yet in the LGE. From 22 WG, Olig2-positive cell density was drastically reduced in the GE of FASD brains (Fig. 3c-3f), and remained low until the regression of GE that normally 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 (Fig. 1c, 3g and 3h), 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 (Fig. 1d and Fig. 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 (Fig. 4a and 4b).

Confocal analyses

At early stages, a diffuse and intense immunolabelling of cells with Olig2 antibody was identified. As Olig2 is known to be also expressed in immature neurons and interneurons as well as in a subpopulation of astrocytes, we performed double immunolabellings using Olig2 and either MAP2, GABA, GFAP or PDGFR-α to evaluate more precisely the percentage of Olig2-positive OPCs [22, 23, 30]. No co-expression of Olig2 with MAP2, GABA, GFAP or PDGFR-α within the GE and CP was observed (supplementary Fig. 1).

Discussion

In living individuals with FASD, imaging studies have revealed lower white matter volumes and sometimes a complete lack of myelination of major white matter tracts in the brain as well as white matter microstructure alterations [39, 48]. 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 pro-inflammatory cytokines than mature OLs [2, 39]. 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 [6].

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 ventricular zone/subventricular zone (VZ/SVZ) by interfering with the cell cycle at G1-S transition from early development [38]. It might therefore be suggested that a similar mechanism occurs in the LGE and CGE, which could explain defective or delayed production of OPCs during foetal life. Finally, only one study by Darbinian et al. has been published concerning oligodendroglial lineage generation and differentiation in FAS human brains over the period covering the second trimester of pregnancy, from 12.2 to 21.4 WG [9]. By means of mRNA and flow cytometry analyses, these authors showed that ethanol (EtOH) exposure was associated with an increased proportion of cells that express protein markers for early OL progenitors and with a reduced proportion of cells expressing mature OL markers. Nevertheless, the use of brain homogenates in this study did not make it possible to determine in which specific regions oligodendrocyte production was affected, i.e., CP and/or GE. The

present study shows not only that oligodendrocyte production is delayed in the GE but also that the proportion of cells expressing maturing OL markers is reduced in FAS brains later in development, supporting the hypothesis that this defect in differentiation persists at least until birth. Such alterations could be partly explained by an enhanced apoptosis as caspase-3 activation has been shown to be substantially increased in EtOH exposed human foetuses [9]. During rodent brain development, alcohol has also been shown to impair astrocyte and oligodendrocyte differentiation and to increase apoptosis [51]. Furthermore, a study performed in foetal macaque brains exposed to alcohol has shown that the decrease in OLs observed in comparison with control brains was linked to massive apoptosis, a single *in utero* alcohol exposure triggering widespread acute apoptotic death of OLs throughout white matter regions at a rate higher than 12 times compared to the physiological OL apoptosis rate [7]. This study also highlighted the fact that OLs 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, a fact we could not confirm in our human cohort, as myelination starts from birth only [7]. 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, which was also observed by Darbinian et al [9]. Epigenetic mechanisms could play an additional role in cell fate specification of brain precursor cells as alcohol is known to induce oxidative stress that alters gene expression, in particular Shh, which promotes expansion and specification of multipotent progenitors into OPCs and immature OLs [12, 35]. Upon alcohol exposure, several other signalling pathways through which alcohol may directly disrupt OPC differentiation and survival have also been implicated, such as PDGFRα, Wnt3a and Wnt5a, which regulate OL cell fate specification, differentiation and proliferation [21, 27, 46]. The increase in PDGFR-α positive OPCs observed in our study could therefore be 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 [7, 8, 52], very little is known about the deleterious effects of alcohol on OL lineage derived from distinct telencephalic germinal zones [15, 18]. In 2017, 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 SVZ were numerically affected, indicating ontogenetic heterogeneity in susceptibility to alcohol [33]. 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 [18, 32, 36]. 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 grey matter myelin in the cortex forms on the axons of local inhibitory interneurons in both rodents and humans [29, 44]. 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 [19, 53].

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 [30]. In humans, Olig2 has been mainly detected in the proliferative zones of the ganglionic eminences between 5–15 post-conceptional 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, 23]. Using immunohistochemistry on 8–12 post-conceptional week human sections, Olig2 immunoreactivity has been shown to be expressed in GABAergic cells of the proliferative zones of the MGE and septum [1]. In the present study, the detection of more than 60% of Olig2 immunoreactive cells at the earliest stage could correspond to OPCs admixed with other nerve cell populations. Confocal studies together with quantitative analyses allowed us to show that Olig2 was specifically expressed in maturing OL from an early developmental stage and was not co-expressed with MAP2, GABA, GFAP or PDGFR-α.

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 is very likely responsible for inadequate establishment of neuronal networks and inefficient conduction of neuronal signals. Disruption of oligodendrocyte generation and differentiation, together with GABA interneuronopathy that we previously identified [28], most likely contribute to developmental encephalopathy and subsequent life-long neuro-behavioural disabilities.

Abbreviations

CGE: Caudal Ganglionic Eminence

CNS: Central Nervous System

CP: Cortical Plate

DTI: Diffusion Tensor Imaging

FAS: Foetal Alcohol Syndrome

FASD: Foetal Alcohol Spectrum Disorder

GE: Ganglionic Eminences

IUFD: *In Utero* Foetal Death

IUGR: Intra Uterine Growth Retardation

LGE: Lateral Ganglionic Eminences

MBP: Myelin Basic Protein

MGE: Medial Ganglionic Eminence

OLs: Oligodendrocytes

Olig2: Oligodendrocyte lineage transcription factor 2

OPCs: Oligodendrocyte Precursor Cells

PAE: Prenatal Alcohol Exposure

PDGFRα: Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha

Pre-OL: Pre-Oligodendrocyte

Shh: Sonic Hedgehog

SVZ: Subventricular Zone

TOP: Termination of Pregnancy

VZ: Ventricular Zone

WG: Weeks 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 Rouen University Hospital, 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 MB performed immunohistochemical and confocal analyses and FM and AL analyzed the results. FM, GF and AL wrote the manuscript. BG, GF 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.

References

1- Alzu'bi A, Lindsay S, Kerwin J, Looi SJ, Khalil F, Clowry GJ (2017) Distinct cortical and sub-cortical neurogenic domains for GABAergic interneuron precursor transcription factors NKX2.1, OLIG2 and COUP-TFII in early Foetal human telencephalon. Brain structure & function 222(5): 2309–2328

2- Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ (1998) Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. J Neurosci 18(16):6241-53.

3- Barateiro A, Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. Biochim Biophys Acta 1843(9):1917-29

4- Bartzokis G, Lu PH, Heydari P, Couvrette A, Lee GJ, Kalashyan G, et al (2012) Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. Biol Psychiatry 72(12):1026-34

5- Collarini EJ, Pringle N, Mudhar H, Stevens G, Kuhn R, Monuki ES, et al (1991) Growth factors and transcription factors in oligodendrocyte development. J Cell Sci Suppl 15:117-23

6- Coutts DJ, Harrison NL (2015) Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. Alcohol Clin Exp Res 39(3):455-62

7- Creeley CE, Dikranian KT, Johnson SA, Farber NB, Olney JW (2013) Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the Foetal macaque brain. Acta Neuropathol Commun 1:23

8- Dalitz P, Cock M, Harding R, Rees S (2008) Injurious effects of acute ethanol exposure during late gestation on developing white matter in Foetal sheep. Int J Dev Neurosci 26(5):391-9

18

9- Darbinian N, Darbinyan A, Merabova N, Bajwa A, Tatevosian G, Martirosyan D, et al (2021) Ethanol-mediated alterations in oligodendrocyte differentiation in the developing brain. Neurobiol Dis 148:105181

10- Donald KA, Roos A, Fouche JP, Koen N, Howells FM, Woods RP, et al (2015) A study of the effects of prenatal alcohol exposure on white matter microstructural integrity at birth. Acta Neuropsychiatr 27(4):197-205

11- Egawa N, Shindo A, Hikawa R, Kinoshita H, Liang AC, Itoh K, et al (2019) Differential roles of epigenetic regulators in the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. Glia 67(4):718-728

12- Ehrhart F, Roozen S, Verbeek J, Koek G, Kok G, van Kranen H, et al (2019) Review and gap analysis: molecular pathways leading to Foetal alcohol spectrum disorders. Mol Psychiatry 24(1):10-17

13- Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. Science 330(6005):779-82

14- Feess-Higgins A, Larroche JC (1987) Development of the human Foetal brain. (Masson, ed) Paris, INSERM CNRS

15- Guerri C, Pascual M, Renau-Piqueras J (2001) Glia and Foetal alcohol syndrome. Neurotoxicology 22:593–9

16- Guihard-Costa AM, Larroche JC (1990) Differential growth between the Foetal brain and its infratentorial part. Early Hum Dev 23:27–40

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

18- Guizzetti M, Zhang X, Goeke C, Gavin DP (2014) Glia and neurodevelopment: focus on Foetal alcohol spectrum disorders. Front Pediatr 2:123

19- Hamilton NB, Clarke LE, Arancibia-Carcamo IL, Kougioumtzidou E, Matthey M, Káradóttir R, et al (2017) Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. Glia 65(2):309-321

20- Haute Autorité de santé. Standard protocol for Foetal or perinatal autopsy (2014) Ann Pathol 34(6):415-33

21- Ille F, Sommer L (2005) Wnt signaling: multiple functions in neural development. Cell Mol Life Sci 62(10):1100-8

22- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009) Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human Foetal brain. Front Neuroanat 1;3:5

23- Jakovceski I, Zecevic N (2005) Olig transcription factors are expressed in oligodendrocytes and neuronal cells in the human Foetal CNS. J Neurosci 25:10064–10073

24- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. Nat Neurosci 9(2):173-9

25- Lebel C, Rasmussen C, Wyper K, Walker L, Andrew G, Yager J, et al (2008) Brain diffusion abnormalities in children with Foetal alcohol spectrum disorder. Alcohol Clin Exp Res 32(10):1732-40

26- Lebel C, Roussotte F, Sowell ER (2011) Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. Neuropsychology Review 21:102–118

27- Luo J, Miller MW (1998) Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. Brain Res Rev 27(2):157-67

28- Marguet F, Friocourt G, Brosolo M, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, et al (2020) Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans. Acta Neuropathol Commun 8(1):208

29- Micheva KD, Wolman D, Mensh BD, Pax E, Buchanan J, Smith SJ, et al (2016) A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. Elife 5:e15784

30- 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

31- Moore EM, Migliorini R, Infante MA, Riley EP (2014) Foetal Alcohol Spectrum Disorders: Recent Neuroimaging Findings. Curr Dev Disord Rep 1(3):161-172

32- Newville J, Howard TA, Chavez GJ, Valenzuela CF, Cunningham LA (2021) Persistent myelin abnormalities in a third trimester-equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. Alcohol Clin Exp Res. doi: 10.1111/acer.14752

33- Newville J, Valenzuela CF, Li L, Jantzie LL, Cunningham LA (2017) Acute oligodendrocyte loss with persistent white matter injury in a third trimester equivalent mouse model of Foetal alcohol spectrum disorder. Glia 65(8):1317-1332

34- Norman AL, Crocker N, Mattson SN, Riley EP (2009) Neuroimaging and Foetal alcohol spectrum disorders. Dev Disabil Res Rev 15(3):209-17

35- Ortega JA, Radonjić NV, Zecevic N (2013) Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. Front Cell Neurosci 7:254

36- Ozer E, Sarioglu S, Güre A (2000) Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. Clin Neuropathol 19(1):21-5

37- 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 116(14):7089-7094

38- Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Henderson GI, Mahimainathan L (2016) Ethanol induces cytostasis of cortical basal progenitors. J Biomed Sci 23:6

39- Rice J, Gu C (2019) Function and mechanism of myelin regulation in alcohol abuse and alcoholism. Bioessays 41(7):e1800255

40- Riley EP, Infante MA, Warren KR (2011) Foetal alcohol spectrum disorders: an overview. Neuropsychol Rev 21(2):73-80

41- Riley EP, McGee CL (2005) Foetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. Exp Biol Med 230(6):357-65

42- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, et al (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. Nat Neurosci 11(12):1392-401

43- Roozen S, Peters GY, Kok G, Townend D, Nijhuis J, Koek G, et al (2018) Systematic literature review on which maternal alcohol behaviours are related to Foetal alcohol spectrum disorders (FASD). BMJ Open 8(12):e022578

44- Stedehouder J, Couey JJ, Brizee D, Hosseini B, Slotman JA, Dirven CMF, et al (2017) Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. Cereb Cortex 27(10):5001-5013

45- Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, et al (2016) Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. Science 351(6271):379-84

46- Vangipuram SD, Lyman WD (2012) Ethanol affects differentiation-related pathways and suppresses Wnt signaling protein expression in human neural stem cells. Alcohol Clin Exp Res 36(5):788-97

47- van Tilborg E, de Theije CGM, van Hal M, Wagenaar N, de Vries LS, Benders MJ, et al (2018) Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. Glia 66(2):221-238

48- Wilhelm CJ, Guizzetti M (2016) Foetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. Front Integr Neurosci 9:65

49- Wozniak JR, Muetzel RL, Mueller BA, McGee CL, Freerks MA, Ward EE, et al (2009) Microstructural corpus callosum anomalies in children with prenatal alcohol exposure: an extension of previous diffusion tensor imaging findings. Alcohol Clin Exp Res 33(10):1825-35.

50- Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, Attwell D, et al (2013) Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. Neuron 77(5):873-85

51- Young C, Roth KA, Klocke BJ, West T, Holtzman DM, Labruyere J, et al (2005) Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. Neurobiol Dis 20(2):608-14

52- Zoeller RT, Butnariu OV, Fletcher DL, Riley EP (1994) Limited postnatal ethanol exposure permanently alters the expression of mRNAS encoding myelin basic protein and myelin-associated glycoprotein in cerebellum. Alcohol Clin Exp Res 18(4):909-16

53- Zonouzi M, Scafidi J, Li P, McEllin B, Edwards J, Dupree JL, et al (2015) GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. Nat Neurosci 18(5):674-82

Figure legends

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

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 (**a**), as well as in the cortical plate of all FASD brains compared to control brains from 20 WG which persisted until 37 WG (**b**). Semi-quantitative evaluation of Olig2-expressing OPCs and pre-OLs 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 FASD brains though the number of OPCs and pre-OLs remained low until regression of GE by 34 WG by comparison with control brains (**c**). 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 (**d**).

Dotted blue line: 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 FASD and control brains**

Lower densities of PDGFR-α expressing OPCs in the GE of FASD brain at 15 WG by comparison with the control aged 16 WG in which most of the cells were immunolabelled (OM X20) (**a, b**), with a similar pattern observed in the CP of FASD and control brain (**c, d**). But from 20 WG, higher densities of PDGFR-α expressing OPCs in the GE of FASD brains compared with control brains (OM X20) (**e, f**), as observed in the CP (**g, h**), with the same pattern found at 30 WG in the GE (OM X20) (**i, j**) and in the CP (**k, l**).

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

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

Lower densities of Olig2 expressing cells in the GE of FASD brain at 15 WG by comparison with the GE of control brain at 16 WG in which more than 50% of Olig2 positive cells were observed (**a, b**) the most striking differences between FASD and control GE being observed at 22 WG (**c, d**). Similar differences, though less pronounced, were also noted at 24 WG in the FASD brain (case 5) compared to the control (**e, f**) contrary to what was noted in the FASD

brain (case 6), in which an intense immunoreactivity was observed arguing for a delayed production/differentiation starting from this term (**g, h**).

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

Significantly lower densities of Olig2-positive cells in FASD brains compared to control brains at 15-16 WG (OM X10) (**a, b**) with a similar pattern observed at 20 WG (OM X10) (**c, d**). 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) (**e, f**) with an increase in density in the superficial layers at 33 WG in the control cortical plate only (OM X20) (**g, h**).

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

Supplementary Figure 1: Confocal analyses in the GE of a normal brain at 16 WG

Double immunolabellings using Olig2 (red) and MAP2 (green) (**a**), Olig2 (red) and GFAP (green) (**b**), Olig2 (red) and GABA (green) (**c**) and using Olig2 (red) and PDGFR-α (green) (**d**) did not reveal any co-expression with neurons, interneurons, astrocytes and oligodendroglial precursor markers.

Table 1 Click here to access/download;Table;Table 1.pdf

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 microphtalmia
6	28 WG	28 WG	Yes	Severe distal arthrogryposis
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 [17].

Click here to access/download;Table;Table 2.pdf

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

8	27	Preeclampsia Death at D10	10th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	3rd percentile 109 g	No	Microcephaly Massive cerebellar haemorraghe	Alcohol intake**	ND
9	29	IUFD cardiopathy	5th percentile	Anteversed nostrils and pointed nose Ear anomalies Indistinct philtrum Retrognathism	5th percentile 178 g	Tetralogy of Fallot	No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased MGV and GGT
10	30	IUFD Abruptio placentae	10th percentile	No	50th percentile 211 g	No	Bilateral intraventricular haemorrhage	Daily chronic alcohol intake*	Cannabis addiction Treated hypothyroidism
11	31	IUFD Preeclampsia	3rd percentile IUGR	Ear anomalies Retrognathism	3rd percentile 197.05 g	No	No	Daily chronic alcohol intake* (ND)	Increased MGV and GGT
12	31	TOP Septal agenesis	50th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	50th percentile 234 g	No	Septal agenesis	Chronic and Binge drinking*	Cannabis
13	33	IUFD Acute alcohol intoxication (maternal distress)	50th percentile	No	50th percentile 348.15 g	Amniotic fluid inhalation	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.
14	37	IUFD	25th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	<3rd 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 Click here to access/download;Table;Table 3.pdf

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

Click here to access/download;Figure;renamed_8d431.jpg

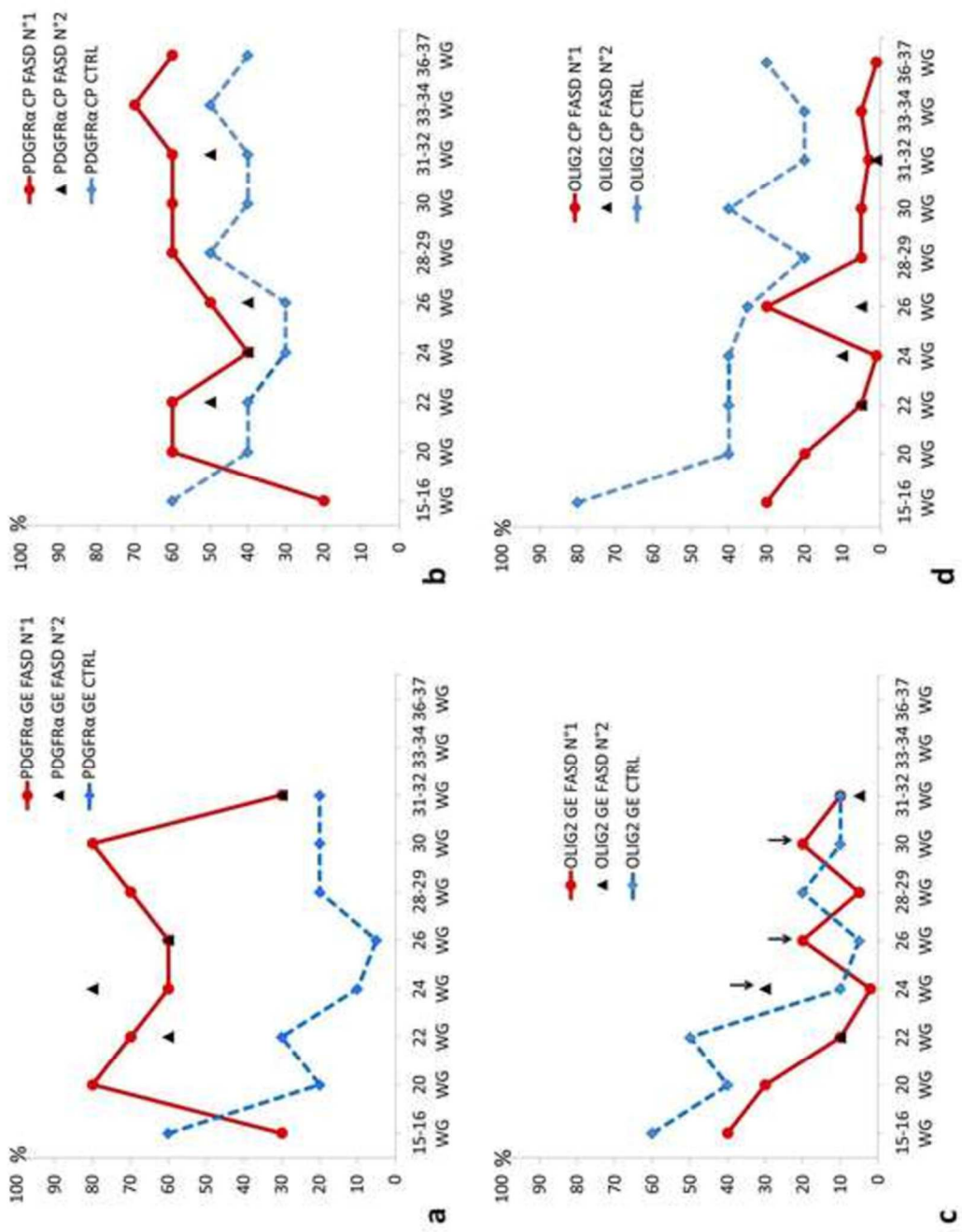


Figure 1

Click here to access/download;Figure;renamed_ef32d.jpg

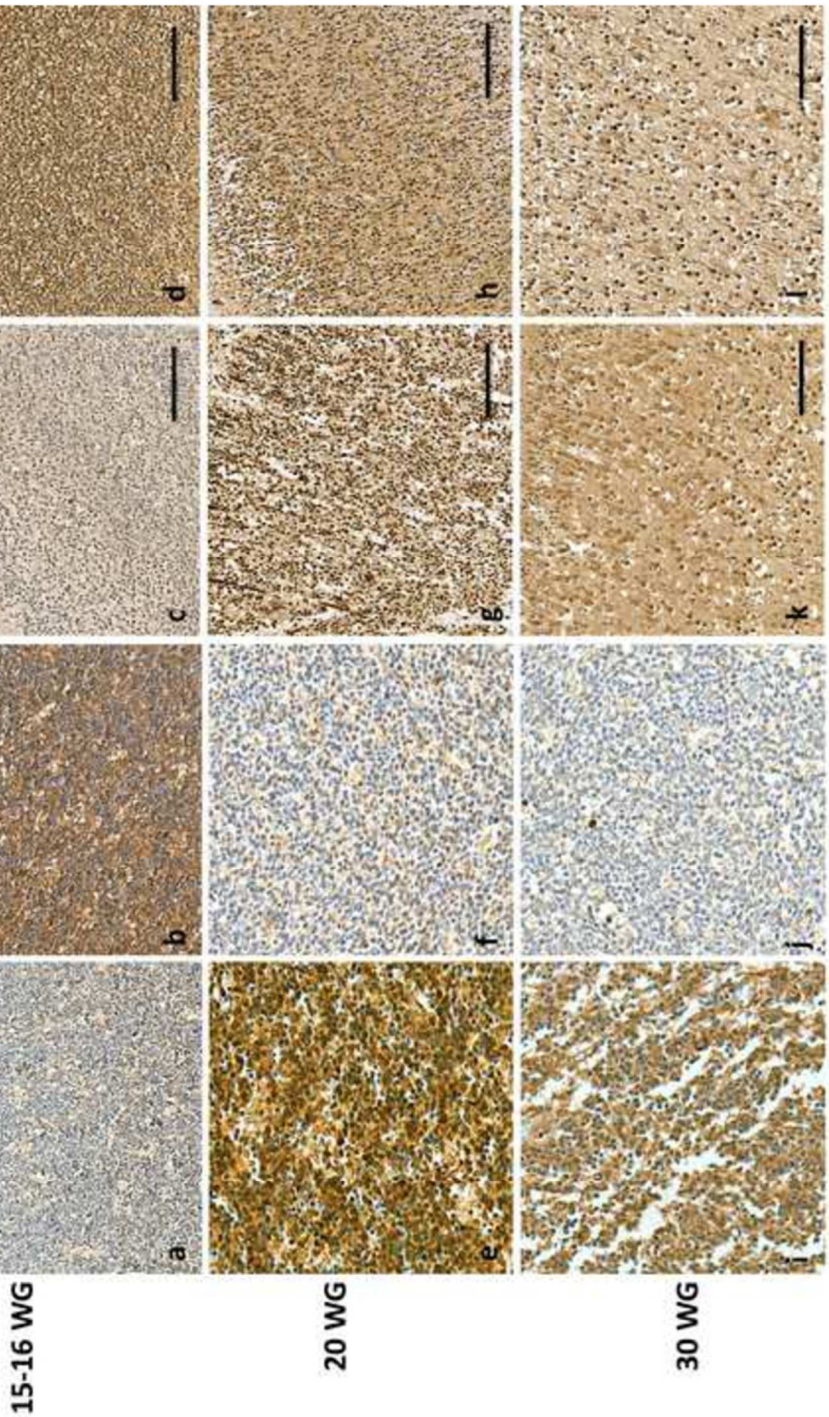


Figure 2

Figure 3

Click here to access/download;Figure;renamed_97773.jpg

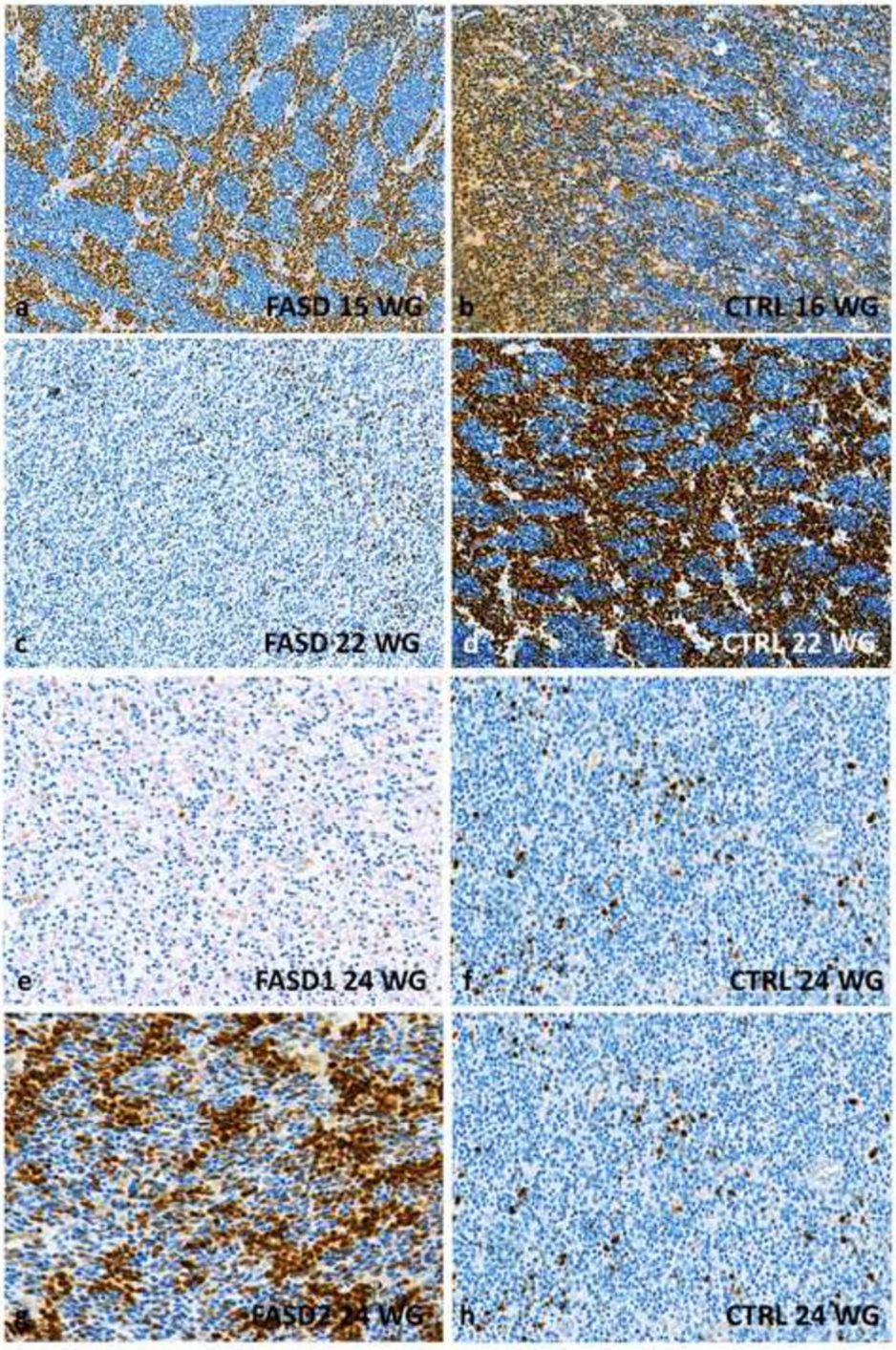
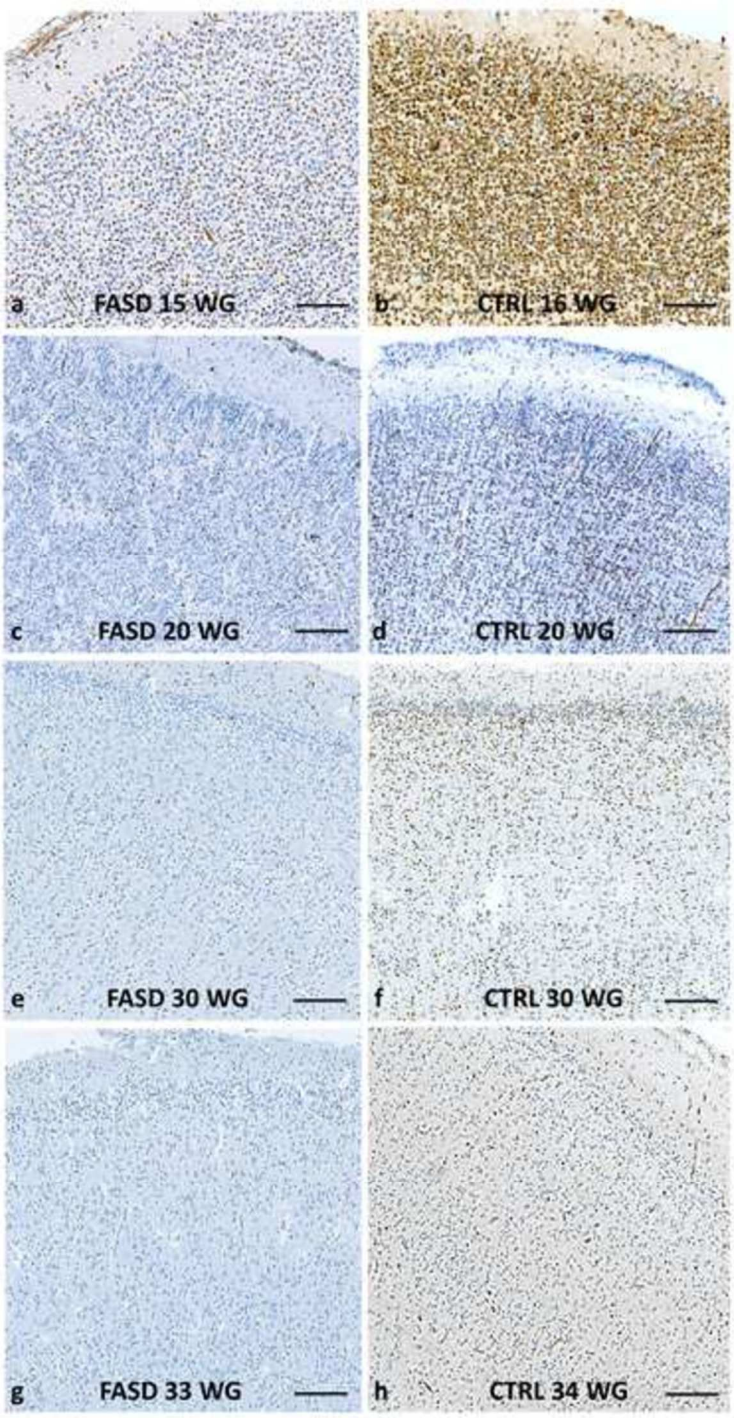


Figure 4

Click here to access/download;Figure;renamed_21ce7.jpg



Chapitre 5

Discussion & perspectives

Malgré de nombreuses politiques de prévention, les dernières données épidémiologiques soulignent encore une forte prévalence de la consommation d'alcool au cours de la grossesse **[210]**. En Europe, 1 femme sur 4 consomme de l'alcool pendant sa grossesse, et cette exposition du fœtus à l'alcool constitue une cause majeure de handicap pouvant provoquer un syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF ; **[214]**). Problème de santé publique aux conséquences au long terme pourtant évitable, le SAF représente la forme la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF), et se traduit par un ensemble d'anomalies neurodéveloppementales, associées à l'existence d'une dysmorphie craniofaciale caractéristique qui permet un diagnostic précoce. Cependant, du fait de l'absence d'anomalies faciales, une partie des patients TCAF échappe à un diagnostic précoce **[231]**. Malheureusement, ces derniers ne sont pas exemptés des troubles développementaux qu'engendre une alcoolisation maternelle, se traduisant notamment par des déficits moteurs et cognitifs, des troubles de l'apprentissage, de l'attention et de la mémorisation **[267]** ; **[208]**. Parallèlement, il a été démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool provoquait des modifications structurales de l'encéphale **[235] ; [268]**. Des atteintes de la substance blanche ont notamment été décrites par imagerie médicale chez des individus exposés *in utero* à l'alcool, entraînant une réduction du volume de la substance blanche **[269]**, ou encore des agénésies du corps calleux dans les cas les plus sévères **[235]**. En raison de ces constatations, l'objectif de ma thèse a visé à préciser l'impact de l'alcoolisation fœtale sur la mise en place des oligodendrocytes, acteurs essentiels dans la formation de la substance blanche.

Les vaisseaux corticaux, support de migration des oligodendrocytes

Le positionnement correct des acteurs cellulaires au sein du cerveau étant un prérequis pour le bon fonctionnement de ce dernier, une migration appropriée des précurseurs cellulaires constitue alors un phénomène attendu. Au cours du développement, des voies de migration des cellules nerveuses se mettent en place, la glie radiaire constituant un véritable échafaudage permettant la migration des précurseurs neuronaux **[270]**. L'étroite liaison entre systèmes

---

[208] Chasnoff *et al.*, **2015**.
[210] Popova *et al.*, **2017**.
[214] Baromètre Santé **2017**, Santé Publique France.
[231] Pruett *et al.*, **2013**.
[235] Lebel *et al.*, **2011**.
[267] Germanaud & Toutain, **2017**.
[268] Lebel *et al.*, **2008**.
[269] Donald *et al.*, **2015**.
[270] Saghatelyan *et al.*, **2009**.

nerveux et vasculaire **[127]** a permis de faire émerger le concept d'unité neurovasculaire, soulignant l'interdépendance et la fine communication nécessaire à une mise en place efficace de ces deux systèmes **[129],** qu'il s'agisse de l'encéphale **[271]** ; **[134]**, de la rétine **[272]** ou encore de la moelle épinière **[273]**. Substrat cellulaire contribuant à la mise en place des neuroblastes par la sécrétion d'acteurs moléculaires tels que le BDNF par les cellules endothéliales **[134]**, le réseau vasculaire cérébral est un support physique essentiel de la migration tangentielle des interneurones GABAergiques **[14]**. De façon similaire, les progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs) présentent une étroite interaction avec le système vasculaire au cours du développement cérébral **[23]**. Ce type cellulaire est d'ailleurs caractérisé par la plus longue migration au sein du SNC, les cellules endothéliales favorisant leur prolifération **[59]** ; **[274]**. Parallèlement, les oligodendrocytes favorisent à leur tour un remodelage vasculaire au niveau de la substance blanche **[275]**. A l'instar des interneurones GABAergiques **[14]**, les travaux de Tsai et collaborateurs ont pu mettre en évidence une étroite interaction entre les vaisseaux périventriculaires et les OPCs, ces derniers utilisant les vaisseaux cérébraux comme support de migration tangentielle impliquant la voie de signalisation Wnt **[51]**. Dans notre laboratoire, il a été antérieurement démontré que la consommation d'alcool au cours de la grossesse altère à la fois l'angiogenèse cérébrale **[264]** et l'activité endothéliale **[247]**. Dans le but d'évaluer l'impact de l'alcoolisation fœtale sur les interactions oligo-vasculaires, des immunohistochimies chez le fœtus humain ont été réalisées en ciblant la lignée oligodendrogliale et les vaisseaux. A l'aide du logiciel de modélisation IMARIS, les données de reconstitution 3D ainsi obtenues ont permis de démontrer l'existence d'interactions oligo-vasculaires sur l'ensemble de la plaque corticale.

---

[14] Won *et al.*, **2013**.
[23] Parades *et al.*, **2018**.
[51] Tsai *et al.*, **2016**.
[59] Arai & Lo, **2009**.
[127] Carmeliet & Tessier-Lavigne, **2005**.
[129] Segarra *et al.*, **2019**.
[134] Snapyan *et al.*, **2009**.
[247] Léger *et al.*, **2020a**.
[264] Jégou *et al.*, **20120**.
[271] Parades *et al.*, **2016**.
[272] Usui *et al.*, **2015**.
[273] Du *et al.*, **2016**.
[274] Plane *et al.*, **2010**.
[275] Miyamoto *et al.*, **2014**.

Alcoolisation fœtale et impact sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes

Particulièrement vulnérables au cours de leur développement, tous les types cellulaires cérébraux sont impactés par une exposition *in utero* à l'alcool (**Tableau 4**). Ainsi, l'éthanol affecte de nombreux types cellulaires **[276]** notamment les neurones en grain du cervelet **[277]**, les cellules microgliales, les astrocytes ou encore les oligodendrocytes **[242]**. La vascularisation cérébrale se mettant en place par angiogenèse et plusieurs types de cellules nerveuses migrant le long des microvaisseaux, un consensus scientifique a émergé ces dernières années insistant sur la nécessité d'une angiogenèse cérébrale adéquate pour la mise en place correcte des différentes structures cérébrales. Toutefois, peu d'études se sont intéressées à caractériser l'impact d'une exposition prénatale à l'alcool sur la composante vasculaire.

Alcoolisation *in utero* & impact sur le système nerveux central	**Littérature**
Désorganisation de la substance grise et défaut de migration neuronale	**[231] ; [249]; [247]**
Diminution de la neurogenèse et augmentation de la neurodégénérescence	**[238] ; [239] ; [278]**
Réduction de la population astrocytaire	**[241]; [279] ; [280]**
Réduction de la population microgliale, Activation microgliale	**[240] ; [243] ; [281]**
Désorganisation de la substance blanche	**[231] ; [235] ; [244]**
Altération des processus de prolifération et de différenciation oligodendrocytaire	**[246] ; [245] ; [282]**

Tableau 4 : Travaux de la littérature illustrant les altérations du développement cérébral à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool en clinique et en préclinique.

---

[231] Pruett *et al.*, **2013**.
[235] Lebel *et al.*, **2011**.
[238] Ikonomidou *et al.,* **2000**.
[239] Olney *et al.*, **2002**.
[240] Fernandez-Lizarbe *et al.*, **2009**.
[241] Guerri *et al.*, **2009**.
[242] Wilhelm & Guizzetti, **2016**.
[243] Kane *et al.*, **2011**.
[244] Darbinian *et al.*, **2022**.
[245] Newville *et al.*, **2017**.
[246] Creeley *et al.*, **2013**.
[247] Léger *et al.*, **2020a**.
[249] Marguet *et al.*, **2020**.
[276] Granato & Dering, **2018**.
[277] Kouzoukas *et al.*, **2013**.
[278] Smiley *et al.*, **2015**.
[279] Miller & Roberston, **1993**.
[280] Tomás *et al.*, **2005**.
[281] Wang *et al.*, **2018**.
[282] Darbinian *et al.*, **2021**.

Les travaux de différents groupes ont mis en évidence qu'une exposition à l'alcool inhibe la tubulogenèse et la néovascularisation **[261]**, et entraîne une diminution des processus de cicatrisation des lésions cutanées par défaut de néoangiogenèse **[262]**. Une dérégulation de l'expression a également été retrouvée au niveau endothélial à la suite d'une alcoolisation *in utero.* Ainsi, des études ont mis en évidence un impact de l'alcoolisation sur l'expression des membres de la famille du VEGF **[264] ; [283]**. De cette manière, l'éthanol diminue l'expression du PlGF et de la voie de signalisation associée au récepteur VEGF-R2. De même, il a été montré que l'éthanol activait la protéine LC3II et stimulait l'induction du processus d'autophagie au niveau des microvaisseaux cérébraux **[284]**. Enfin, des travaux réalisés au sein du laboratoire ont également démontré une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux corticaux dans le cerveau de fœtus humains et de souriceaux exposés *in utero* à l'alcool **[264]** ; **[173]**.

Véritable support migratoire pour certaines cellules nerveuses **[14]** ; **[51]**, le système vasculaire, qui débute chez la Souris au 10ème jour embryonnaire, se met en place avant l'émergence des OPCs **[285]**. L'hypothèse d'une altération de l'angiogenèse contribuant à des défauts d'association vasculaire, de migration cellulaire et de positionnement a été émise. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'il a été décrit de longue date que l'alcoolisation *in utero* conduit à des hétérotopies **[286]**. A partir de notre modèle d'alcoolisation maternelle, s'étendant du 15ème au 20ème jour embryonnaire, une évaluation de l'organisation du réseau vasculaire et des interactions oligo-vasculaires a été réalisée à E20, P2 et P15. En effet, à ce jour aucune étude longitudinale n'avait été réalisée. Toutefois, bien que la période d'exposition recouvre en partie la période de migration cellulaire vasculo-associée, les processus migratoires se poursuivent en postnatal que l'on soit chez l'Homme ou chez la Souris **[287]**. En accord avec les précédents travaux du laboratoire **[264]** ; **[173]**, une analyse morphométrique après visualisation par immunohistochimie des vaisseaux corticaux a confirmé une désorganisation vasculaire corticale aux périodes embryonnaire (E20) et périnatale (P2). En revanche, nos

---

[14] Won *et al.*, **2013**.
[51] Tsai *et al.*, **2016**.
[173] Lecuyer *et al.,* **2017**.
[261] Radek *et al.*, **2005**.
[262] Williams *et al.*, **2008**.
[264] Jégou *et al.*, **2012**.
[283] Radek *et al.*, **2008**.
[284] Girault *et al.*, **2017**.
[285] Daneman *et al.*, **2009**.
[286] De La Monte & Kril, **2014**.
[287] Tanaka &Nakajima, **2012**.

résultats montrent que cette perte de l'orientation radiale des microvaisseaux n'est pas retrouvée chez la souris à 15 jours de vie postnatal (P15). Cette récupération d'un profil vasculaire normal pourrait s'expliquer par le fait, qu'après la naissance, l'angiogenèse corticale se poursuit pendant plusieurs semaines alors que l'exposition à l'alcool a cessé au moment de la naissance **[288]**. Il pourrait donc y avoir une compensation progressive des défauts d'angiogenèse. Dès lors, pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de caractériser les effets de l'alcoolisation sur une période couvrant l'ensemble de la période d'angiogenèse corticale. Un tel modèle d'exposition, correspondant au 3ème trimestre de grossesse chez la femme enceinte **[289]**, a d'ailleurs été utilisé à l'aide de vapeurs d'alcool en période postnatale et a permis de mettre en évidence des déficits comportementaux **[290]** ainsi que des modifications de la vascularisation du cervelet chez le Rat **[291].**

Contrairement à l'organisation corticale des microvaisseaux, la densité des cellules Olig2-positives associées aux microvaisseaux n'est pas impactée par l'exposition *in utero* à l'alcool. D'autres études scientifiques ont cependant rapporté une mort apoptotique des oligodendrocytes **[246]** ainsi qu'une accumulation des OPCs **[292]** à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool. Plusieurs hypothèses peuvent permettent de discuter ces différents résultats. Tout d'abord, les travaux de Creeley **[246]** ont montré l'induction de l'apoptose une heure après l'alcoolisation mais il n'a pas été déterminé l'impact de cette perte cellulaire sur l'ensemble de la population oligodendrogliale à plus long terme. D'autre part, les travaux de Marguet **[292]** plaident pour un éventuel défaut ou retard de maturation oligodendrocytaire, un point qui sera discuté plus loin dans ce chapitre. Enfin, il faut également rappeler la grande diversité des protocoles d'alcoolisation (alcoolisation chronique, aigue, anténatale, postnatale…) qui ont pour but de cibler différentes phases du neurodéveloppement **[289]**.

Nos résultats indiquent que l'association des cellules Olig2-positives avec les microvaisseaux corticaux n'est pas impactée par une exposition *in utero* à l'alcool, et ceci quel que soit le stade de développement étudié. Ainsi, si les vaisseaux corticaux sont désorganisés en période embryonnaire et périnatale, et que les oligodendrocytes restent associés, alors un impact de l'alcoolisation *in utero* sur le positionnement des oligodendrocytes est

---

[246] Creeley *et al.*, **2013**.
[288] Harb *et al.*, **2013**.
[289] Almeida *et al.*, **2020**.
[290] Xu *et al.*, **2018**.
[291] Kelly *et al.*, **1990**.
[292] Marguet *et al.*, ***In press***.

envisageable. Afin d'évaluer la distribution des cellules Olig2-positives au sein des couches corticales, la proportion de cellules Olig2-positives présentes au sein des couches corticales superficielles (SCL) par rapport aux couches corticales profondes (DCL) a été déterminée. De façon intéressante, le ratio des cellules Olig2-positives SCL/DCL est diminué à la suite d'une exposition *in utero* à l'alcool à P2, soulignant un défaut ou un ralentissement de positionnement cortical des cellules Olig2-positives, ces dernières étant maintenues au niveau des couches corticales profondes. Ces résultats font écho à ceux concernant les interneurones GABAergiques, un autre type cellulaire présentant une migration vasculo-associée **[14]**. En effet, de récentes études réalisées au sein du laboratoire ont mis en évidence des altérations du positionnement des interneurones GABAergiques chez l'Homme et chez la Souris à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool **[247]** ; **[249]**.

Effet de l'alcoolisation fœtale sur la différenciation oligodendrocytaire

Ces dernières décennies, des études d'imagerie cérébrale ont révélé des atteintes de la substance blanche à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool se traduisant notamment par une réduction du volume du corps calleux **[293]** ; **[235]**. D'un point de vue cellulaire, ces anomalies, également retrouvées chez la Souris, ont été directement corrélées à une perte neuronale et oligodendrocytaire. En effet, il a été rapporté qu'une exposition prénatale à l'alcool entraîne une inhibition de la prolifération **[245]** ainsi qu'une augmentation de la mort par apoptose des neurones **[239]** et des oligodendrocytaires **[246]** ; **[294]**. De plus, il a été montré que des expositions tardives et épisodiques de type *binge drinking* entrainaient une réduction de l'expression de marqueurs de myéline tels que la MBP **[295]**. Toutefois, les avancées récentes concernant les interactions oligo-vasculaires **[51]** suggèrent que les anomalies oligodendrocytaires provoquées par l'alcoolisation maternelle pourraient résulter d'un défaut de migration et de maturation comme cela a pu être mis en évidence pour d'autres

---

[14] Won *et al.*, **2013**.
[51] Tsai *et al.*, **2016**.
[235] Lebel *et al.*, **2011**.
[239] Olney *et al.*, **2002**.
[245] Newville *et al.*, **2017**.
[246] Creeley *et al.*, **2013**.
[247] Léger *et al.*, **2020a**.
[249] Marguet *et al.*, **2020**.
[293] Sowell *et al*, **2002**.
[294] Wang *et al*, **2020**.
[295] Rice *et al*, **2019**.

types cellulaires tels que pour les interneurones GABAergiques **[247]** ou encore la maturation des synapses excitatrices **[296]**. Afin d'évaluer l'impact de l'alcoolisation maternelle sur la maturation du lignage oligodendroglial, différents marqueurs spécifiques des stades de différenciation des oligodendrocytes ont été étudiés en période anté-, péri- et postnatale, à partir d'extrait corticaux. Les données obtenues sur l'ARNm par la technique de qRT-PCR n'ont pas révélé de variations significatives sur les différents marqueurs étudiés. En revanche, les données protéiques obtenues par la technique de Western blot ont permis de souligner l'action délétère de l'alcool sur deux marqueurs de maturation oligodendrocytaire, la CNPase et la MBP, ciblant respectivement les oligodendrocytes immatures et matures.

Toutefois, une diminution de l'expression protéique de la CNPase ou de la MBP ne suffit pas à conclure sur un effet de l'alcool en faveur d'un retard ou d'un arrêt de maturation du lignage oligodendroglial. En effet, ces diminutions pourraient refléter l'existence d'une mort apoptotique induite par l'alcool, décrite dans plusieurs études préalables **[245] ; [246] ; [282]**. Afin d'affiner notre réflexion sur l'impact de l'alcoolisation maternelle sur la maturation du lignage oligodendroglial, nous avons entrepris d'étudier la distribution corticale de la CNPase et de la MBP par immunohistochimie couplée à une analyse par *linescan*. Une attention particulière a été portée sur la distribution au sein des différentes couches corticales **[297]**. Les résultats ont montré chez les souris contrôles à P15, qu'il existe un gradient dégressif de l'expression de la MBP depuis la couche corticale VI vers la couche corticale I. En revanche, le profil d'expression de la CNPase est relativement stable entre les couches corticales VI et II. De façon très intéressante, l'analyse par *linescan* révèle que l'exposition prénatale à l'alcool réduit le profil oligodendrocytaire mature (MBP) au niveau de la couche corticale VI mais renforce le profil CNPase dans les couches corticales profondes induisant une inversion des deux profils. Ces résultats plaident en faveur d'un retard de maturation induit par l'alcool qui pourrait s'ajouter à la perte cellulaire décrite dans la littérature. Les données obtenues chez l'Homme viennent étayer ces résultats. Contrairement à nos observations réalisées chez la Souris, les résultats sur prélèvements fœtaux humains montrent une augmentation de la population des précurseurs oligodendrocytaires immunoréactifs pour le PDGFRα.

---

[245] Newville *et al.*, **2017**.
[246] Creeley *et al.*, **2013**.
[247] Léger *et al.*, **2020a**.
[282] Darbinian *et al.*, **2021**.
[296] Kerven *et al.*, **2015**.
[297] Tan *et al.*, **2009**.

Cette différence entre le modèle préclinique et humain pourrait notamment s'expliquer par les modalités d'exposition. En effet, chez l'Homme, l'exposition à l'alcool couvre dans la plupart des cas une plus longue période. De plus, il existe des comorbidités telles que la consommation de tabac, de cannabis et de certains médicaments (anti-dépresseurs, anti-épileptiques), facteurs associés retrouvés chez les mères des fœtus étudiés dans l'étude 2.

Conséquence de l'exposition prénatale à l'alcool sur les processus de myélinisation

Parce qu'il est un acteur essentiel à la myélinisation **[84]**, nos données concernant les effets de l'alcool sur la différenciation de l'oligodendrocyte cortical soulèvent la question d'une altération du processus de myélinisation, qui est indispensable à une propagation correcte de l'influx nerveux et au maintien de l'intégrité neuronale **[97]**.

Les neurones pyramidaux du néocortex émettent des projections myelinisées vers des structures intracorticales inter-hémisphériques et extracorticales **[298]**. Puisqu'il a été montré qu'un SAF sur dix présente une agénésie partielle voire totale du corps calleux **[235]** ; **[244]**, l'impact de l'alcoolisation maternelle sur la myélinisation a été évalué, d'une part, par microscopie électronique au niveau des fibres calleuses et, d'autre part, sur les faisceaux myelinisés du striatum par immunohistochimie. Chez la souris à P15, nos résultats révèlent une diminution de la densité des axones, ce qui serait en accord avec une perte neuronale **[238]** ; **[239]** cependant ils montrent également une diminution importante de l'épaisseur de la gaine de myéline. Au niveau striatal, une augmentation de la densité des faisceaux MBP-positif est retrouvée à la suite d'une alcoolisation fœtale, mais est accompagnée d'une diminution de leur aire globale. Par ailleurs, la distribution des faisceaux MBP-positifs dans le striatum est modifiée en faveur d'une plus forte proportion de petits faisceaux. Compte-tenu de nos résultats sur l'expression de marqueurs de différenciation des oligodendrocytes, l'ensemble de ces résultats suggère que la diminution de l'expression de la MBP quantifiée par Western blot pourrait résulter d'une perte neuronale **[278]** ainsi qu'un défaut de myélinisation dû à une maturation incomplète des oligodendrocytes. Les travaux récents de

---

[84] Fields & Dutta, **2019**.
[97] Philips & Rothstein, **2017**.
[235] Lebel *et al.*, **2011**.
[238] Ikonomidou *et al.*, **2000**.
[239] Olney *et al.*, **2002**.
[244] Darbinian *et al.*, **2022**.
[278] Smiley *et al.*, **2015**.
[298] Usrey & Sherman, **2019**.

Newville et collaborateurs **[299]** viennent étayer cette hypothèse. En utilisant un modèle d'exposition à l'alcool postnatale, ces auteurs ont identifié une modification de l'ultrastructure des axones calleux myélinisés chez l'adulte directement liée à une réduction de l'épaisseur de la gaine de myéline.

Comme chez l'humain, il est établi de longue date qu'une exposition *in utero* à l'alcool est associée à des troubles du comportement **[209]** ; **[215]**. Nous avons donc entrepris une série de tests comportementaux couvrant la période postnatale (test de retournement et de géotaxie négative) et adulte (activité locomotrice). Chez le souriceau, les analyses biochimiques et histologiques concernant notamment l'expression et la distribution de la CNPase et de la MBP sont corréler à l'existence de troubles comportementaux périnataux. Cette conjonction peut être interpréter comme un lien possible entre retard de maturation oligodendrocytaire et atteintes comportementales, un comportement associé à des tremblements importants étant retrouvé chez les souris invalidées pour la MBP **[94]**. Néanmoins, de façon intéressante, les anomalies d'expression de la MBP et de la substance blanche observées au niveau du cortex et du striatum à P15 n'ont pas été retrouvées chez la souris adulte (P45) alors que des altérations du comportement locomoteur sont retrouvées chez l'adulte exposé *in utero* à l'alcool. Ces altérations motrices font directement écho aux nombreux déficits comportementaux observés en clinique, également identifiés en préclinique dans divers modèles animaux d'exposition prénatale à l'alcool **[300]** : mauvaise coordination motrice, déficits d'apprentissage, altérations du comportement social **[301]** ; **[302]** ; **[303]**. Cette inadéquation entre analyse biochimique et comportementale chez l'adulte suggère trois hypothèses : *i)* un processus de compensation moléculaire et histologique a pu se mettre en place, *ii)* si compensation moléculaire il y a eu, alors elle n'a pas suffi à permettre une compensation fonctionnelle, *iii)* les anomalies moléculaires observées au niveau du lignage oligodendroglial ne sont pas en lien avec les troubles comportementaux. Toutefois, l'étude de Newville plaide en défaveur de cette dernière

---

[94] Chernoff *et al.*, **1981**.
[209] Riley *et al.*, **2011**.
[215] Mattson *et al.*, **2017**.
[299] Newville *et al.*, **2022**.
[300] Petrelli *et al.*, **2018**.
[301] Cantacorps *et al.*, **2017**.
[302] Kleiber *et al.*, **2011**.
[303] De Avila *et al.*, **2020**.

hypothèse puisque dans son protocole d'exposition plus tardif que le notre (P3-P15), les même atteintes oligodendrocytaires sont retrouvées bien qu'elles persistent cette fois-ci chez l'adulte, suggérant qu'un processus de compensation n'a pas pu se mettre en place **[299]**. En accord avec ces hypothèses, nos données sur le développement vasculaire au niveau cortical ont permis de mettre en évidence une compensation de l'atteinte vasculaire corticale chez l'adulte. L'angiogenèse corticale et la maturation oligodendrocytaire sont deux processus qui se poursuivent au cours de la vie postnatale **[288]** ; **[32]**. Dans notre protocole, il faut souligner que l'alcool n'est plus présent après la naissance, ce qui implique qu'il faudrait vérifier si une exposition plus longue couvrant l'angiogenèse postnatale puisse avoir des conséquences vasculaires et oligodendrocytaires persistantes.

En conclusion, ces résultats obtenus, pour une part, chez la Souris et, pour une autre, chez l'Homme ont mis en évidence que l'alcoolisation *in utero* (**Figure 32**) :

- Induit une désorganisation périnatale de la microvascularisation corticale
- N'affecte pas l'association vasculaire des précurseurs oligodendrocytaires
- Altère le profil cortical de différenciation des oligodendrocytes
- Est responsable des troubles moteurs durables

Bien que certaines de ces anomalies identifiées au niveau moléculaire et cellulaire soient transitoires dans nos conditions d'exposition, elles sont associées à des atteintes comportementales à court et à long terme qui peuvent être rapprochées de celles décrites en clinique **[220]**. Parmi les perspectives au niveau clinique, il serait intéressant de déterminer si les enfants exposés *in utero* à l'alcool ont des anomalies d'apprentissage de la marche car il a clairement été établi que l'acquisition de la marche était corrélée au processus de myélinisation **[304]**.

---

[32] Baraterio *et al.*, **2016**.
[220] Streissguth *et al.*, **2004**.
[288] Harb *et al.*, **2013**.
[299] Newville *et al.*, **2022**.
[304] Thèse de Nicolas Théveniau, Université de Grenoble, **2013**.

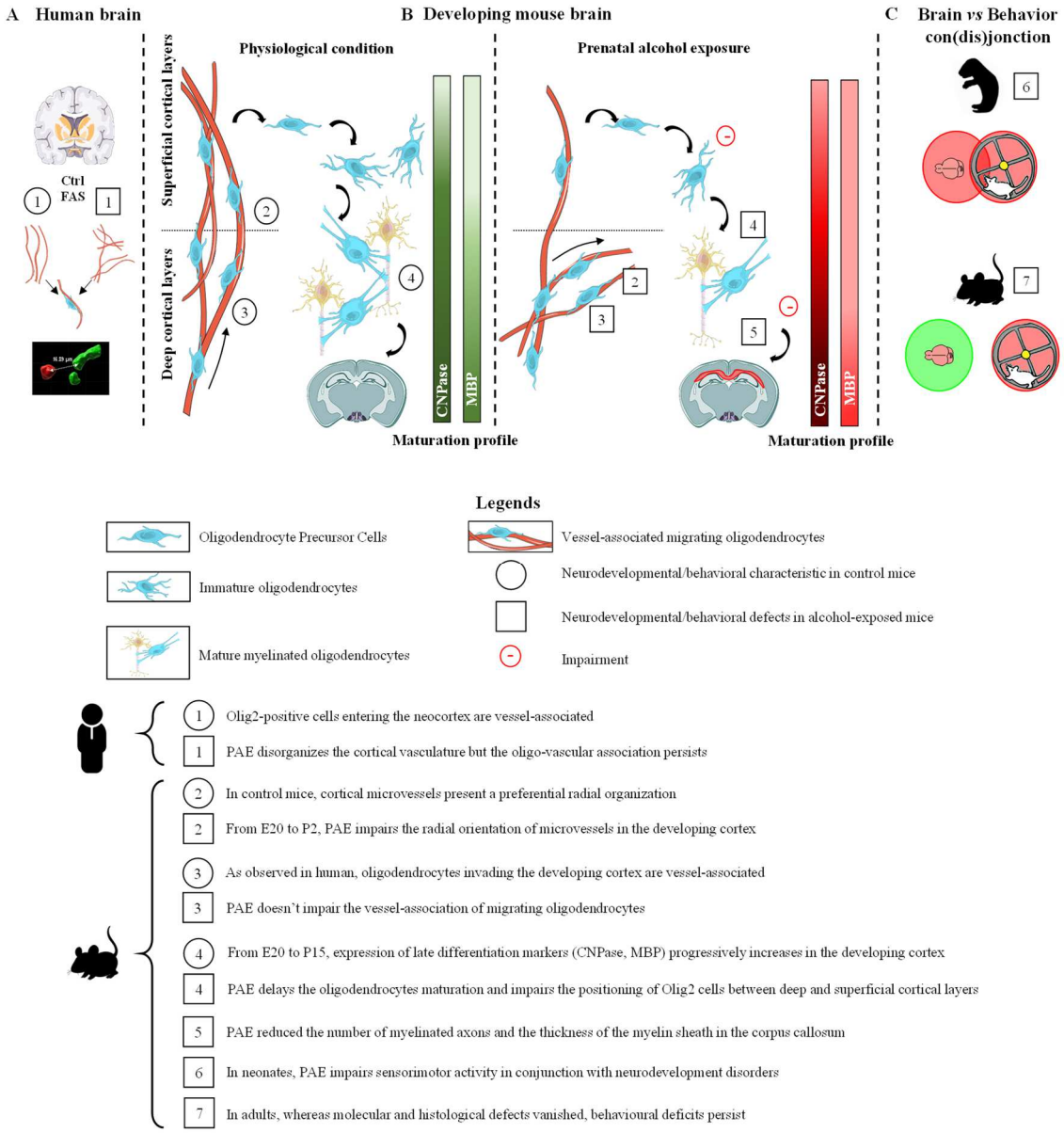


Figure 32 : Graphical abstract résumant l'ensemble des résultats obtenus.

Les effets observés, obtenus à partir d'individus non-exposés ou exposés *in utero* à l'alcool, sont respectivement représentés par des chiffres au sein d'un cercle et d'un carré. Chaque symbole est décrit au sein de la légende du graphique.

Axe Placenta cerveau : Prévenir les défauts de l'angiogenèse pour prévenir les anomalies de maturation oligodendrocytaire et les troubles comportementaux ?

Alors qu'il a été montré *i)* un effet de l'alcoolisation *in utero* sur l'angiogenèse cérébrale **[264]**, *ii)* une migration vasculo-associée des oligodendrocytes **[51]**, *iii)* un impact de l'alcool sur l'expression de marqueurs de différenciation du lignage oligodendroglial (la présente thèse), *iv)* des troubles moteurs associés (**[301]** et la présente thèse), rien ne relie entre eux ces différentes observations qui pourraient constituer des événements parallèles et indépendants.

Récemment, plusieurs travaux de la littérature ont mis en évidence l'existence d'un axe fonctionnel « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale **[165]** ; **[173]** ; **[305]**. En particulier, il a été mis en évidence que l'alcoolisation *in utero* réprimait l'expression placentaire du PlGF et du récepteur VEGF-R1 au niveau cérébral **[173]**. De plus, la répression placentaire du PlGF par électroporation *in utero* chez la Souris induit des anomalies vasculaires cérébrales comparables à celles observées à la suite d'une alcoolisation maternelle alors que, *a contrario*, la surexpression placentaire du PlGF corrige les anomalies vasculaires induites par l'alcool au niveau cortical **[173]** ; **[264]**.

Afin de démontrer une contribution endothéliale dans les anomalies du lignage oligodendroglial induites par une alcoolisation *in utero*, nous avons émis l'hypothèse qu'une correction des effets de l'alcool sur l'angiogenèse corticale pourrait être en mesure de prévenir, au moins en partie, les atteintes oligodendrocytaires. Afin de tester cette hypothèse, une étude basée sur la surexpression placentaire du PlGF, par électroporation placentaire d'un CRISPR d'activation (CRISPR-PlGF-Act), a été initiée. Pour se faire, un protocole expérimental a été mis en place (**Figure 33**).

---

[51] Tsai *et al.*, **2016**.
[165] Luna *et al.*, **2016**.
[173] Lecuyer *et al.*, **2017**.
[264] Jégou *et al.*, **2012**.
[301] Cantacorps *et al.*, **2017**.
[305] Savage *et al.*, **2019**.

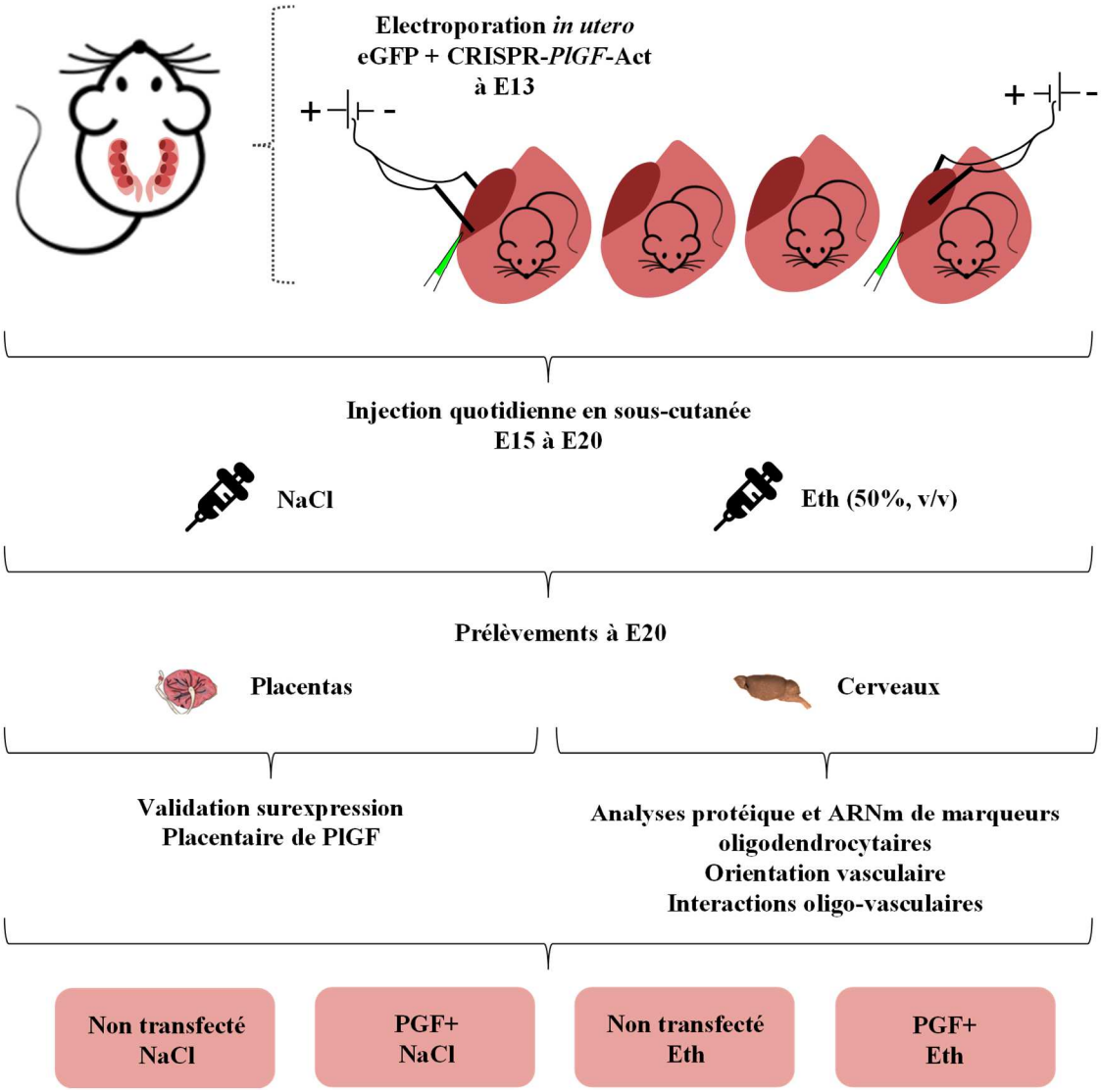


Figure 33 : Protocole expérimental mis en place pour rechercher un lien fonctionnel entre les anomalies vasculaires et les anomalies du lignage oligodendrocytaire par modulation de l'expression placentaire du PlGF.

Au 13ème jour de gestation, des transfections placentaires des plasmides eGFP et CRISPR d'activation du PlGF (CRISPR-PlGF-Act) ont été réalisées. De E15 à E20, une injection quotidienne en sous-cutanée de NaCl ou d'éthanol 3g/kg, dilué à 50% dans du NaCl a été réalisée. Enfin, à E20, les placentas et les cerveaux fœtaux correspondants ont été prélevés. Au final, 4 groupes expérimentaux ont été obtenus. CRIPSR : *Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Activation* ; Eth : Ethanol ; Ex : Jour embryonnaire x ; NaCl : chlorure de sodium ; PlGF : *placental growth factor* ; PGF+ : PlGF placentaire surexprimé.

Pour commencer, une étape de validation de la surexpression placentaire de PlGF a été réalisée. A partir des placentas, les expériences de Western blot ont permis de valider l'efficacité de la transfection par électroporation, l'expression protéique du PlGF étant drastiquement augmentée quel que soit les conditions de traitement (**Figure 34**).

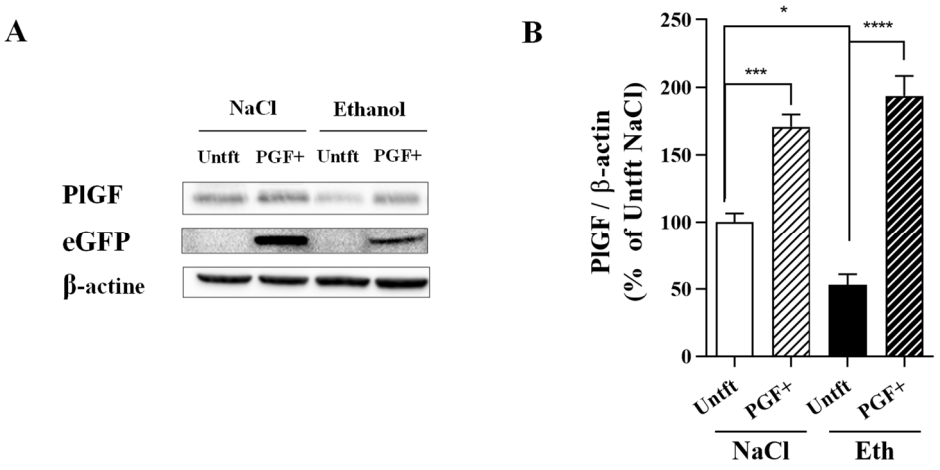


Figure 34 : Validation de la surexpression placentaire de PlGF à E20.

Visualisation (A) et quantification (B) par Western blot des effets de la surexpression placentaire du PlGF et de l'exposition prénatale à l'alcool sur l'expression protéique placentaire du PlGF à E20. *p < 0.05 ; ***p < 0.001 ; ****p < 0.0001, ANOVA deux voies suivi d'un post-test de Tukey. eGFP : *enhanced green fluorescent protein* ; Eth : Ethanol ; PGF+ : PlGF placentaire surexprimé ; Untft : non transfecté.

Des résultats préliminaires ont été obtenus uniquement au stade développemental E20 et, même s'ils ne permettent pas encore de tirer des conclusions, ils tendent à démontrer la faisabilité de l'étude. En particulier, une évaluation de l'organisation du réseau vasculaire cortical a été effectuée (**Figure 35**). Ainsi, ils confirment les travaux de Lecuyer et collaborateurs, et montrent que l'éthanol désorganise les microvaisseaux corticaux. Lorsqu'il est surexprimé au niveau placentaire, le PlGF seul ne modifie pas l'organisation des microvaisseaux radiaux (**Figure 35**). En revanche, en condition d'alcoolisation fœtale, la surexpression placentaire du PlGF restaure l'organisation radiale des microvaisseaux corticaux (**Figure 35**).

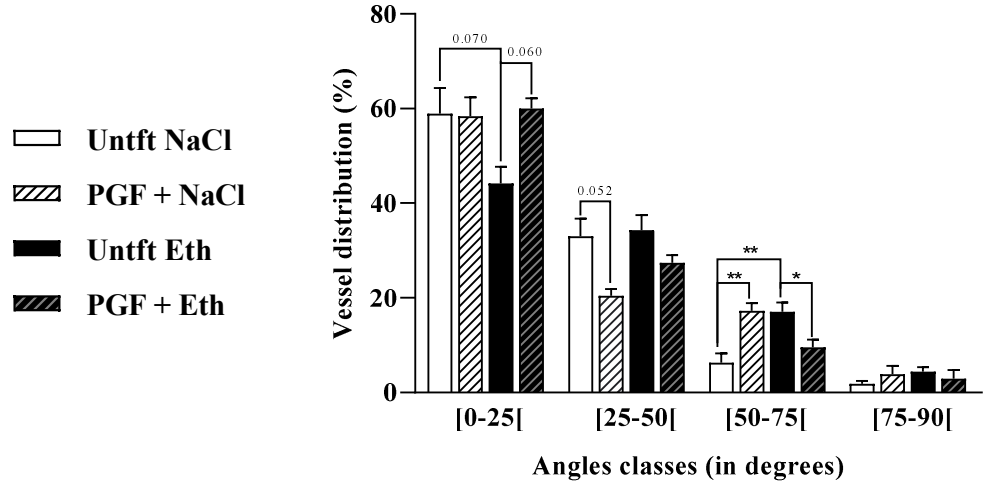


Figure 35 : Effet de la surexpression du PlGF placentaire sur l'orientation corticale des microvaisseaux chez des fœtus à E20 exposés ou non à l'alcool *in utero*.

Les vaisseaux radiaux appartiennent à la classe d'angles [0-25[. ANOVA deux voies suivi d'un post-test de Tukey. Eth : Ethanol ; PGF+ : PlGF placentaire surexprimé ; Untft : non transfecté.

De même, une quantification de l'expression de marqueurs du lignage oligodendroglial a été initiée au même stade (E20) par qRT-PCR (**Figure 36**). Quel que soit le groupe considéré, les expressions des ARNm codant PDGFRα et CNPase ne sont pas modifiées. En revanche, une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm codant pour le facteur de transcription Olig2 est quantifiée à la suite d'une surexpression placentaire du PlGF, et ceci en condition d'alcoolisation fœtale ou non (**Figure 36**). Ces premières données, qui devront être reproduites, suggèrent une possible influence de l'axe « placenta-cerveau » et, en particulier, d'un facteur angiogénique, le PlGF, sur le lignage oligodendroglial au cours du développement cérébral.

Ces travaux en cours de développement devront être étayés par un plus grand nombre d'expériences et par une caractérisation postnatale (P2 et P15) des interactions oligo-vasculaires. Pour cette caractérisation postnatale, un développement technologique par utilisation d'AAV-GFP au niveau cérébral sera nécessaire. En effet, le placenta qui est la cible de la surexpression de PlGF par électroporation, est un organe transitoire qui est perdu à la naisssance. Or, ce placenta électroporé est nécessaire pour cibler les individus appareillés. L'administration d'AAV-GFP au niveau cérébral, en parallèle de l'électroporation, serait un bon marqueur pour permettre l'identification et le suivi à long terme de ces individus.

[306] O'Kieffe & Kenny, **2014**.

A terme, ces résultats visent à déterminer si des facteurs angiogéniques placentaires pourraient avoir valeur de biomarqueurs d'atteinte cérébrale **[306]**. En effet, il semble de plus en plus établi qu'une angiogenèse cérébrale normale est un prérequis pour un neurodéveloppement correct que cela soit pour la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes ou des interneurones GABAergiques. La caractérisation d'un axe « placenta-cerveau » fonctionnel impliqué dans le développement cortical pourrait alors constituer une approche de prévention des anomalies du neurodéveloppement associées à l'alcoolisation *in utero*.

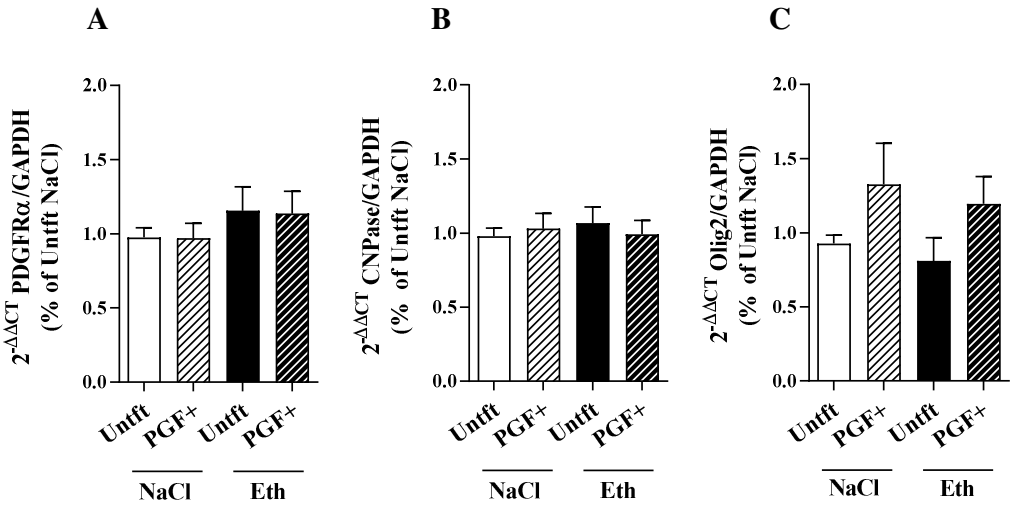


Figure 36 : Effet d'une surexpression placentaire du PlGF et d'une alcoolisation *in utero* sur l'expression de marqueurs du lignage oligodendrocytaire à E20.

Effet de l'alcool et de la surexpression placentaire du PlGF sur l'expression des ARNm codant PDGFRα (A), CNPase (B) et Olig2 (C). CNPase : *2':3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase* ; Eth : Ethanol ; Olig2 : *oligodendrocyte transcription factor* 2 ; PDGFRα : *platelet-derived growth factor-α* ; PGF+ : PlGF placentaire surexprimé ; Untft : non transfecté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*. 2008. 9(2):110-22.

[2]. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010. 20(4):327-48.

[3]. Spemann, H., Mangold, H. Induction of embryonicprimordial by implantation of organizers from a differentspecies. *Roux's Arch. Entw. Mech*. 1924. 100, 599–638 (reprinted and translated in *Int. J. Dev. Biol.* 2001. 45, 13–31).

[4]. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A, Greene ND, Copp AJ. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*. 2017. 144(4):552-566.

[5]. Stiles, J. The fondamentals of brain development: Integrating nature and nurture. Cambridge: MA, Harvard University Press. 2008.

[6]. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2008. 508(1):28-44.

[7]. Paridaen JT, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 2014. 15(4):351-64.

[8]. Wodarz A, Huttner WB. Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. *Mech Dev*. 2003. 120(11):1297-309.

[9]. Rakic P. Principles of neural cell migration. *Experientia*. 1990. 46(9):882-91.

[10]. Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex*. 2003. 13(6):607-11.

[11]. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci*. 2002. 22(8):3161-73.

[12]. Anderson SA, Marín O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*. 2001. 128(3):353-63.

[13]. Valiente M, Marín O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2010. 20(1):68-78.

[14]. Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhal A, Szabó G, Vasudevan A. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun*. 2013. 4:2149.

[15]. Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL. Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci*. 1999. 19(11):4449-61.

[16]. Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z, Sawada T. Stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002. 138(2):195-8.

[17]. Des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C. doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet*. 1998. 7(7):1063-70.

[18]. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci*. 2015. 9:4.

[19]. Cooper JA. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*. 2008. 31(3):113-9.

[20]. Bielle F, Griveau A, Narboux-Nême N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci*. 2005. 8(8):1002-12.

[21]. Huang Z. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol Cell Neurosci*. 2009. 42(1):11-22.

[22]. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015. 347(6226):1138-42.

[23]. Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodóvar C. Neurovascular Communication during CNS Development. *Dev Cell*. 2018. 45(1):10-32.

[24]. Baker NE, Brown NL. All in the family: proneural bHLH genes and neuronal diversity. *Development*. 2018. 145(9):dev159426.

[25]. Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 2013. 33(10):4216-33.

[26]. Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol*. 2015. 36(10):605-613.

[27]. Van Tilborg E, de Theije CGM, van Hal M, Wagenaar N, de Vries LS, Benders MJ, Rowitch DH, Nijboer CH. Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*. 2018. 66(2):221-238.

[28]. Marshall CA, Novitch BG, Goldman JE. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci*. 2005. 25(32):7289-98.

[29]. Zhou Q, Anderson DJ. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*. 2002. 109(1):61-73.

[30]. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 2010. 468(7321):214-22.

[31]. D.P. Rio Hortega, Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribucion regional de la microglia, *Memorias de la Real Sociedad Espanola de Historia Natural*. 1921. 213-268.

[32]. Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr Pharm Des*. 2016. 22(6):656-79.

[33]. Tauheed AM, Ayo JO, Kawu MU. Regulation of oligodendrocyte differentiation: Insights and approaches for the management of neurodegenerative disease. *Pathophysiology*. 2016. 23(3):203-10.

[34]. Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell*. 2002. 109(1):75-86.

[35]. Guérout N, Li X, Barnabé-Heider F. Cell fate control in the developing central nervous system. *Exp Cell Res*. 2014. 321(1):77-83.

[36]. Grimaldi P, Parras C, Guillemot F, Rossi F, Wassef M. Origins and control of the differentiation of inhibitory interneurons and glia in the cerebellum. *Dev Biol*. 2009. 328(2):422-33.

[37]. Hashimoto R, Hori K, Owa T, et al. Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. *Mechanisms of Development*. 2016. 140:25-40.

[38]. Zhang L, Goldman JE. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol*. 1996. 370(4):536-50.

[39]. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 2006. 9(2):173-9.

[40]. Orduz D, Benamer N, Ortolani D, Coppola E, Vigier L, Pierani A, Angulo MC. Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat Commun*. 2019. 10(1):4249.

[41]. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 2019. 8(11):1424.

[42]. Choe Y, Huynh T, Pleasure SJ. Migration of oligodendrocyte progenitor cells is controlled by transforming growth factor β family proteins during corticogenesis. *J Neurosci*. 2014. 34(45):14973-83.

[43]. Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y, Ferent J. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J Dev Biol*. 2016. 4(3):28.

[44]. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1843(9):1917-29.

[45]. Hayakawa K, Seo JH, Pham LD, Miyamoto N, Som AT, Guo S, Kim KW, Lo EH, Arai K. Cerebral endothelial derived vascular endothelial growth factor promotes the migration but not the proliferation of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Neurosci Lett*. 2012. 513(1):42-6.

[46]. Yan H, Rivkees SA. Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res*. 2002. 69(5):597-606.

[47]. Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM, Miller RH. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell*. 2002. 110(3):373-83.

[48]. Tsai HH, Miller RH. Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci*. 2002. 25(4):173-5.

[49]. Habermacher C, Angulo MC, Benamer N. Glutamate versus GABA in neuron-oligodendroglia communication. *Glia*. 2019. 67(11):2092-2106.

[50]. Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, Barres BA. Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. 106(2):641-6.

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

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

[53]. Yuen TJ, Silbereis JC, Griveau A, Chang SM, Daneman R, Fancy SPJ, Zahed H, Maltepe E, Rowitch DH. Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell*. 2014. 158(2):383-396.

[54]. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2013. 16(6):668-76.

[55]. Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron*. 1998. 20(5):869-82.

[56]. Givogri MI, Costa RM, Schonmann V, Silva AJ, Campagnoni AT, Bongarzone ER. Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res*. 2002. 67(3):309-20.

[57]. Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R, Franklin RJ, Rowitch DH. Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci*. 2011. 14(8):1009-16.

[58]. Fannon J, Tarmier W, Fulton D. Neuronal activity and AMPA-type glutamate receptor activation regulates the morphological development of oligodendrocyte precursor cells. *Glia*. 2015. 63(6):1021-35.

[59]. Arai K, Lo EH. An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 2009. 29(14):4351-5.

[60]. Miyamoto Y, Yamamori N, Torii T, Tanoue A, Yamauchi J. Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination. *Mol Biol Cell*. 2014. 25(9):1532-42.

[61]. Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105(9):3581-6.

[62]. Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke*. 2007. 38(2 Suppl):724-30.

[63]. Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL. Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination. *Brain Sci*. 2013. 3(3):1282-324.

[64]. Dean JM, Moravec MD, Grafe M, Abend N, Ren J, Gong X, Volpe JJ, Jensen FE, Hohimer AR, Back SA. Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev Neurosci*. 2011. 33(3-4):251-60.

[65]. Hardy RJ, Friedrich VL Jr. Progressive remodeling of the oligodendrocyte process arbor during myelinogenesis. *Dev Neurosci*. 1996. 18(4):243-54.

[66]. Copray S, Huynh JL, Sher F, Casaccia-Bonnefil P, Boddeke E. Epigenetic mechanisms facilitating oligodendrocyte development, maturation, and aging. *Glia*. 2009. 57(15):1579-87.

[67]. Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev*. 2009. 23(13):1571-85.

[68]. Wegner M. A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*. 2008. 35(1):3-12.

[69]. Mei F, Wang H, Liu S, Niu J, Wang L, He Y, Etxeberria A, Chan JR, Xiao L. Stage-specific deletion of Olig2 conveys opposing functions on differentiation and maturation of oligodendrocytes. *J Neurosci*. 2013. 33(19):8454-62.

[70]. Emery B, Lu QR. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015. 7(9):a020461.

[71]. Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci*. 2009. 12(7):829-38.

[72]. Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnefil P. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci*. 2002. 22(23):10333-45.

[73]. Shen S, Li J, Casaccia-Bonnefil P. Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J Cell Biol*. 2005. 169(4):577-89.

[74]. Conway GD, O'Bara MA, Vedia BH, Pol SU, Sim FJ. Histone deacetylase activity is required for human oligodendrocyte progenitor differentiation. *Glia*. 2012. 60(12):1944-53.

[75]. Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, Zamanian JL, Foo LC, McManus MT, Barres BA. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron*. 2010. 65(5):597-611.

[76]. Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang T, Xu X, Mi QS, Xin M, Wang F, Appel B, Lu QR. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron*. 2010. 65(5):612-26.

[77]. Chen TJ, Kula B, Nagy B, Barzan R, Gall A, Ehrlich I, Kukley M. In Vivo Regulation of Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Differentiation by the AMPA-Receptor Subunit GluA2. *Cell Rep*. 2018. 25(4):852-861.e7.

[78]. Li C, Xiao L, Liu X, Yang W, Shen W, Hu C, Yang G, He C. A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *Glia*. 2013. 61(5):732-49.

[79]. Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, Zhao C, Shen YA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJ, Lu QR, Chan JR. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109(4):1299-304.

[80]. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993. 262(5134):695-700.

[81]. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012. 487(7408):443-8.

[82]. Waxman SG, Bennett MV. Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol*. 1972. 238(85):217-9.

[83]. Edgar, J.M., and Griffiths, I.R. Chapter 7 - White Matter Structure: A Microscopist's View. *In Diffusion MRI* (Second Edition), San Diego: Academic Press, 2014. pp. 127-153.

[84]. Fields RD, Dutta DJ. Treadmilling Model for Plasticity of the Myelin Sheath. *Trends Neurosci*. 2019. 42(7):443-447.

[85]. Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*. 2014. 156(1-2):277-90.

[86]. Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia*. 2008. 56(14):1532-40.

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

[88]. Duncan GJ, Simkins TJ, Emery B. Neuron-Oligodendrocyte Interactions in the Structure and Integrity of Axons. *Front Cell Dev Biol*. 2021. 9:653101.

[89]. Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K+ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol*. 2003. 162(6):1149-60.

[90]. Verkhratsky, A., and Butt, A. Oligodendrocytes. In Glial Physiology and Pathophysiology (John Wiley & Sons, Ltd), 2013. pp. 245-319.

[91]. Nawaz S, Sánchez P, Schmitt S, Snaidero N, Mitkovski M, Velte C, Brückner BR, Alexopoulos I, Czopka T, Jung SY, Rhee JS, Janshoff A, Witke W, Schaap IAT, Lyons DA, Simons M. Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Dev Cell*. 2015. 34(2):139-151.

[92]. Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol*. 1982. 95(2 Pt 1):598-608.

[93]. Boggs, J.M., and Wang, H. Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *J Neurosci Res*. 2004. 76, 342-355.

[94]. Chernoff GF. Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J Hered*. 1981. 72(2):128.

[95]. Laule C, Vavasour IM, Kolind SH, Li DK, Traboulsee TL, Moore GR, MacKay AL. Magnetic resonance imaging of myelin. *Neurotherapeutics*. 2007. 4(3):460-84.

[96]. Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B., and Braun, P.E. Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci*. 1996. 7, 453-466.

[97]. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest*. 2017. 127(9):3271-3280.

[98]. Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol*. 2013. 23(12):644-51.

[99]. Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Möbius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, Steffens H, Schomburg ED, Pérez-Samartín A, Pérez-Cerdá F, Bakhtiari D, Matute C, Löwel S, Griesinger C, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Nave KA. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*. 2016. 91(1):119-32.

[100]. Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*. 2005. 438(7071):1167-71.

[101]. Bujalka H, Koenning M, Jackson S, Perreau VM, Pope B, Hay CM, Mitew S, Hill AF, Lu QR, Wegner M, Srinivasan R, Svaren J, Willingham M, Barres BA, Emery B. MYRF is a membrane-associated transcription factor that autoproteolytically cleaves to directly activate myelin genes. *PLoS Biol*. 2013. 11(8):e1001625.

[102]. Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, Ibrahim A, Ligon KL, Rowitch DH, Barres BA. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell*. 2009. 138(1):172-85.

[103]. Koenning M, Jackson S, Hay CM, Faux C, Kilpatrick TJ, Willingham M, Emery B. Myelin gene regulatory factor is required for maintenance of myelin and mature oligodendrocyte identity in the adult CNS. *J Neurosci*. 2012. 32(36):12528-42.

[104]. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*. 2001. 21(4):1302-12.

[105]. Van Tilborg E, Heijnen CJ, Benders MJ, van Bel F, Fleiss B, Gressens P, Nijboer CH. Impaired oligodendrocyte maturation in preterm infants: Potential therapeutic targets. *Prog Neurobiol*. 2016. 136:28-49.

[106]. Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? *Ann Neurol*. 2014. 75(4):469-86.

[107]. Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Nuechterlein KH, Edwards N, Mintz J. Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*. 2001. 58(5):461-5. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry*. 2001. 58(8):774.

[108]. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat*. 2009. 3:5.

[109]. Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, Attwell D, Tohyama K, Richardson WD. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*. 2013. 77(5):873-85.

[110]. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997. 386(6626):671-4.

[111]. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000. 6(4):389-95.

[112]. Bautch VL, James JM. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr*. 2009. 3(2):199-204.

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

[114]. Illustration de Christopher Wren, De Cerebri Anatome, 1664.

[115]. Alexandre Vivanti. Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien. Génétique humaine. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. ffNNT : 2018SACLS568ff. fftel-01988414f.

[116]. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*. 2004. 231(3):474-88.

[117]. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003. 314(1):107-17.

[118]. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013. 3(1):a006569.

[119]. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci*. 2014. 71(21):4131-48.

[120]. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003. 161(6):1163-77.

[121]. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007. 104(9):3219-24.

[122]. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007. 104(9):3225-30.

[123]. P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009. 6(6):315-26.

[124]. Zeng A, Wang SR, He YX, Yan Y, Zhang Y. Progress in understanding of the stalk and tip cells formation involvement in angiogenesis mechanisms. *Tissue Cell*. 2021. 73:101626.

[125]. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. 2008. 4(4):241-6.

[126]. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development*. 2011. 138(21):4763-76.

[127]. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005. 436(7048):193-200.

[128]. Vesalius, A. De Humani Corporis Fabrica (The Fabric of the Human Body) (Oporinus, Basel, 1543).

[129]. Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, Acker-Palmer A. Neurovascular Interactions in the Nervous System. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2019. 35:615-635.

[130]. Segarra M, Kirchmaier BC, Acker-Palmer A. A vascular perspective on neuronal migration. *Mech Dev*. 2015. 138 Pt 1:17-25.

[131]. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and

Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999. 19(14):5731-40.

[132]. Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*. 1999. 0(4):1529-41.

[133]. Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, Krum JM. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci*. 2003. 23(35):11036-44.

[134]. Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker PA, Parent A, Saghatelyan A. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*. 2009. 29(13):4172-88.

[135]. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000. 407(6801):249-57.

[136]. Iyer S, Acharya KR. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. *FEBS J*. 2011. 278(22):4304-22.

[137]. Salajegheh A, Angiogenesis in Health, Diseases and Malignancy. *Anticancer Res*. 2016. 36(6):3226.

[138]. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983. 219(4587):983-5.

[139]. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989. 161(2):851-8.

[140]. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991. 266(18):11947-54.

[141]. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016. 15(6):385-403.

[142]. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008. 8(11):880-7.

[143]. Eswarappa SM, Potdar AA, Koch WJ, Fan Y, Vasu K, Lindner D, Willard B, Graham LM, DiCorleto PE, Fox PL. Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell*. 2014. 157(7):1605-18.

[144]. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor, placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem*. 1995. 270(13):7717-23.

[145]. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004. 25(4):581-611.

[146]. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019. 176(6):1248-1264.

[147]. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996. 380(6573):435-9.

[148]. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008. 8(11):880-7.

[149]. Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, Hou X, Kumar A, Dong L. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr*. 2009. 3(4):322-7.

[150]. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93(6):2576-81.

[151]. Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart JM, Springer ML, von Degenfeld G, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L. Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008. 28(9):1614-20.

[152]. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005. 438(7070):946-53.

[153]. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009. 89(2):607-48.

[154]. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997. 276(5317):1423-5.

[155]. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001. 7(2):186-91.

[156]. Savory LJ, Stacker SA, Fleming SB, Niven BE, Mercer AA. Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J Virol*. 2000. 74(22):10699-706.

[157]. Toivanen PI, Nieminen T, Laakkonen JP, Heikura T, Kaikkonen MU, Ylä-Herttuala S. Snake venom VEGF Vammin induces a highly efficient angiogenic response in skeletal muscle via VEGFR-2/NRP specific signaling. *Sci Rep*. 2017. 7(1):5525.

[158]. Matsunaga Y, Yamazaki Y, Suzuki H, Morita T. VEGF-A and VEGF-F evoke distinct changes in vascular ultrastructure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 379(4):872-5.

[159]. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem*. 2003. 278(52):51985-8.

[160]. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 88(20):9267-71.

[161]. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 A resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*. 1997. 5(10):1325-38.

[162]. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, Persico MG, Acharya KR. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 A resolution. *J Biol Chem*. 2001. 276(15):12153-61.

[163]. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999. 237:31-40.

[164]. Sautreuil C, Laquerrière A, Lecuyer M, Brasse-Lagnel C, Jégou S, Bekri S, Marcorelles P, Gil S, Marret S, Gonzalez BJ. Alcoolisation fœtale - Le placenta au secours du diagnostic précoce des troubles du développement cérébral de l'enfant

[Fetal alcohol exposure: when placenta would help to the early diagnosis of child brain impairments]. *Med Sci* (Paris). 2019. 35(11):859-865. French.

[165]. Luna RL, Kay VR, Rätsep MT, Khalaj K, Bidarimath M, Peterson N, Carmeliet P, Jin A, Croy BA. Placental growth factor deficiency is associated with impaired cerebral vascular development in mice. *Mol Hum Reprod*. 2016. 22(2):130-42.

[166]. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med*. 2012. 44(1):1-9.

[167]. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*. 2008. 11(3):215-21.

[168]. Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F, Foidart JM. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum Reprod*. 2008. 23(6):1407-15.

[169]. Depoix C, Tee MK, Taylor RN. Molecular regulation of human placental growth factor (PlGF) gene expression in placental villi and trophoblast cells is mediated via the protein kinase a pathway. *Reprod Sci*. 2011. 18(3):219-28.

[170]. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest*. 1997. 76(4):517-31.

[171]. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001. 7(5):575-83.

[172]. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. 2(8):a011056.

[173]. Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, Lesueur C, Ramdani Y, Jégou S, Uguen A, Marcorelles P, Marret S, Gonzalez BJ. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun*. 2017. 5(1):44.

[174]. Nilsson I, Bahram F, Li X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, Söderberg O, Anisimov A, Kholová I, Pytowski B, Baldwin M, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Kreuger J,

Claesson-Welsh L. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J*. 2010. 29(8):1377-88.

[175]. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011. 437(2):169-83.

[176]. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010. 141(7):1117-34.

[177]. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*. 2001. 20(11):2768-78.

[178]. Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003. 284(1):H31-40.

[179]. Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008. 28(2):322-8.

[180]. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90(19):8915-9.

[181]. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*. 1992. 89(1):244-53.

[182]. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90(22):10705-9.

[183]. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod*. 1998. 59(6):1540-8.

[184]. Lorquet S, Berndt S, Blacher S, Gengoux E, Peulen O, Maquoi E, Noël A, Foidart JM, Munaut C, Péqueux C. Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J*. 2010. 24(10):3782-95.

[185]. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995. 376(6535):66-70.

[186]. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95(16):9349-54.

[187]. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003. 1(7):1356-70.

[188]. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998. 273(18):11197-204.

[189]. Oelrichs RB, Reid HH, Bernard O, Ziemiecki A, Wilks AF. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene*. 1993. 8(1):11-8.

[190]. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995. 376(6535):62-6.

[191]. Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol*. 1998. 79(5):255-65.

[192]. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008. 3:367-97.

[193]. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 1998. 282(5390):946-9.

[194]. Fujisawa H, Kitsukawa T. Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr Opin Neurobiol*. 1998. 8(5):587-92.

[195]. Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008. 11(1):31-9.

[196]. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, Bono F. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and

VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*. 2006. 108(4):1243-50.

[197]. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 99(6):3657-62.

[198]. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, Yan H, Lu D, Ye Z, Hao J, Feng J, Yang D, Yan X. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 2012. 120(11):2330-9.

[199]. Jovelin E, Oreskovic, De l'alcoolisme à l'abstinence, 2002.

[200]. Alcool, Dommages sociaux : Abus et dépendance, INSERM, 2003.

[201]. Baromètre santé 2018, Alcool : où en sont les Français, Santé Publique France, 2018.

[202]. BEH 2019, Consommation d'alcool, comportement et conséquences pour la santé, Santé Publique France, 2019.

[203]. Calhoun F, Warren K. Fetal alcohol syndrome : historical perspectives. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007. 31(2):168-71.

[204]. William Hogarth [1697-1764], Gin Lane, 1751.

[205]. Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.-P., Menuet, J.-C. « Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées. À propos de 127 cas », *L'Ouest médical*, 1968, n° 25, pp. 476-482.

[206]. Jones, K. L., Smith, D. W. « Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy », *The Lancet*, 1973, pp. 999-1001.

[207]. Mattson SN, Bernes GA, Doyle LR. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Review of the Neurobehavioral Deficits Associated With Prenatal Alcohol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019. 43(6):1046-1062.

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

[209]. Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev*. 2011. 21(2):73-80.

[210]. Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. 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*. 2017. 5(3):e290-e299.

[211]. Popova S, Lange S, Shield K, Burd L, Rehm J. Prevalence of fetal alcohol spectrum disorder among special subpopulations: a systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2019. 114(7):1150-1172.

[212]. Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J, Burd L, Popova S. Global Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorder Among Children and Youth: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr*. 2017. 171(10):948-956.

[213]. World Health Organization, 2018.

[214]. Baromètre Santé 2017, Santé Publique France, 2017.

[215]. Mattson SN, Crocker N, Nguyen TT. Fetal alcohol spectrum disorders: neuropsychological and behavioral features. *Neuropsychol Rev*. 2011. 21(2):81-101.

[216]. Williams JF, & Smith VC. Fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics*, 2015. 136(5), e1395–1406.

[217]. Thorne, John C. Accentuate the Negative: Grammatical Errors During Narrative Production as a Clinical Marker of Central Nervous System Abnormality in School-Aged Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*. 2017. 60: 3523–37.

[218]. Kalberg WO, Provost B, Tollison SJ, Tabachnick BG, Robinson LK, Eugene Hoyme H, Trujillo PM, Buckley D, Aragon AS, May PA. Comparison of motor delays in young children with fetal alcohol syndrome to those with prenatal alcohol exposure and with no prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006. 30(12):2037-45.

[219]. Jirikowic, Tracy, Heather C. Olson, and Deborah Kartin. Sensory Processing, School Performance, and Adaptive Behavior of Young School-Age Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Physical & Occupational Therapy in Pediatrics*. 2008. 28: 117–36.

[220]. Streissguth AP, Bookstein FL, Barr HM, Sampson PD, O'Malley K, Young JK. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *J Dev Behav Pediatr*. 2004. 25(4):228-38.

[221]. O'Connor, M.J. Mental Health Outcomes Associated with Prenatal Alcohol Exposure: Genetic and Environmental Factors. *Curr Dev Disord Rep*. 2014. 1, 181–188.

[222]. Lupton C, Burd L, Harwood R. Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004. 127C(1):42-50.

[223]. Popova, Svetlana, Shannon Lange, Kevin Shield, Alanna Mihic, Albert E. Chudley, Raja A. S. Mukherjee, Dennis Bekmuradov, and Jürgen Rehm. Comorbidity of Fetal Alcohol Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet*. 2016. 387: 978–87.

[224]. Guyet, S. Aspects économiques de la prise en charge médico-sociale du syndrome d'alcoolisation fœtale : à propos de 15 enfants suivis au groupe hospitalier du Havre entre 2002 et 2008, faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen, 2009.

[225]. Birková A, Hubková B, Čižmárová B, Bolerázska B. Current View on the Mechanisms of Alcohol-Mediated Toxicity. *Int J Mol Sci*. 2021. 22(18):9686.

[226]. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc.* 2006. 65(3):278-90.

[227]. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006. 29(4):245-54.

[228]. Heit C, Dong H, Chen Y, Thompson DC, Deitrich RA, Vasiliou VK. The role of CYP2E1 in alcohol metabolism and sensitivity in the central nervous system. *Subcell Biochem*. 2013. 67:235-47.

[229]. Heller M, Burd L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014. 100(4):277-83.

[230]. Nava-Ocampo AA, Velázquez-Armenta Y, Brien JF, Koren G. Elimination kinetics of ethanol in pregnant women. *Reprod Toxicol*. 2004. 18(4):613-7.

[231]. Pruett D, Waterman EH, Caughey AB. Fetal alcohol exposure: consequences, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv*. 2013. 68(1):62-9.

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

[233]. Cartwright MM, Smith SM. Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995a. 19(2):378-86.

[234]. Cartwright MM, Smith SM. Stage-dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995b. 19(6):1454-62.

[235]. Lebel C, Roussotte F, Sowell ER. Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. *Neuropsychol Rev*. 2011. 21(2):102-18.

[236]. Clarke ME, Gibbard WB. Overview of fetal alcohol spectrum disorders for mental health professionals. *Can Child Adolesc Psychiatr Rev*. 2003. 12(3):57-63.

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

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

[239]. Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002. 133(2):115-26.

[240]. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol*. 2009. 183(7):4733-44.

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

[242]. Wilhelm CJ, Guizzetti M. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective. *Front Integr Neurosci*. 2016. 9:65.

[243]. Kane CJ, Phelan KD, Han L, Smith RR, Xie J, Douglas JC, Drew PD. Protection of neurons and microglia against ethanol in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders by peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists. *Brain Behav Immun*. 2011. 25 Suppl 1(Suppl 1):S137-45.

[244]. Darbinian N, Selzer ME. Oligodendrocyte pathology in fetal alcohol spectrum disorders. *Neural Regen Res*. 2022. 17(3):497-502.

[245]. Newville J, Valenzuela CF, Li L, Jantzie LL, Cunningham LA. 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.

[246]. Creeley CE, Dikranian KT, Johnson SA, Farber NB, Olney JW. Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain. *Acta Neuropathol Commun*. 2013. 1:23.

[247]. 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. In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. *Neurobiol Dis*. 2020a. 145:105074.

[248]. 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. Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci*. 2020b. 77(10):1959-1986.

[249]. Marguet F, Friocourt G, Brosolo M, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A. Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans. *Acta Neuropathol Commun*. 2020. 8(1):208.

[250]. Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron*. 2017. 96(6):1223-1238.

[251]. Farley NM, Mihic SJ. Allosteric modulation of the glycine receptor activated by agonists differing in efficacy. *Brain Res*. 2015. 1606:95-101.

[252]. Bird CW, Candelaria-Cook FT, Magcalas CM, Davies S, Valenzuela CF, Savage DD, Hamilton DA. Moderate prenatal alcohol exposure enhances GluN2B containing NMDA receptor binding and ifenprodil sensitivity in rat agranular insular cortex. *PLoS One*. 2015. 10(3):e0118721.

[253]. Cuzon VC, Yeh PW, Yanagawa Y, Obata K, Yeh HH. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J Neurosci*. 2008. 28(8):1854-64.

[254]. Skorput AG, Gupta VP, Yeh PW, Yeh HH. Persistent Interneuronopathy in the Prefrontal Cortex of Young Adult Offspring Exposed to Ethanol In Utero. *J Neurosci*. 2015. 35(31):10977-88.

[255]. Hughes BA, Bohnsack JP, O'Buckley TK, Herman MA, Morrow AL. Chronic Ethanol Exposure and Withdrawal Impair Synaptic GABAA Receptor-Mediated Neurotransmission in Deep-Layer Prefrontal Cortex. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019. 43(5):822-832.

[256]. Kaminen-Ahola N. Fetal alcohol spectrum disorders: Genetic and epigenetic mechanisms. *Prenat Diagn*. 2020. 40(9):1185-1192.

[257]. Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 2015. 199(4):887-96.

[258]. Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, Mallitt KA, Fahey P, Cox TC, Whitelaw E, Chong S. Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *PLoS Genet*. 2010. 6(1):e1000811.

[259]. Nieto SJ, Haile CN, Quave CB, Harding MJ, Nielsen DA, Meisch RA, Kosten TA. Paternal alcohol exposure reduces acquisition of operant alcohol self-administration and affects Bdnf DNA methylation in male and female offspring. *Addict Biol*. 2022. 27(1):e13078.

[260]. Mews P, Egervari G, Nativio R, Sidoli S, Donahue G, Lombroso SI, Alexander DC, Riesche SL, Heller EA, Nestler EJ, Garcia BA, Berger SL. Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation. *Nature*. 2019. 574(7780):717-721.

[261]. Radek KA, Matthies 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(3):H1084-90.

[262]. Williams JK, Baptista PM, Daunais JB, Szeliga KT, Friedman DP, Soker S. The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008. 32(1):155-61.

[263]. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Kozlowski P, Tarnawski M, Dumas R, Rabe A. Effect of a single embryonic exposure to alcohol on glucose transporter (GLUT-1) distribution in brain vessels of aged mouse. *J Neurocytol*. 2001. 30(2):167-74.

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

[265]. Taylor SM, Heron AE, Cannell GR, Florin TH. Pressor effect of ethanol in the isolated perfused human placental lobule. *Eur J Pharmacol*. 1994. 270(4):371-4.

[266]. Rosenberg MJ, Wolff CR, El-Emawy A, Staples MC, Perrone-Bizzozero NI, Savage DD. Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol*. 2010. 44(7-8):673-90.

[267]. Germanaud, D. & Toutain, S. Exposition prénatale à l'alcool et troubles causés par l'alcoolisation fœtale. *Contraste*, 2017. 46, 39-102.

[268]. Lebel C, Rasmussen C, Wyper K, Walker L, Andrew G, Yager J, Beaulieu C. Brain diffusion abnormalities in children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008. 32(10):1732-40.

[269]. Donald KA, Eastman E, Howells FM, Adnams C, Riley EP, Woods RP, Narr KL, Stein DJ. Neuroimaging effects of prenatal alcohol exposure on the developing human brain: a magnetic resonance imaging review. *Acta Neuropsychiatr*. 2015. 27(5):251-69.

[270]. Saghatelyan A. Role of blood vessels in the neuronal migration. *Semin Cell Dev Biol*. 2009. 20(6):744-50.

[271]. 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. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science*. 2016. 354(6308):aaf7073.

[272]. Usui Y, Westenskow PD, Kurihara T, Aguilar E, Sakimoto S, Paris LP, Wittgrove C, Feitelberg D, Friedlander MS, Moreno SK, Dorrell MI, Friedlander M. Neurovascular crosstalk between interneurons and capillaries is required for vision. *J Clin Invest*. 2015. 125(6):2335-46.

[273]. Du Y, Zhang S, Yu T, Du G, Zhang H, Yin Z. Wnt3a is critical for endothelial progenitor cell-mediated neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Med Rep*. 2016. 14(3):2473-82.

[274]. Plane JM, Andjelkovic AV, Keep RF, Parent JM. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol Dis*. 2010. 37(1):218-27.

[275]. Miyamoto N, Pham LD, Seo JH, Kim KW, Lo EH, Arai K. Crosstalk between cerebral endothelium and oligodendrocyte. *Cell Mol Life Sci*. 2014. 71(6):1055-66.

[276]. Granato A, Dering B. Alcohol and the Developing Brain: Why Neurons Die and How Survivors Change. *Int J Mol Sci*. 2018. 19(10):2992.

[277]. Kouzoukas DE, Li G, Takapoo M, Moninger T, Bhalla RC, Pantazis NJ. Intracellular calcium plays a critical role in the alcohol-mediated death of cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 2013. 124(3):323-35.

[278]. Smiley JF, Saito M, Bleiwas C, Masiello K, Ardekani B, Guilfoyle DN, Gerum S, Wilson DA, Vadasz C. Selective reduction of cerebral cortex GABA neurons in a late gestation model of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol*. 2015. 49(6):571-80.

[279]. Miller MW, Robertson S. Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J Comp Neurol*. 1993. 337(2):253-66.

[280]. Tomás M, Marín P, Megías L, Egea G, Renau-Piqueras J. Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiol Dis.* 2005. 20(3):773-84.

[281]. Wang X, Zhang K, Yang F, Ren Z, Xu M, Frank JA, Ke ZJ, Luo J. Minocycline protects developing brain against ethanol-induced damage. *Neuropharmacology*. 2018. 129:84-99.

[282]. Darbinian N, Darbinyan A, Merabova N, Bajwa A, Tatevosian G, Martirosyan D, Zhao H, Selzer ME, Goetzl L. Ethanol-mediated alterations in oligodendrocyte differentiation in the developing brain. *Neurobiol Dis*. 2021. 148:105181.

[283]. Radek 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(1):H174-84.

[284]. 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. 8(2):e2610.

[285]. Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, Barres BA. Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. 106(2):641-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. 106(15):6422.

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

[287]. Tanaka DH, Nakajima K. GABAergic interneuron migration and the evolution of the neocortex. *Dev Growth Differ*. 2012. 54(3):366-72.

[288]. Harb R, Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013. 33(1):146-56.

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

[290]. Xu W, Hawkey AB, Li H, Dai L, Brim HH, Frank JA, Luo J, Barron S, Chen G. Neonatal Ethanol Exposure Causes Behavioral Deficits in Young Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018. 42(4):743-750.

[291]. Kelly SJ, Mahoney JC, West JR. Changes in brain microvasculature resulting from early postnatal alcohol exposure. *Alcohol*. 1990. 7(1):43-7.

[292]. Marguet F, Brosolo M, Friocourt G, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A. Oligodendrocytes lineage is severly affected in human alcohol-exposed foetuses. *In press.*

[293]. Sowell ER, Thompson PM, Mattson SN, Tessner KD, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW. Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb Cortex*. 2002. 12(8):856-65.

[294]. Wang X, Cuzon Carlson VC, Studholme C, Newman N, Ford MM, Grant KA, Kroenke CD. In utero MRI identifies consequences of early-gestation alcohol drinking on fetal brain development in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020. 117(18):10035-10044.

[295]. Rice J, Coutellier L, Weiner JL, Gu C. Region-specific interneuron demyelination and heightened anxiety-like behavior induced by adolescent binge alcohol treatment. *Acta Neuropathol Commun*. 2019. 7(1):173.

[296]. Kervern M, Silvestre de Ferron B, Alaux-Cantin S, Fedorenko O, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Aberrant NMDA-dependent LTD after perinatal ethanol exposure in young adult rat hippocampus. *Hippocampus*. 2015. 25(8):912-23.

[297]. Tan SS, Kalloniatis M, Truong HT, Binder MD, Cate HS, Kilpatrick TJ, Hammond VE. Oligodendrocyte positioning in cerebral cortex is independent of projection neuron layering. *Glia*. 2009. 57(9):1024-30.

[298]. Usrey WM, Sherman SM. Corticofugal circuits: Communication lines from the cortex to the rest of the brain. *J Comp Neurol*. 2019. 527(3):640-650.

[299]. Newville J, Howard TA, Chavez GJ, Valenzuela CF, Cunningham LA. Persistent myelin abnormalities in a third trimester-equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 2022. 46(1):77-86.

[300]. Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG. Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem Cell Biol*. 2018. 96(2):131-147.

[301]. Cantacorps L, Alfonso-Loeches S, Moscoso-Castro M, Cuitavi J, Gracia-Rubio I, López-Arnau R, Escubedo E, Guerri C, Valverde O. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. *Neuropharmacology*. 2017. 123:368-384.

[302]. Kleiber ML, Wright E, Singh SM. Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Behav Brain Res*. 2011. 223(2):376-87.

[303]. De Ávila MAP, Gonçalves RM, Nascimento ECC, Cabral LDM, Vilela FC, Giusti-Paiva A. Prenatal exposure to alcohol impairs social play behavior in adolescent male mice. *Neurotoxicology*. 2020. 79:142-149.

[304]. Nicolas Théveniau. Etude et analyse de la période d'acquisition de la marche chez l'enfant. Apports des neurosciences cognitives et comportementales. Etude des interactions enfant-tenue vestimentaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. ffNNT : 2013GRENS033ff. fftel-01253612.

[305]. Savage DD, Rosenberg MJ, Coquet L, Porch MW, Allen NA, Roux C, Aligny C, Jouenne T, Gonzalez BJ. Ethanol-Induced Alterations in Placental and Fetal Cerebrocortical Annexin-A4 and Cerebral Cavernous Malformation Protein 3 Are Associated With Reductions in Fetal Cortical VEGF Receptor Binding and Microvascular Density. *Front Neurosci*. 2020. 14:519.

[306]. O'Keeffe GW, Kenny LC. Predicting infant neurodevelopmental outcomes using the placenta? *Trends Mol Med*. 2014. 20(6):303-5.

Annexe

Etude Collaborative

Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans

Florent Marguet[1], Gaëlle Friocourt[2,3,4], Mélanie Brosolo[5], Fanny Sauvestre[6], Pascale Marcorelles[7,8], Céline Lesueur[5], Stéphane Marret[9], Bruno J. Gonzalez[1] and Annie Laquerrière[1]

[1] Department of Pathology, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medecine, 76000 Rouen, France.

[2] Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Inserm UMR1078, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

[3] Etablissement Français du Sang (EFS), Bretagne, France.

[4] Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU Brest, Hôpital Morvan, Brest, France.

[5] Normandie Univ, UNIROUEN, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medecine, INSERM U1245, 76000 Rouen, France.

[6] Department of Pathology, Botdeaux University Hospital, Bordeaux, France.

[7] Department of Pathology, Brest University Hospital, Brest, France.

[8] Laboratory of Neurosciences of Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidenttale, Brest, France.

[9] Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medecine, 76000 Rouen, France.

Publié dans Acta Neuropathologica Communications,
Nov 2020, DOI : 10.1186/s40478-020-01089-z

Au cours du neurodéveloppement, la consommation d'alcool pendant la grossesse affecte de nombreux systèmes de neurotransmission dont le système GABAergique, qui assure la balance inhibitrice à maturité cérébrale. A partir d'une cohorte de fœtus humains exposés *in utero* à l'alcool, l'ontogenèse ainsi que les caractéristiques de migration des interneurones GABAergiques et calrétininergiques ont été étudiées. Les principaux résultats montrent un retard majeur de neurogenèse, un défaut d'interaction vasculaire ainsi qu'une altération du positionnement des interneurones GABAergiques au sein des couches corticales. L'identification d'une interneuronopathie à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool pourrait en partie expliquer les troubles neurologiques observés chez ces patients.

Marguet et al. acta neuropathol commun (2020) 8:208
https://doi.org/10.1186/s40478-020-01089-z

Acta Neuropathologica Communications

RESEARCH Open Access

Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans

Florent Marguet[1], Gaëlle Friocourt[2,3,4], Mélanie Brosolo[5], Fanny Sauvestre[6], Pascale Marcorelles[7,8], Céline Lesueur[5], Stéphane Marret[9], Bruno J. Gonzalez[5] and Annie Laquerrière[1*]

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' 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.

Keywords: GABAergic system defects, Human foetal/neonatal brain, Foetal alcohol syndrome, Immunohistochemistry, Vascular interneuron migration

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 [26, 66] 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

*Correspondence: annie.laquerriere@chu-rouen.fr
[1] Department of Pathology, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, 76000 Rouen, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2020. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

have reported that contrary to rodents, a proportion of INs in humans could arise from the dorsal telencephalon [24, 32, 44, 69]. But it is now well admitted that the majority of INs in primates including humans originate in the ganglionic eminences (GE) [2, 21, 36]. 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) [34, 61]. 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 [33]. 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 [3, 45]. In rodents, *Dlx1/2*, *Nkx2.1*, *Lhx6*, *Lhx7* and *ARX* participate in the control of GABAergic IN production and migration [16].

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 [40], by non-classical microtubule associated proteins [5] and by either chemoattractive or repulsive molecules [37–39, 63]. 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 [68].

More than 20 different types of inhibitory INs have been described in the murine neocortex and hippocampus [58] 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 [33]. 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 33].

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 [10]. 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 [9]. The switch from excitatory to inhibitory function occurs between the second and seventh postnatal day, equivalent to the 3rd trimester of gestation in humans [8]. 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 [10, 35, 67].

Aberrant development and function of GABAergic systems in humans have been implicated in various pathologies such as XLAG-syndrome (MIM# 300004) [11], epilepsy linked to focal cortical dysgeneses [18] or prenatal white matter injury [51]. GABA disturbances have also been implicated in a number of autism spectrum disorders of known origin such as Fragile X and Rett syndromes [12] as well as in schizophrenia [46]. Recently, Smiley et al. also identified a selective reduction in GABA INs using a murine model of Foetal Alcohol Spectrum disorder (FASD) [57]. In utero alcohol exposure has damaging effects on brain development and is known to be responsible for severe neurodevelopmental disabilities leading to long-term neurobehavioural deficits [4, 7]. 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 [27, 50]. 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 [28, 64]. Other studies have reported that in utero alcohol exposure affects brain angiogenesis in particular cortical microvessel organization in both mouse and human foetuses [17, 25, 29, 62]. It has also been reported that some nerve cell types, notably GABAergic INs require brain microvessels to properly migrate toward the cortical plate [35, 65].

From these reports, it could be speculated that developmental abnormalities of GABAergic systems including generation, migration and cortical distribution may account for neurocognitive and behavioural disabilities as well as epilepsy observed in FASD children.

These events can be studied using immunohistochemical techniques based on the fact that a substantial proportion of GABAergic INs co-express calcium binding proteins (CaBP), in particular CR which acts as a buffer for modulating intracellular calcium transients [14]. 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. The goals of the present study were first to provide an ontogenetic study of GABAergic IN population and of its calretininergic subpopulation in the germinal zones during normal development by comparison with subjects antenatally exposed to alcohol; second to study their density and repartition in the cortical plate and to compare the spatio-temporal distribution of GABAergic systems; third to search for possible IN positioning abnormalities and fourth whether this mispositioning could be due to their inability to migrate along the intracortical microvessels as vascular migration anomalies have previously been 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

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 microphtalmia
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 [19]

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 [22]. Developmental age was evaluated by means of organ weights [20, 53], 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 [19]. Macroscopic evaluation of brain maturation, in particular gyration, was performed according to the atlas of Feess-Higgins and Larroche [15]. 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. Multiple seven micrometer paraffin embedded sections were stained using Haematoxylin–Eosin 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; Dakoppatts). 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 min 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 $10^4\ \mu m^2$.

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.

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	25th percentile	Indistinct philtrum Low set posteriorly rotated ears Microretrognathism	50th percentile 15.8 g	Anterior coeloso-mia	No	Chronic alcohol intake*	Heroin Methadone
2	20	TOP Maternal distress	10th percentile	Midface hypoplasia, short nose, flat face	25th percentile 39.34 g	No	No	Chronic alcohol intake and Binge drinking* (ND)	HIV, Hepatitis C Multi-drug addiction
3	22	TOP Chiari malformation	<3rd percentile IUGR	FAS craniofacial dys-morphism	«3rd percentile 45.65 g	Renal hydrone-phrosis	Microcephaly Arnold Chiari II Myelomeningocele	Chronic alcohol intake**	Psychotic Disorder Valproate
4	22	TOP Maternal distress	3rd percentile IUGR	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50th percentile 63.5 g	No	No	Chronic alcohol intake (262 g per day) **	Psychotic Disorder psychotrops Increased MGV
5	22	TOP Maternal distress	50th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	50th percentile 63.21 g	Unilateral pelvical-iceal dilatation	No	Daily chronic alco-hol intake*	Multi-drug addiction Valproate (epilepsy)
6	24	TOP Amnion band sequence	NA	FAS craniofacial dys-morphism	50th percentile 75 g	NA	Micropolygyria Migration anoma-lies Vermis hypoplasia cerebellar hemi-sphere necrosis	Chronic alcohol intake**	Cocaine
7	24	TOP septal agenesis	50th percentile	FAS dysmorphism	50th percentile 100.3 g	No	Arhinencephaly	Chronic alcohol intake**	Cannabis addiction
8	26	Spontaneous abor-tion	50th percentile	Indistinct philtrum Posteriorly rotated ears Microretrognathism	50th percentile 133.6 g	Unilateral pelvic dilatation	No	Chronic alcohol intake**	ND
9	27	Preeclampsia Death at D10	10th percentile	FAS craniofacial dys-morphism	3rd percentile 109 g	No	Microcephaly Massive cerebellar haemorraghe	Alcohol intake**	ND
10	29	IUFD cardiopathy	5th percentile	Anteversed nostrils and pointed nose Ear anomalies Indistinct philtrum Retrognathism	5th percentile 178 g	Tetralogy of Fallot	No	Daily chronic alco-hol intake* (ND)	Increased MGV and GGT
11	30	IUFD Abruptio placentae	10th percentile	No	50th percentile 211 g	No	Bilateral intraven-tricular haemor-rhage	Daily chronic alco-hol intake*	Cannabis addiction Treated hypothyroid-ism
12	31	IUFD Preeclampsia	3rd percentile IUGR	Ear anomalies Retrognathism	3rd percentile 197.05 g	No	No	Daily chronic alco-hol intake* (ND)	Increased MGV and GGT

Table 2 (continued)

Case number	WG	Cause of death	Body weight	Cranio-facial dysmorphism	Brain weight	Visceral anomalies	CNS anomalies	Maternal alcohol intake	Maternal Co-morbidity
13	31	TOP Septal agenesis	50th percentile	FAS craniofacial dysmorphism	50th percentile 234 g	No	Septal agenesis	Chronic and Binge drinking*	Cannabis
14	33	IUFD Acute alcohol intoxication (maternal distress)	50th percentile	No	50th percentile 348.15 g	Amniotic fluid inhalation	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	25th percentile	Indistinct philtrum Microretrognathism	<3rd percentile 248 g	No	Neuron heterotopia Microcephaly	Chronic and Binge drinking**	Heroin addiction
16	3 PN months	SIDS	5th percentile	FAS cranio-facial dysmorphism	50th percentile 633 g	No	Brain oedema	Chronic alcohol intake* (ND)	Cannabis addiction
17	22 PN months	SIDS	50th 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

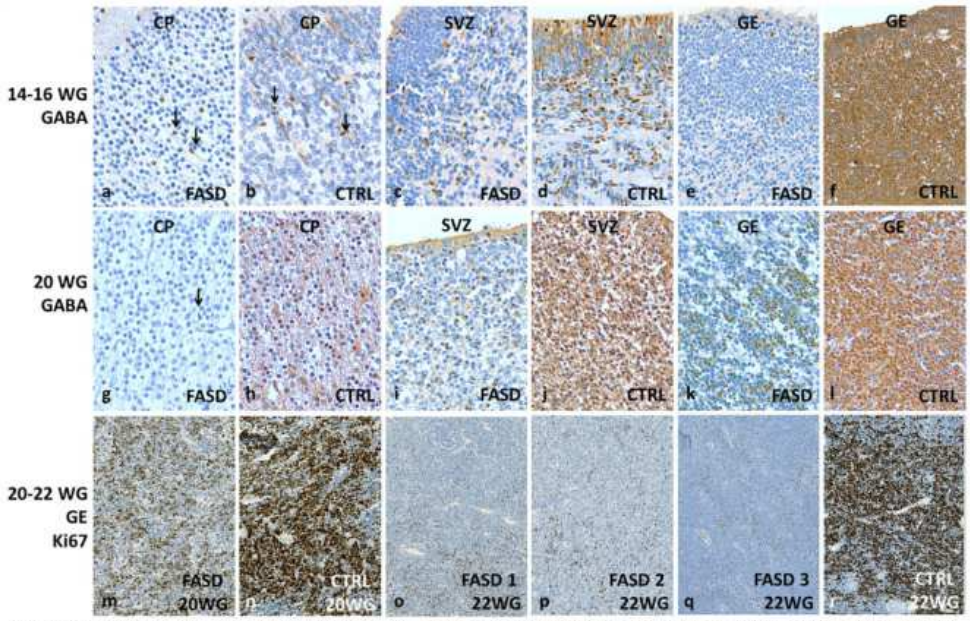


Fig. 1 GABA and Ki67 immunohistochemistry in the brains of FASD and controls at early developmental stages and at mid-gestation. Similar GABA interneuron density in cortical plate of FASD and controls at 14-16 WG which contains bipolar INs migrating along the perforating microvessels as indicated by arrows (**a, b**) [OM × 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 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

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 [50]. 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.

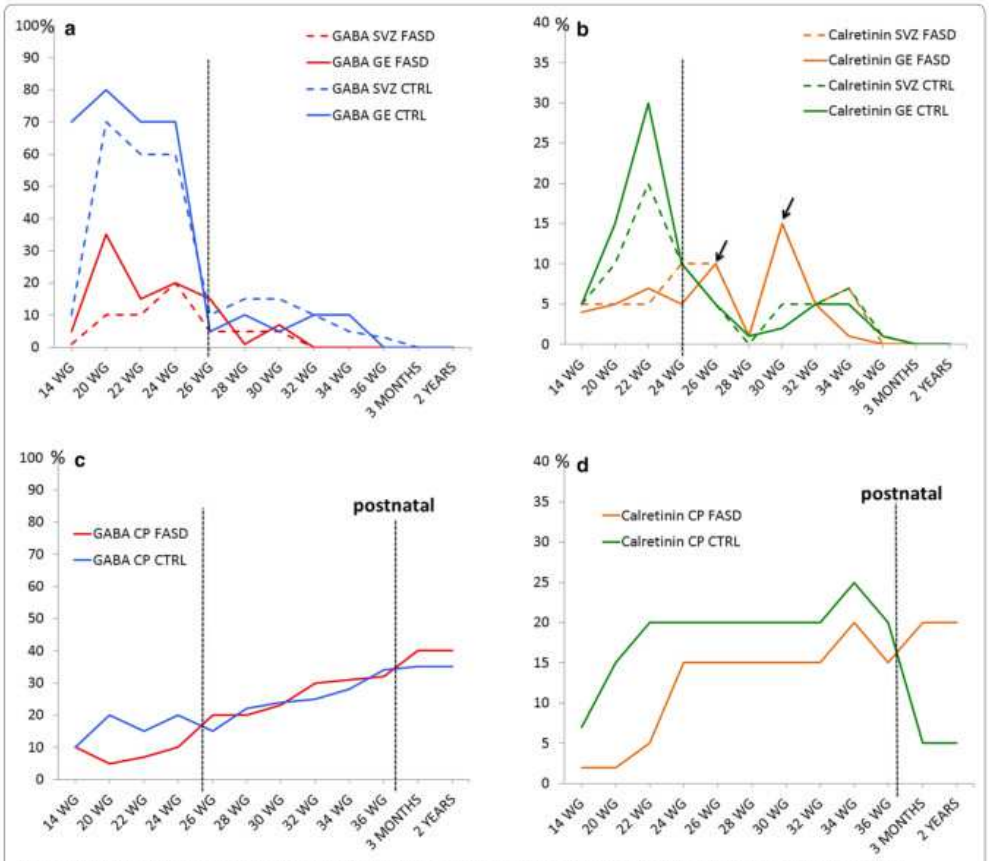


Fig. 2 Schematic representation of GABA and CR containing interneurons in the GE, VZ/SVZ and in the cortical plate of FASD and control brains during foetal and post-natal life. **(a)** Evolution of GABA interneuron density in the GE and VZ/SVZ obtained from semi-quantitative immunohistochemical evaluation. 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

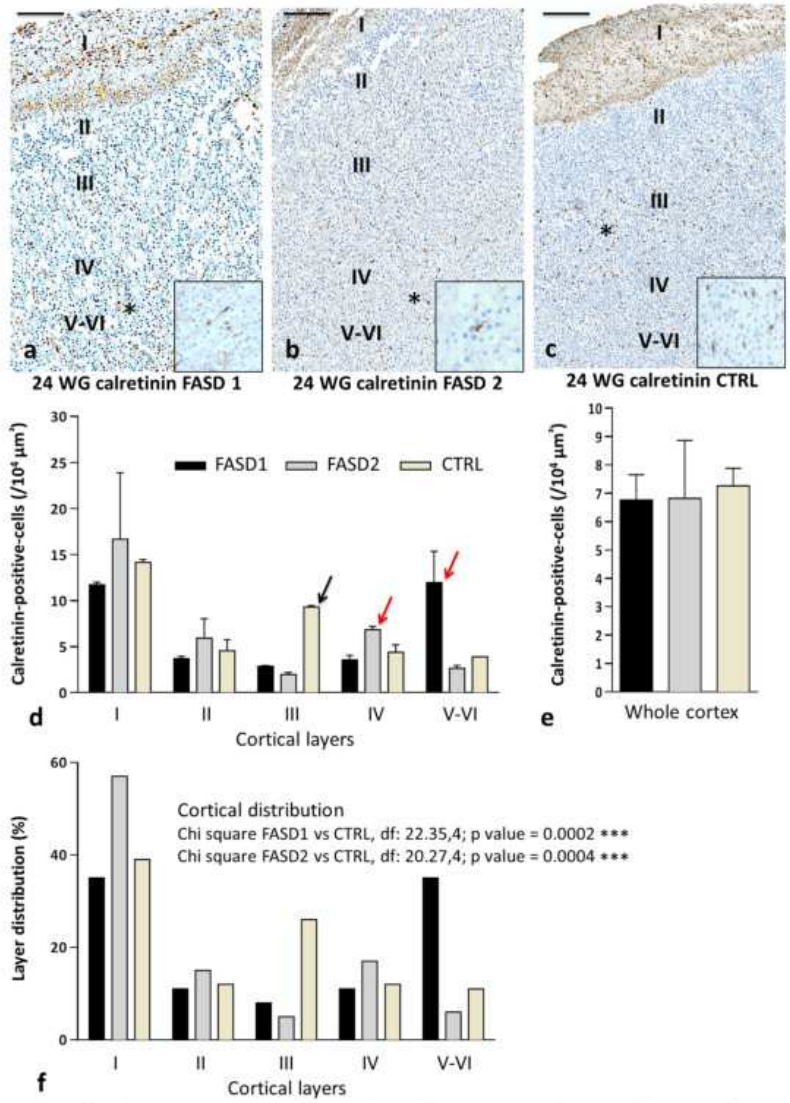


Fig. 3 Calretinin immunohistochemistry in cortical plate of FASD and control brains at 24 WG. Random cortical distribution of CR interneurons in FASD brains with a predominance in deeper layers (asterisks) (**a, b**) compared to control cortical plate in which CR cells were more abundant in layer III (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. Inserts within Fig. 3a, b ad c illustrate the bipolar morphology of CR interneurons at an original magnification of 400. Chi square analysis indicated that the cortical distributions significantly differed between the control case and both FASD cases (f). Scale bar = 0,18 mm

(See figure on next page.)

Fig. 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 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. Inserts within Fig. 4d and e illustrate the bipolar morphology of CR interneurons at an original magnification of 400. CP: cortical plate; CTRL: control cases; GE: ganglionic eminence; FASD: foetal alcohol spectrum disorder; OM: original magnification; SVZ: cortical subventricular zone

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

GABA immunohistochemistry

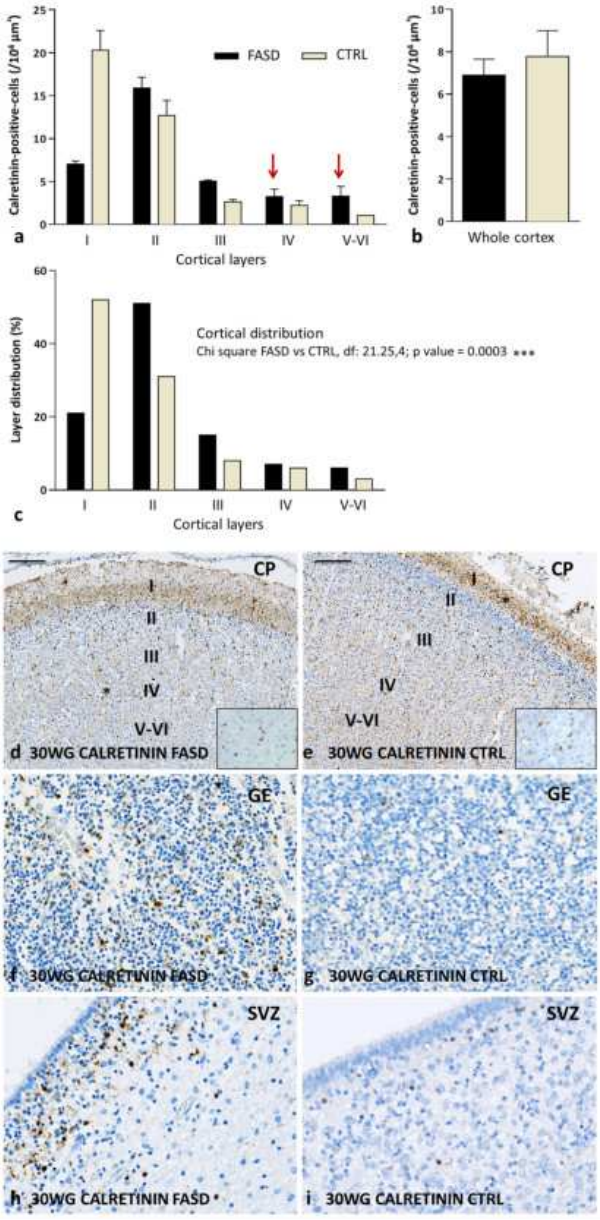
During the early foetal period (14-16 WG), cortical GABAergic IN density was only slightly diminished in FASD in comparison with control cortical plates through which they were migrating along the perforating cortical microvessels from the transient subpial granular cell layer (SGL) (Fig. 1a, b). However, GABA-immunoreactive INs were drastically reduced in the cortical VZ/SVZ (Fig. 1c, d) and the GE of FASD (Fig. 1e, f), 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. 1g, h), in the cortical SVZ (Fig. 1i, j), as well as in the GE (Fig. 1k, l), 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. 1m–r), 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.

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

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–c), 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, e). 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 ($Chi^2 = 22.35$ and 20.27, 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, $Chi^2 = 21.25$, 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


Calretinin-positive-cells (/10⁴ µm²)
FASD
CTRL
a
I
II
III
IV
V-VI
Cortical layers
b
Whole cortex
Layer distribution (%)
Cortical distribution
Chi square FASD vs CTRL, df: 21.25,4; p value = 0.0003 ***
c
CP
d 30WG CALRETININ FASD
e 30WG CALRETININ CTRL
GE
f 30WG CALRETININ FASD
g 30WG CALRETININ CTRL
SVZ
h 30WG CALRETININ FASD
i 30WG CALRETININ CTRL

(See figure on next page.)
Fig. 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. Inserts within Fig. 5 illustrate the bipolar morphology of CR interneurons and their neuritic extensions at an original magnification of 400

in the cortical plate of the FASD brain at 37 WG compared to 5 control brains aged 35–39 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.

As for GABA, semi-quantitative analyses are detailed in Additional file 3 and summarized in Fig. 2. Detailed results obtained from quantitative analyses are presented in Additional file 4.

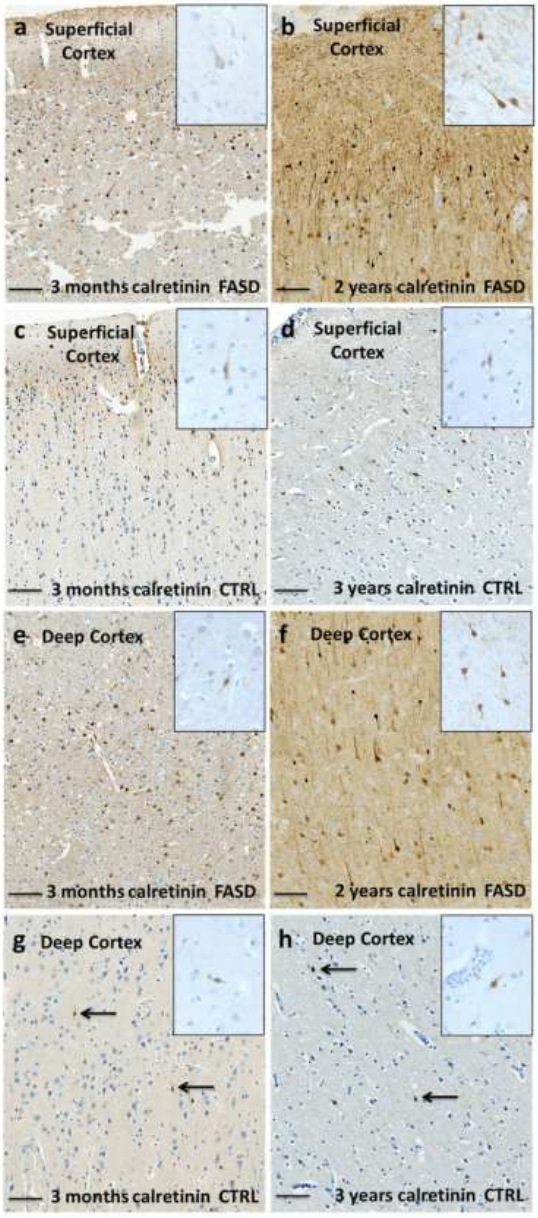
Confocal analyses of vascular interneuron migration in the cortical plate

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 [41]. 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 foetuses, 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 Additional file 5). When counting on one field from the confocal images including all cortical layers at 34 WG, at a magnification of 400, evident differences concerning the connection between INs and vessels were noted. In the foetus exposed to alcohol, a total of 16 INs were located at a distance of the vessel walls and only 2 were in contact with them, conversely to the control in which 18 INs were in close contact with the vessel walls. Moreover, as previously reported [25], 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 [59, 69]. 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 [60]. 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 [48]. 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 [48] which could partly explain the neurocognitive and behavioural deficits observed in FADS. Interestingly, recent studies demonstrated that in a mouse model of monointoxication, PAE affected the expression of some genes involved in intraneocortical connectivity establishment, notably *Rzrβ*, *Cad8* and *Id2* the promoter of which being hypomethylated concomitantly to global DNA hypomethylation that further emphasizes the role of alcohol in altering epigenetic programs [1].

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


a Superficial Cortex
3 months calretinin FASD
b Superficial Cortex
2 years calretinin FASD
c Superficial Cortex
3 months calretinin CTRL
d Superficial Cortex
3 years calretinin CTRL
e Deep Cortex
3 months calretinin FASD
f Deep Cortex
2 years calretinin FASD
g Deep Cortex
3 months calretinin CTRL
h Deep Cortex
3 years calretinin CTRL

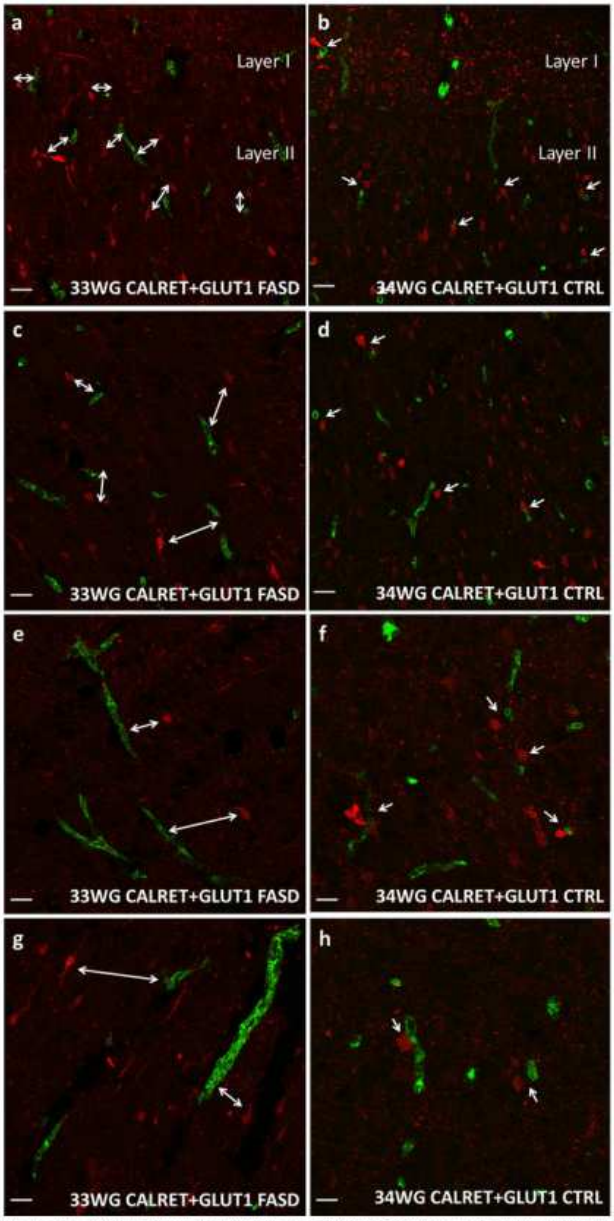


Fig. 6 Confocal analysis with calretinin and GLUT1 immunolabellings at 33-34 WG. CR-immunoreactive interneurons, labeled in red, remaining at a distance from the vessels, labeled in green (double-headed arrows) in FASD brain (**a, c, e, g**) contrary to control, where CR-positive interneurons were found in close contact with the vessels (arrows) in all cortical layers (**b, d, f, h**). Scale bar = 5 µm

decreased production of neurons and astrocytes [52]. 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 [49]. 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 [23]. 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 number 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 somato-sensory cortex of guinea pigs and monkeys [6, 42] 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 [13, 56]. 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 [55]. 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 [56]. 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 [47]. 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 [43, 54].

Migration and positioning of GABAergic INs in the cortex is also controlled by cortical microvessels [65] and it has previously been demonstrated that cortical angiogenesis in foetal human brains is impaired by antenatal alcohol exposure [25, 29]. 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 [30]. 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 [31].

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 calretininergic 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.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1186/s40478-020-01089-z.

Additional file 1: Table 1. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical data with GABA antibody.

Additional file 2: Quantitative analysis of GABA immunolabelling in each layers and in whole cortex (Calretinin-positive-cells/10^4 μm^2).

Additional file 3: Table 2. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical data with Calretinin antibody.

Additional file 4: Quantitative analysis of Calretinin immunolabelling in each layers and in whole cortex (Calretinin-positive-cells/10^4 μm^2).

Additional file 5: 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 µm.

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-aminobutiric 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' gestation.

Acknowledgements

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

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. MB and CL performed immunohistochemical and confocal analyses and FM and AL analysed the results. FM, GF and AL wrote the manuscript. GF, 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.

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.

Ethics approval

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

Competing interest

The authors declare no competing interest.

Author details

[1] Department of Pathology, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, 76000 Rouen, France. [2] Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Inserm UMR1078, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France. [3] Etablissement Français du Sang (EFS), Bretagne, France. [4] Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU Brest, Hôpital Morvan, Brest, France. [5] Normandie Univ, UNIROUEN, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, INSERM U1245, 76000 Rouen, France. [6] Department of Pathology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France. [7] Department of Pathology, Brest University Hospital, Brest, France. [8] Laboratory of Neurosciences of Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France. [9] Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, 76000 Rouen, France.

Received: 22 September 2020 Accepted: 18 November 2020
Published online: 30 November 2020

References

1. Abbott CW, Rohac DJ, Bottom RT, Patadia S, Huffman KJ (2018) Prenatal ethanol exposure and neocortical development: a transgenerational model of FASD. Cereb Cortex 28(8):2908–2921. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx168
2. 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):631–645. https://doi.org/10.1093/cercor/bht254
3. 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. https://doi.org/10.1111/joa.12971
4. Andreu-Fernández V, Bastons-Compta A, Navarro-Tapia E, Sailer S, García-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. https://doi.org/10.1038/s41598-018-38041-0
5. Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell 128(1):29–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021
6. 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. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.08.002
7. 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):631–639. https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0029
8. Barateiro A (1843) Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. Biochim Biophys Acta 9:1917–1929. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018
9. Ben-Ari Y (2007) GABA, a key transmitter for fetal brain maturation. Med Sci (Paris) 23(8–9):751–755. https://doi.org/10.1051/medsci/20072389751
10. Ben-Ari Y (2014) The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. Neuroscience 279:187–219. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.001

11. 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):340–349. https://doi.org/10.1002/ana.10119
12. 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):2044–2055. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.005
13. 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):1854–1864. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5110-07.2008
14. 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):273–289. https://doi.org/10.1093/cercor/3.4.273
15. Feess-Higgins A, Larroche JC (1987) Development of the human fetal brain. (Masson, ed) Paris, INSERM CNRS
16. Friocourt G, Poirier K, Rakić S, Parnavelas JG, Chelly J (2006) The role of ARX in cortical development. Eur J Neurosci 23(4):869–876. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04629.x
17. 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. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.29
18. 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):1669–1686. https://doi.org/10.1111/epi.13200
19. Guihard-Costa AM, Larroche JC (1990) Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. Early Hum Dev 23:27–40. https://doi.org/10.1016/0378-3782(90)90126-4
20. 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. https://doi.org/10.1007/s10024-002-0036-7
21. 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):1576–1587. https://doi.org/10.1038/nn.3541
22. Haute Autorité de santé. Standard protocol for fetal or perinatal autopsy (2014) Ann Pathol. 2014 Dec;34(6):415-33. French. https://doi.org/10.1016/j.annpat.2014.10.005
23. 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):1056–1060. https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1056
24. 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):1771–1782. https://doi.org/10.1093/cercor/bhq245
25. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A et al (2012) Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. Ann Neurol 72(6):952–960. https://doi.org/10.1002/ana.23699
26. Jones EG (2009) The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. Cereb Cortex 19(9):1953–1956. https://doi.org/10.1093/cercor/bhp088
27. Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet 302(7836):999–1001. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)91092-1
28. 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. https://doi.org/10.1124/pr.115.010967
29. 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. https://doi.org/10.1186/s40478-017-0444-6
30. 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. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03248-5
31. 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. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105074. Epub ahead of print
32. Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature 417(6889):645–649. https://doi.org/10.1038/nature00779
33. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O (2018) Development and functional diversification of cortical interneurons. Neuron 100(2):294–313. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009
34. 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. https://doi.org/10.1093/cercor/bhp045
35. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W (2015) Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. Front Cell Neurosci 9:4. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00004
36. 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):1588–1597. https://doi.org/10.1038/nn.3536
37. 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):1889–1901. https://doi.org/10.1242/dev.00417
38. Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nat Rev Neurosci 2(11):780–790. https://doi.org/10.1038/35097509
39. Mei L, Nave KA (2014) Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. Neuron 83(1):27–49. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.007
40. 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. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04630.x
41. 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. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx110
42. 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. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.060
43. 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):1436–1445. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00147.x
44. Petanjek Z, Berger B, Esclapez M (2009) Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. Cereb Cortex 19(2):249–262. https://doi.org/10.1093/cercor/bhn078
45. 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. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.036
46. 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 54:149–156. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.05.016
47. 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. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00264-1
48. 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. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00082

49. Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Henderson GI, Mahimainathan L (2016) Ethanol induces cytostasis of cortical basal progenitors. J Biomed Sci 23:6. https://doi.org/10.1186/s12929-016-0225-8
50. Riley EP, Infante MA, Warren KR (2011) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. Neuropsychol Rev 21(2):73–80. https://doi.org/10.1007/s11065-011-9166-x
51. 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. https://doi.org/10.3171/ped.2006.104.6.396
52. 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):483–496. https://doi.org/10.1002/jnr.20963
53. Schulz DM, Giordano DA, Schulz DH (1962) Weights of organs of fetuses and infants. Arch pathol 74(244):1306–1308
54. 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. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007153
55. 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. https://doi.org/10.1007/s11064-016-2169-5
56. 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):10977–10988. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1462-15.2015
57. 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):571–580. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.04.008
58. Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. Neuron 91(2):260–292. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033
59. Ulfig N (2002) Ganglionic eminence of the human fetal brain–new vistas. Anat Rec 267(3):191–195. https://doi.org/10.1002/ar.10104
60. 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):283–292. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.08.002
61. 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):1561–1584. https://doi.org/10.1002/cne.23242
62. 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. https://doi.org/10.1002/jat.3201
63. 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):727–732. https://doi.org/10.1073/pnas.242721899
64. Wilhelm CJ, Guizzetti M (2016) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. Front Integr Neurosci 9:65. https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00065
65. Won C, Lin Z, Kumar TP, Li S, Ding L, Elkhal A, Szabó G et al (2013) Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. Nat Commun 4:2149. https://doi.org/10.1038/ncomms3149
66. Wonders CP (2006) Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. Nat Rev Neurosci 9:687–696. https://doi.org/10.1038/nrn1954
67. Xing L, Huttner WB (2020) Neurotransmitters as modulators of neural progenitor cell proliferation during mammalian neocortex development. Front Cell Dev Biol 8:391. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00391
68. 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):475–483. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.006
69. Zecevic N, Hu F, Jakovcevski I (2011) Interneurons in the developing human neocortex. Dev Neurobiol 71(1):18–33. https://doi.org/10.1002/dneu.20812

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC