



**HAL**  
open science

# Roles du glutamate et des protéases endothéliales dans le contrôle de la migration vasculo-dépendante des interneurons GABAergiques : impact de l'alcoolisation in utero

Cécile Léger

► **To cite this version:**

Cécile Léger. Roles du glutamate et des protéases endothéliales dans le contrôle de la migration vasculo-dépendante des interneurons GABAergiques : impact de l'alcoolisation in utero. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université; 121018652, 2018. Français. NNT : 2018NORMR168 . tel-04043333

**HAL Id: tel-04043333**

**<https://theses.hal.science/tel-04043333>**

Submitted on 23 Mar 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

## Rôles du glutamate et des protéases endothéliales dans le contrôle de la migration vasculo-dépendante des interneurons GABAergiques : Impact de l'alcoolisation *in utero*

Présentée et soutenue par

**Cécile LEGER**

Thèse soutenue publiquement le 14 mars 2018  
devant le jury composé de

Mme Valérie BESSON	Maître de Conférences des Universités, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. Olivier BAUD	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Paris-Diderot – Université de Genève	Rapporteur
Mme Véronique AGIN	Maître de Conférences des Universités, Université de Caen	Examineur
M. David GERMANAUD	Praticien Hospitalier Universitaire, Hôpital Robert Debré, Université Paris Descartes	Examineur
M. Stéphane MARRET	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche à l'INSERM, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Dr Bruno GONZALEZ, laboratoire U1245 – Équipe 4



---

REMERCIEMENTS

---

*A mon Papa, mon modèle.*

*A ma fille, la meilleure partie de moi.*

*A son papa, un homme extraordinaire.*



Je commence naturellement ces remerciements par quelques mots pour mon directeur de thèse, le **Dr Bruno Gonzalez**, Directeur de Recherche à l'INSERM. Merci pour la qualité de ton encadrement, toujours présent, toujours patient et surtout toujours joyeux. C'est un réel plaisir de travailler dans ton équipe à tes côtés. Ta passion pour les sciences et le partage des connaissances sont contagieux, je souhaite à tout étudiant en thèse de vivre sa thèse comme je l'ai vécu, même si malheureusement pour eux, il n'existe qu'un seul « Papa Bruno ».

Au **Dr Valérie Besson**, Maître de Conférences des Universités, un grand merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Au **Pr Olivier Baud**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je souhaite vous exprimer ma gratitude pour l'intérêt que vous témoignez toujours à nos recherches.

Au **Dr Véronique Agin**, Maître de Conférences des Universités, je vous remercie chaleureusement d'avoir pris le temps de vous intéresser à mon travail et d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Au **Dr David Germanaud**, Praticien Hospitalier Universitaire, votre avis en tant que clinicien sur ces travaux nous apparaît très important, alors merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour l'intérêt que vous portez à ces travaux.

Je tiens à remercier le **Pr Stéphane Marret** pour son accueil, pour tous ses conseils et ses avis en tant que clinicien et pour l'intérêt qu'il porte quotidiennement aux recherches du laboratoire.

Parce que la science c'est avant tout du partage de savoir, j'aimerais remercier tous les membres du laboratoire U1245 et plus particulièrement de notre équipe 4. Merci au **Dr Philippe Leroux**, pour ton expérience, tes questions et toutes ces réunions enrichissantes. Merci au **Pr Isabelle Leroux-Nicollet**, aux **Dr Nathalie Dourmap** et **Carine Cleren** pour votre implication dans ces travaux de recherche au quotidien ainsi que pour toutes vos connaissances, partagées avec tant de plaisir. Merci au **Dr Sylvie Jégou** pour ton dynamisme,

ton expérience et surtout ta joie de vivre, travailler avec toi fût un plaisir, profite bien de ta nouvelle vie maintenant, tu l'as amplement mérité. Et enfin, merci à **François Janin**, pour ton caractère jovial et ton professionnalisme, manipuler avec toi est un plaisir.

Je souhaite bon courage à tous les doctorants de notre équipe, **Camille Sautreuil** et **Bérénice Ledieu-Lugon**, profitez bien du temps qu'il vous reste et j'espère que vous prendrez autant de plaisir à faire et à apprendre que j'en ai eu. Merci à **Marion Dumanoir**, nouvelle arrivée au laboratoire mais qui nous a très vite conquis par sa fragilité, son enthousiasme et sa franchise. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite, tu vas voir, ce n'est que du bonheur !

Un grand merci à tous les collègues qui sont partis vers de nouvelles aventures mais qui ont marqué mes années au laboratoire. Tout d'abord merci au **Dr Caroline Aligny** qui m'a tout appris quand je suis arrivée, merci pour tous tes conseils et ta rigueur, indispensable à un bon travail. Je sais que tout va bien pour toi et j'en suis ravie. Merci au **Dr Vincent Henry**, parti sans jamais vraiment être parti, toujours partant pour une partie de carte ou une bonne conversation scientifique. Merci au **Dr Ismaël Daher** pour ta joie de vivre inaltérable et ton hyperactivité, j'espère que la vie t'apportera tout ce que tu désires. Et enfin un énorme merci à mon collègue et maintenant ami le **Dr Baptiste Porte**. Merci d'avoir toujours été là pour remotiver les troupes, toujours plein d'humour et d'amour. Je n'ai toujours rien compris à la spectrométrie de masse mais ce n'est pas grave, j'ai compris que j'avais un ami et c'est bien mieux ! Bon vent pour la suite mon Baba.

Je tiens également à remercier mes collègues du bureau du 3<sup>ème</sup> étage dans lequel il fait toujours bon vivre. Merci à **Céline Lesueur** pour ton aide de tous les jours et ton intérêt à ces travaux, merci aussi pour tous ces légumes délicieux et pour ton caractère bien trempé que j'adore. Merci à **Michelle Hauchecorne**, ton caractère maternel et rassurant fait un bien fou au moral, tes conseils en matière d'éducation et toutes tes histoires resteront gravés dans ma mémoire. Travailler et discuter avec toi est un plaisir de tous les jours. Merci au **Dr Carole**

**Brasse-Lagnel** pour ton avis et tes conseils toujours bienveillants aussi bien sur le plan privé que professionnel, surtout ne change pas.

Un très très grand merci à tous mes collègues et amis qui ont travaillé de près sur ces travaux, sans vous ces travaux auraient été bien différents. Un grand merci au **Dr Maryline Lecointre**, ultime réfugiée du 4<sup>ème</sup> étage. Merci d'avoir su m'écouter, me conseiller, me soutenir et supporter ma décoration de Noël pendant ces années à partager notre beau bureau. Merci pour le temps passé à relire ce manuscrit, pour tes conseils parentaux, les petits vêtements de ta fille, les virés en voiture, tous tes conseils à la paillasse et surtout merci pour ton indéfectible soutien. Et enfin, un merci tout particulier à mon bras droit, mon binome, mon frère de paillasse, le futur docteur **Nicolas Dupré**. Merci d'avoir toujours été là, dans les bons moments comme dans les moins bons, d'être toujours à fond même quand je le suis moins, de t'intéresser à tout et à tout le monde. Ne perds jamais ta part d'enfant, elle te rend spécial. Je compte sur toi pour que la chorale « NéoVasc » survive après mon départ ! Je te souhaiterai bien bon courage pour la suite mais je sais que tu n'en as pas besoin, tu as un bel avenir déjà tout tracé.

Parce qu'il n'est pas de thésard digne de ce nom qui ne prépare sa relève, je tiens à remercier mon étudiante **Maëlle Fabre**. Te former a été très formateur pour moi alors merci d'avoir tenu le coup et suivi le rythme pendant ton master. Je n'ai malheureusement pas été très présente pendant ton master 2 mais je savais que mes recherches étaient entre de bonnes mains. Bon courage pour la suite, qui s'annonce déjà bien partie !

Merci aux médecins de l'équipe, passés ou présents, les **Drs Ronan DeQuelen, Lénaïg Abily-Donval, Vianney Girard, Fabien Turrel et Florent Marguet**. Sans vous la recherche n'a pas de sens alors merci de partager notre passion et merci pour toutes ses conversations enthousiasmantes qui nous ancrent dans la réalité.

Merci à mes amis du laboratoire voisin, l'ADEN, copains d'infortune, **Nicolas, Jonathan, Romain, Karim et Séverine**. Nos aventures dans le froid lillois resteront gravées dans ma mémoire. Merci pour les coups de main, les prêts de consommable, les conversations



enrichissantes et surtout merci pour votre bonne humeur à tous. Vous croiser dans les couloirs est toujours un réel plaisir.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer pendant ma thèse. Merci au **Dr Sara Cipriani** d'avoir autant partagé tes connaissances avec moi ainsi que pour ton enthousiasme à la paillasse. Merci à **Gaëtan Riou** du Service Commun de Cytométrie en Flux de l'IRIB d'avoir donné autant de ton temps et de ton énergie pour nos travaux. Merci pour ton professionnalisme, ton énergie et ton savoir. Merci au **Dr Sébastien Feuillet** pour m'avoir fait un peu découvrir le monde passionnant de la drosophile. Merci d'avoir toujours gardé ton sourire et ton enthousiasme malgré toutes ces « manip du siècle » loupées !

Merci au personnel de la plateforme PRIMACEN pour leur expertise et leur grande implication dans ces travaux. Merci aux **Dr Ludovic Galas, Damien Schapman et Alexis Lebon** pour tout le temps et l'énergie que vous nous avez consacré. Un merci tout particulier au **Dr Magalie Benard** pour ta patience et ta gentillesse. Monter à Mont-Saint-Aignan pour travailler avec toi était un bonheur et j'espère que nous aurons encore l'occasion de le faire, tu as encore beaucoup de chose à m'apprendre.

Merci aux **Dr Fabrice Morin et Anthony Falluel** qui m'ont accueilli et formé pendant ma mission enseignement. Avec vous, répéter le même TP de nombreuses fois a été passionnant et différent à chaque séance. Apprendre à enseigner avec vous deux a été très enrichissant et m'a profondément marqué. Merci pour votre implication quotidienne dans la formation des futurs chercheurs.

Je terminerai ces remerciements par **ma famille**, mon soutien quotidien et mon moteur dans la vie. J'ai l'habitude de dire que j'ai une famille originale et rapiécée de partout mais c'est pour ça que je l'aime. Plus on est de fou, plus il y a d'amour ! Alors merci à tous autant que vous êtes, j'ai la chance d'avoir une grande et belle famille. Un merci tout particulier à mon **Papa** qui m'a transmis son amour pour les sciences et la rigueur qu'elles imposent. Ces nombreuses heures à faire mes mathématiques et ma physique m'ont bien formée on dirait. J'espère que ces travaux te plairont car dedans il y a forcément un peu de toi.

---

## REMERCIEMENTS

---

Merci à mes deux petites sœurs, **Charlotte et Coline**, vous m'impressionnez tous les jours un peu plus par les femmes que vous êtes devenues. Merci d'être toujours présentes, même à l'autre bout de la France. Merci d'être vous et merci d'être nous.

Merci à mon compagnon **Mickaël**, mon meilleur ami et mon bras droit dans la vie de tous les jours. Merci pour toutes les heures que tu as passé à m'écouter parler boulot. C'est la fin d'une aventure mais nous en avons tellement d'autres à partager ensemble ! Merci d'être un aussi bon père pour notre petite fille, je ne pouvais rêver mieux.

Mon dernier remerciement est adressé à ma petite princesse, **Ambre**. Te voir grandir tous les jours me remplit de fierté et d'amour. Merci d'égailler nos vies comme tu le fais. Un jour peut-être liras-tu ces pages, fais attention à toi, il paraît que l'amour des sciences est contagieux...



## PUBLICATIONS

- **Léger C**, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frebourg T, Leroux P, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ.  
**« Glutamate controls migration of GABA interneurons in the pial migratory route via endothelial proteases and NMDA receptors »** Soumis dans Cerebral Cortex.
- **Léger C**, Dupré N, Hauchecorne M, Aligny C, Vivien D, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.  
**« Prenatal ethanol exposure impacts long term integration of GABAergic interneurons via the endothelial NMDA receptor »**. En préparation.

## COMMUNICATIONS ORALES

- **Léger C**, Aligny C, Hauchecorne M, Dupre N, Roux C, Ramdani Y, Lebon A, Bénard M, Galas L, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Leroux P, Gonzalez BJ.  
« Le glutamate stimule les activités endothéliales de la MMP-9 et du tPA chez la souris nouveau-née et stimule la migration des neurones GABAergiques immatures ». Journée Francophone de Recherche en Néonatalogie. Paris 2016.
- **Léger C**, Hauchecorne M, Dupré N, Aligny C, Vivien D, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.  
« Une exposition prénatale à l'éthanol altère l'intégration à long terme des interneurones GABAergiques et l'activité endothéliale corticale ». Journée Francophone de Recherche en Néonatalogie. Paris 2015.
- **Léger C**, Aligny C, Hauchecorne M, Dupre N, Roux C, Ramdani Y, Lebon A, Bénard M, Galas L, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Leroux P, Gonzalez BJ.  
« Glutamate increases endothelial t-PA and MMP-9 activities in cortical microvessels from mouse neonates and stimulates migration of immature GABA interneurons ». **Communication Primée**. Congrès LARC Neurosciences. Amiens 2015.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- Marion Dumanoir, Camille Sautreuil, Maryline Lecointre, Sara Cipriani, **Cécile Léger**, Maëlle Fabre, Michelle Hauchecorne, Pierre Gressens, Gwenola Boulday, Elisabeth Tournier-Lasserre, Stéphane Marret, Bruno Gonzalez and Carole Brasse-Lagnel  
« Effect of prenatal alcohol exposure (PAE) on the retinal vascular network: involvement of the CD146 protein ». Congrès LARC Neurosciences. Lille 2017.
- Marion Dumanoir, Camille Sautreuil, Maryline Lecointre, Sara Cipriani, **Cécile Léger**, Maëlle Fabre, Michelle Hauchecorne, Pierre Gressens, Gwenola Boulday, Elisabeth Tournier-Lasserre, Stéphane Marret, Bruno Gonzalez and Carole Brasse-Lagnel  
« Effect of prenatal alcohol exposure (PAE) on the retinal vascular network: involvement of the CD146 protein ». Journée Normande de Recherche Biomédicale. Caen 2017.
- **Léger C**, Hauchecorne M, Dupré N, Aligny C, Vivien D, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.  
« Une exposition prénatale à l'alcool perturbe la corticogénèse chez la souris nouveau-né en perturbant la migration des interneurons GABAergiques ». Journée de l'École Doctorale NBISE. Caen 2016.
- **Léger C**, Hauchecorne M, Dupré N, Aligny C, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.  
« Prenatal ethanol exposure impacts long term integration of GABAergic interneurons via the endothelial NMDA receptor ». Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen 2016.
- **Léger C**, Aligny C, Hauchecorne M, Dupre N, Roux C, Ramdani Y, Lebon A, Bénard M, Galas L, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Leroux P, Gonzalez BJ.  
« GABAergic interneurons migration is stimulated by glutamate during neurodevelopment in mouse neonate by stimulating tPA and MMPs endothelial activities ». Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen 2016.
- **Léger C**, Hauchecorne M, Dupré N, Aligny C, Leroux P, Carmeliet P, Marret S, Gonzalez BJ.  
« Prenatal exposure to alcohol impairs the long term integration of GABA interneurons and the proteolytic endothelial activity in Gad67-GFP mice ». Congrès LARC Neurosciences. Rennes 2016.

- **Léger C**, Hauchecorne M, Dupré N, Aligny C, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.  
« Prenatal exposure to alcohol impairs the long term integration of GABA interneurons and the proteolytic endothelial activity in mouse neonates ». **Communication Primée**. 24th congress of pharmacovigilance. Toronto- Canada 2016.
- **Léger C**, Aligny C, Hauchecorne M, Dupré N, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ  
« Prenatal exposure to ethanol impairs the long term integration of GABA interneurons and the endothelial activity ». **Communication Primée**. Journée scientifique de l'Institut de la Recherche et d'Innovation Biomédicale. Rouen 2015.
- **Léger C**, Aligny C, Hauchecorne M, Dupré N, Roux C, Ramdani Y, Benard M, Gallas L, Vivien D, Marret S, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ  
« Glutamate increases endothelial t-PA and MMP-9 activities in cortical microvessels from mouse neonates and stimulates migration of immature GABA interneurons ». Journée scientifique de l'Institut de la Recherche et d'Innovation Biomédicale. Rouen 2015.

## ENSEIGNEMENTS

Mission d'enseignement 2016-2017 – Université des Sciences et Techniques de Rouen.

Niveau licence 3 et 1<sup>ère</sup> année ESITech : Physiologie Animale (TP)

## ENCADREMENT DE STAGIAIRES

- Elève de 3<sup>ème</sup> : Gauthier SOUIL – 1 semaine
- Licence 3 Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement. Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Physiologie (B2MCP) : Maëlle FABRE – 4 semaines
- Master 1 Neurosciences : Maëlle FABRE – 2 mois
- Master 2 Neurosciences : Maëlle FABRE – 5 mois
- 1<sup>ère</sup> année ESITech spécialité technologie du vivant: Angélique SARROSQUY – 1 mois

## FORMATIONS

- Expérimentation Animale niveau 1 (2015)
- Formation à la Mission Enseignement à l'ESPE (2016)
- Formation à la conduite d'autoclave (2016)
- Formation Biostatistiques – Niveau 1 (2016)
- Ma thèse en 180 secondes (2016)

Les lésions cérébrales représentent la première cause de décès ou de handicaps acquis chez les nouveau-nés. Ces lésions peuvent entraîner des paralysies cérébrales à la fois chez les enfants nés prématurés et à terme. En dépit des progrès réalisés dans le domaine de la néonatalogie, la prévalence des paralysies cérébrales reste élevée et de l'ordre de 2,5 enfants pour 1000 naissances. La physiopathologie de ces lésions est complexe et implique de nombreux processus tels que l'inflammation, l'hypoxie ou encore le stress oxydatif. Il est également connu que la libération massive de glutamate consécutive à un accident hypoxo-ischémique conduit à un stress cellulaire de nature excitotoxique qui contribue également au développement de ces lésions cérébrales. En particulier, en raison de sa haute perméabilité au calcium, le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) joue un rôle important dans la mort cellulaire excitotoxique.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur au sein du système nerveux central. Pendant le développement cérébral, une dérégulation de la transmission excitatrice glutamatergique va entraîner un déséquilibre de la balance excitation/inhibition, qui pourra persister à l'âge adulte. De nombreuses stratégies de neuroprotection ont été étudiées afin de limiter les effets délétères du glutamate lors d'un stress excitotoxique en ciblant notamment le récepteur NMDA. De plus, le cerveau de nouveau-né peut être exposé à des antagonistes du récepteur NMDA au cours de sa vie, comme par exemple à la kétamine, un anesthésique pédiatrique utilisé en clinique pour diminuer la douleur lors de certains actes médicaux comme par exemple l'intubation. Chez l'adulte, des antagonistes du récepteur NMDA, tels que la mémantine ou le MK-801, sont efficaces pour réduire le volume des lésions et atténuer leurs conséquences fonctionnelles et comportementales. Cependant, en s'appuyant sur des données préclinique et clinique, l'innocuité des antagonistes du récepteur NMDA dans le cerveau en développement est controversée et certaines études suggèrent qu'ils pourraient générer des déficits neurologiques et psychiatriques pouvant persister à long terme. Toutes ces données suggèrent que les antagonistes du récepteur NMDA pourraient en période périnatale perturber un rôle trophique du glutamate via le récepteur NMDA.

Les neurones GABAergiques immatures sont particulièrement sensibles aux antagonistes NMDA. Ainsi, une exposition du cerveau fœtal à la kétamine ou au MK-801 augmente la mort de nature autophagique et apoptotique des précurseurs GABAergiques présents dans les couches corticales superficielles et originaires des éminences ganglionnaires. Ces



interneurones GABAergiques migrent de manière tangentielle à travers le néocortex en étroite interaction avec le réseau vasculaire en suivant les voies de migration piale et périventriculaire. De plus, il a été démontré qu'en période périnatale les cellules endothéliales constituant les microvaisseaux cérébraux possèdent des récepteurs NMDA fonctionnels. Plus précisément, ces récepteurs, dont l'expression des sous-unités va évoluer en fonction de l'âge, vont moduler la sécrétion de protéases endothéliales. Toutes ces données ont donc suggéré l'hypothèse d'un rôle du glutamate via le récepteur NMDA endothélial sur le contrôle de la migration des interneurones GABAergiques dans la voie de migration piale.

L'alcool est un antagoniste du récepteur NMDA, il est également connu de longue date pour son impact délétère sur le neurodéveloppement. Toutefois, alors que i) chez l'adulte, l'alcool a des effets sur le système cardio-vasculaire, ii) pendant le développement, l'angiogenèse cérébrale et concomitante avec la neurogenèse, et iii) les cellules endothéliales immatures secrètent des facteurs neurotrophiques, les interactions entre alcool, cellules endothéliales et intégration neuronale ont été très peu étudiées. En particulier, les interneurones GABAergiques issus des éminences ganglionnaires médianes du télencéphale basal rejoignent le néocortex par migration tangentielle vasculo-dépendante et des travaux récents du laboratoire, réalisés chez la Souris et chez l'Homme, ont démontré une perturbation de l'angiogenèse corticale suite à une alcoolisation in utero. Cet effet de l'alcool sur l'angiogenèse coïncide temporellement et régionalement avec la fenêtre de mise en place des interneurones GABA. Au vu de ces données de la littérature, nous avons donc émis l'hypothèse qu'une exposition in utero à l'alcool, en dérégulant l'activité endothéliale, allait impacter l'intégration moléculaire, morphométrique et fonctionnelle des interneurones GABAergiques.

L'objectif de la première étude a consisté à déterminer le rôle du glutamate dans la migration vasculo-dépendante des interneurones GABAergiques. Cette étude a été réalisée chez des souris Gad67-GFP et Gad67-GFP/tPA-/- et a permis de démontrer que i) les cellules endothéliales constituant la voie de migration piale expriment la MMP-9, le t-PA et la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA, ii) le glutamate stimule les activités MMP-9 et t-PA dans la voie de migration piale via le récepteur NMDA, iii) le glutamate stimule la migration des neurones GABAergiques immatures dans la voie de migration piale et le long des vaisseaux radiaux via des mécanismes NMDA et t-PA dépendants et iv) l'inactivation du t-PA et/ou

l'injection in vivo d'un inhibiteur de MMP, le GM6001, entraîne un défaut de positionnement des interneurones GABAergiques dans les couches corticales superficielles et accroît l'activité locomotrice des jeunes souris. En conclusion, ces travaux ont mis en évidence que le glutamate contrôle la migration des interneurones GABAergiques en stimulant les activités MMPs et t-PA endothéliales via son action sur le récepteur NDMA endothélial.

L'objectif de la seconde étude a consisté à étudier l'effet d'un traitement in utero à l'alcool sur la survie, la mise en place et l'intégration des neurones GABAergiques chez des souris Gad67-GFP. Cette étude a permis de démontrer que i) un traitement à l'éthanol n'a pas d'effet sur la mort apoptotique des précurseurs GABAergiques dans les éminences ganglionnaires sur des tranches de cerveaux à E15, ii) un traitement à l'éthanol inhibe la stimulation par le glutamate des activités MMPs et t-PA endothéliales dans la voie de migration piale des interneurones GABAergiques sur des tranches de cerveaux à P2 et iii) un traitement in utero à l'alcool entraîne une augmentation du nombre de neurones GABAergiques ainsi que de leur densité en épines dendritiques dans le néocortex à P15. En conclusion, l'ensemble de ces données démontre qu'une alcoolisation in utero perturbe l'angiogenèse cérébrale et que cet effet résulte au moins en partie d'une action directe de l'éthanol sur l'activité endothéliale cérébrale. Cet effet est associé à une altération de la mise en place de la population des neurones GABAergiques corticaux.

En conclusion générale, ces travaux qui reposent sur des observations pré-cliniques et cliniques indiquent que le récepteur NMDA endothélial est impliqué dans la régulation de l'activité des protéases endothéliales (MMPs et tPA). D'un point de vue neurodéveloppemental, cet effet participerait activement au contrôle de la migration des interneurones GABAergiques le long de la voie piale. D'un point de vue pathologique, ces travaux apportent un éclairage nouveau quant aux effets de l'exposition in utero à l'alcool sur le développement du cerveau fœtal en proposant une contribution endothéliale dans les anomalies de migration des interneurones GABAergiques. Ces travaux ouvrent des perspectives d'études à l'interface avec la clinique et notamment sur la compréhension des mécanismes associés aux troubles du comportement observé chez les enfants exposés in utero à l'alcool.

Brain injuries are the main cause of death and acquired disabilities in newborns. This lesions constitute a major cause of cerebral palsy in both pre-term and term infants. Despite advances in neonatology, the prevalence of cerebral palsy stays high and affects 2.5 children per 1000 births. The physiopathology of these lesions is complex and involves several processes such as inflammation, hypoxia or oxidative stress. It's also well established that the massive release of glutamate due to hypoxia-ischemia leads to an excitotoxic cellular stress and contribute to brain lesions development. In particular, because of its high permeability to calcium, the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) has been shown to play a key role in excitotoxic death.

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. During brain development, dysregulation of glutamatergic excitatory transmission will cause a dysregulation of the excitation/inhibition balance, which can persist in adults. Many therapeutic strategies have been studied to prevent the deleterious effects of glutamate during an excitotoxic stress by targeting the NMDA receptor. Moreover, the brain of human neonates can be also exposed to NMDA antagonists along his life, such as ketamine, an anesthetic used in neonatal pediatrics department to reduce pain during specific clinical practices such as intubation. In adults, the NMDA receptor antagonists, such as memantine or MK-801, are effective to reduce the volume of the lesions and limitate their functional and behavioral alterations. However, based on pre-clinical and clinical publications, the innocuousness of NMDA antagonists in the developing brain is far to be consensual and several research groups mentionned risks of long terme neurologic and psychiatric troubles. Such data strongly suggest side-effects of NMDA antagonists during brain development and support a trophic role of the NMDA receptors.

Immature GABAergic neurons appear to be particularly sensitive to NMDA antagonists. For example, it has been shown that exposure of the fetal brain to ketamine or MK-801 selectively increased the autophagic-mediated and apoptotic deaths of GABAergic precursors localised in superficial cortical layers and generated in the ganglionic eminences. The GABAergic interneurons migrate tangentially through the neocortex in close interaction with the vasculature following pial and periventricular migratory routes. Moreover, it has been demonstrated that endothelial cells in microvessels present functional NMDA receptors during perinatal life. More precisely, NMDA receptor subunits composition will change during

brain development and modulate the endothelial proteases secretion. Altogether, these data suggest the hypothesis of a trophic role of endothelial NMDA receptors contributing in a vascular-dependent role of glutamate on the developmental fate of GABA interneurons migrating along the pial migratory route.

Ethanol is an NMDA antagonist and its deleterious impact on neurodevelopment is now well established. Nevertheless, whereas *i)* in adults, alcohol has effects on cardio-vascular system, *ii)* during the development, cerebral angiogenesis is concomitant with neurogenesis, *iii)* immatures endothelial cells release neurotrophic factors, the interactions between alcohol, endothelial cells and neuronal integration have been poorly studied. In particular, GABAergic interneurons generated in median ganglionic eminence in basal telencephalon reach the neocortex by vasculo-dependant tangential migration and recent works from the laboratory, performed on Mice and Human, have demonstrated cortical angiogenesis perturbations after *in utero* alcoholisation. This effect of alcohol on angiogenesis temporally and regionally coincides with GABAergic interneurons set up window. According to the literature, we hypothesised that *in utero* alcohol exposure, by dysregulating endothelial activity, will impact the GABAergic interneurons molecular, morphometric and functional integration.

**First study objectives** were to determine the glutamate implication in the GABAergic interneurons vasculo-dependant migration. This study was performed on Gad67-GFP and Gad67-GFP/tPA<sup>-/-</sup> mice and demonstrated that *i)* endothelial cells in the pial migratory route express MMP-9, t-PA and GluN1 NMDA receptor subunit, *ii)* glutamate stimulates MMP-9 and t-PA activities in the pial migratory route *via* NMDA receptor, *iii)* glutamate stimulates immature GABAergic interneurons migration in the pial migratory route along radial vessels *via* NMDA and t-PA-dependant mechanisms and *iv)* t-PA invalidation and/or *in vivo* injection of GM6001, a MMP inhibitor, lead to GABAergic interneurons positioning defect in superficial cortical layers and stimulate locomotor activity in young mice. To conclude, this study demonstrates that glutamate controls GABAergic interneurons migration by stimulating endothelial MMPs and t-PA activities *via* endothelial NMDA receptor.

**Second study objectives** were to study the effect of *in utero* ethanol exposure on GABAergic interneurons survival, set on and integration on Gad67-GFP mice. This study demonstrated that *i)* an ethanol treatment on E15 brain slices has no effect on GABAergic precursors apoptotic death in ganglionic eminences, *ii)* an ethanol treatment inhibates

glutamate-induced stimulation on MMPs and t-PA endothelial activities in pial migratory route on P2 brain slices and iii) an *in utero* ethanol treatment increases GABAergic interneurons density and spines density in P15 neocortex. To conclude, this study demonstrate that an *in utero* alcoholisation disturbs cerebral angiogenesis because of the effect of alcohol on cerebral endothelial activities. This effect is associated with GABAergic interneurons set up defects.

In general conclusion, this work based on pre-clinical and clinical observations demonstrates that endothelial NMDA receptor is involved in endothelial proteases activities (MMPs and tPA) regulation. At a neurodevelopmental level, this effect may contribute to control GABAergic interneuron migration along the pial route. At a pathological level, the present studies contribute in clarifying prenatal ethanol exposure effects on fetal brain development by postulating an endothelial contribution in GABAergic interneurons migration anomalies. This work open new study perspectives with clinical interface on the understanding of behavioral disorders observed in *in utero* ethanol exposed children.

<b>AA</b> : acide arachidonique	<b>CTD</b> : <i>C-terminal domain</i>
<b>AAH</b> : protéine aspartyl-asparagily- $\alpha$ -hydroxylase	<b>Cx</b> : cortex
<b>ABD</b> : <i>agonist binding domain</i>	<b>DCX</b> : doublecortine
<b>ACC</b> : <i>anterior cingulate cortex</i>	<b>DLL4</b> : <i>delta Like canonical Notch Ligand 4</i>
<b>ADD3</b> : <i>Adducin 3</i>	<b>Dlx ½</b> : <i>distal-less homeobox ½</i>
<b>ADHD</b> : trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité	<b>EAATs</b> : <i>excitatory amino acid transporters</i>
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>EC</b> : cellules endothéliales
<b>AMPA</b> : $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole-propionate	<b>ECl</b> : potentiel d'équilibre du Cl <sup>-</sup>
<b>AP4</b> : <i>activating enhancer binding protein 4</i>	<b>EG</b> : éminence ganglionnaire
<b>APO</b> : aire préoptique	<b>EGC</b> : éminence ganglionnaire caudale
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>EGCd</b> : éminence ganglionnaire caudale dorsale
<b>bFGF</b> : <i>basic fibroblast growth factor</i>	<b>EGL</b> : éminence ganglionnaire latérale
<b>BDNF</b> : <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	<b>EGM</b> : éminence ganglionnaire médiane
<b>BM</b> : membrane basale	<b>EX</b> : jour embryonnaire X
<b>BMP</b> : <i>bone morphogenetic proteins</i>	<b>FASD</b> : <i>fetal alcohol spectrum disorder</i>
<b>CA3</b> : corne d'Ammon 3	<b>Fb</b> : fibroblaste
<b>CAM</b> : molécule d'adhérence cellulaire	<b>FGF</b> : <i>fibroblast growth factor</i>
<b>CB</b> : calbindine	<b>GDNF</b> : <i>glial cell line derived neurotrophic factor</i>
<b>CB1R</b> : récepteur 1 aux cannabinoïdes	<b>GFAP</b> : <i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>Cl<sup>-</sup></b> : ion chlore	<b>Gi/Go</b> : protéine G de type Gi/Go
<b>CNV</b> : <i>copy number variants</i>	<b>GluN</b> : sous-unités des récepteurs NMDA
<b>Co</b> : collagène	<b>Glut-1</b> : <i>glucose transporter-1</i>
<b>CR</b> : calrétinine	<b>GPCR124</b> : <i>G protein-coupled adhesion receptor</i>

**GRIN1** : *glutamate receptor ionotropic N-methyl-D-aspartate*

**Gq** : protéine G de Gq

**HGF** : *hepatocyte growth factor*

**Hi** : hippocampe

**HIF** : *hypoxia-inducible factor*

**IGF-1** : *insulin-like growth factor 1*

**iGluR** : récepteur ionotrope au glutamate

**IL** : *infralimbic cortex*

**IL-8** : *interleukin-8*

**IMC** : infirmité motrice d'origine cérébrale

**IP3** : inositol triphosphate

**IP3-R** : récepteur de l'inositol triphosphate

**KANK1** : *KN motif and ankyrin repeat domains*

**KCC** :  $K^+Cl^-$  cotransporteur

**LBC** : *large basket cells*

**Lhx6** : *LIM homeobox 6*

**ls** : striatum latéral

**LTD** : dépression à long terme

**LTP** : potentialisation à long terme

**MAGUK** : *membrane associated guanylate kinase*

**Mash1** : *mammalian achaete-scute homolog-1*

**MEC** : matrice extracellulaire

**Mg<sup>2+</sup>** : ion magnésium

**mGluR** : récepteur métabotrope au glutamate

**MMP** : *matrix metalloproteinase*

**Na<sup>+</sup>** : ion sodium

**NBC** : *nest basket cells*

**NCAM** : *neural cell adhesion molecule*

**NGF** : *nerve growth factor*

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**NO** : monoxyde d'azote

**NPY** : neuropeptide Y

**Nrg1** : neuréguline 1

**NT4** : *neurotrophin4*

**NTD** : *N-terminal domain*

**NKCC** :  $N^+K^+Cl^-$  cotransporteur

**Nkx 2.1** : *NK2 homeobox 1*

**PAX** : *PAired boX*

**PC** : plaque corticale

**PIP<sub>2</sub>** : phosphatidylinositol bisphosphate

**PLA<sub>2</sub>** : phospholipase A<sub>2</sub>

**PLC** : phospholipase C

**PPC** : préplaque corticale

**PDGF** : *platelet-derived growth factor*

**PEDF** : *pigment epithelium-derived factor*

**PL** : *prelimbic cortex*

**Pr** : péricyte

**PSC** : plaque sous-corticale

**PSD** : densité post-synaptique

**PV** : parvalbumine

**PX** : jour postnatal X

**R-AMPA** : récepteur du  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoaxole-propionate

**R-NMDA** : récepteur du N-méthyl-D-aspartate

**SAF** : syndrome d'alcoolisation foetal

**SAP102** : *synapse-associated protein 102*

**SBC** : *small basket cells*

**Sema** : sémaphorines

**SG** : semaine de gestation

**SNC** : système nerveux central

**Shh** : *sonic hedgehog*

**smc** : cortex sensorimoteur

**SNP** : système nerveux périphérique

**SST** : somatostatine

**Str** : striatum

**SynCAM1** : *synaptic cell adhesion molecule*

1

**T** : thalamus

**t-PA** : *tissue plasminogen activator*

**TCAF** : troubles causés par l'alcoolisation foétale

**TGF** : *tissue growth factor*

**TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor  $\beta$*

**TMX** : domaine transmembranaire X des sous-unités du récepteur NMDA

**TSP** : thrombospondine

**VE-cadhérine** : *Vascular Endothelial cadhérine*

**VEGF** : *vascular endothelial growth factor*

**VIP** : peptide vasoactif intestinal

**Vm** : potentiel membranaire

**ZI** : zone intermédiaire

**ZM** : zone marginale

**ZO-1** : *Zona Occludin-1*

**ZSV** : zone sous-ventriculaire

**ZV** : zone ventriculaire



<b>Figure 1</b> : Voies moléculaires responsables de l'induction neurale.....	4
<b>Figure 2</b> : Initiation de la formation de la gouttière et du tube neural .....	5
<b>Figure 3</b> : Différenciation des différentes classes de neurones au niveau du tube neural. 5	
<b>Figure 4</b> : Formation des vésicules céphaliques primaires et secondaires.....	6
<b>Figure 5</b> : Origine embryologique des grandes divisions de l'encéphale.....	7
<b>Figure 6</b> : De la vésicule télencéphalique à la formation du cortex cérébral. ....	7
<b>Figure 7</b> : Chronologie des évènements majeurs pendant le développement du cortex cérébral chez l'Homme. ....	8
<b>Figure 8</b> : Divisions cellulaires au niveau de l'endothélium germinatif du néocortex.....	9
<b>Figure 9</b> : Migration radiale des neurones post-mitotiques. ....	11
<b>Figure 10</b> : Formation des six couches corticales chez la Souris.....	11
<b>Figure 11</b> : Molécules de guidance influençant le cône de croissance.....	13
<b>Figure 12</b> : Formation des synapses et localisation du complexe cadhérine-caténine à différents stades de la synaptogenèse.....	14
<b>Figure 13</b> : Intéactions moléculaires impliquées dans la synapse mature. ....	15
<b>Figure 14</b> : Vue schématique de la composition histologique des six couches du néocortex chez l'Homme. ....	17
<b>Figure 15</b> : Développement embryonnaire du polygone de Willis chez l'Homme. ....	19
<b>Figure 16</b> : Cartographies comparant le transcriptome endothélial de trois organes : le cerveau, le cœur et le rein chez la Souris.....	20
<b>Figure 17</b> : Le bourgeonnement vasculaire ou <i>branching</i> . ....	21
<b>Figure 18</b> : Représentations schématiques de la formation d'un pilier au sein d'un vaisseau lors du processus d'intussusception.....	22
<b>Figure 19</b> : Molécules impliquées dans l'angiogenèse.....	23
<b>Figure 20</b> : Représentation schématique de deux modèles aboutissant à la congruence neurovasculaire. ....	24
<b>Figure 21</b> : Effets des facteurs angiogéniques et neurogéniques sur les systèmes nerveux et vasculaire. ....	25
<b>Figure 22</b> : Origine des neurones corticaux chez l'Homme. ....	27
<b>Figure 23</b> : Subdivisions des éminences ganglionnaires chez l'Homme. ....	28
<b>Figure 24</b> : Migration des progéniteurs GABAergiques depuis leur lieu de production jusqu'au néocortex.....	29

<b>Figure 25</b> : Différentes phases de migration des progéniteurs GABAergiques au cours du temps.....	30
<b>Figure 26</b> : Mode de migration des interneurons corticaux. ....	31
<b>Figure 27</b> : Molécules contrôlant la migration des interneurons GABAergiques dans le néocortex. ....	32
<b>Figure 28</b> : Facteurs influençant la migration des interneurons au cours du neurodéveloppement. ....	33
<b>Figure 29</b> : Comparaison des effets excitateurs / inhibiteurs du GABA en fonction de la maturité des neurones.....	34
<b>Figure 30</b> : Expression des facteurs de transcription spécifiques de différents types d'interneurones GABAergiques corticaux au cours de leur genèse, leur migration et de leur maturation.....	35
<b>Figure 31</b> : Caractéristiques morphologiques des interneurons GABAergiques. ....	39
<b>Figure 32</b> : Les différents types de récepteurs au glutamate. ....	41
<b>Figure 33</b> : Architecture transmembranaire d'un récepteur NMDA. ....	43
<b>Figure 34</b> : Distribution des ARNm des sous-unités GluN1-1a et 1b au niveau du SNC chez le Rat.....	44
<b>Figure 35</b> : Distribution des ARNm des sous-unités GluN1 et GluN2 au niveau du SNC chez le Rat.....	45
<b>Figure 36</b> : Expression des sous-unités GluN1, GluN3A et GluN3B chez le Rat au cours du développement. ....	46
<b>Figure 37</b> : Conductance des récepteurs NMDA en fonction de leur composition en sous-unité GluN2. ....	47
<b>Figure 38</b> : Cinétique de désactivation des récepteurs NMDA en fonction de leur composition en sous-unités GluN2. ....	48
<b>Figure 39</b> : Schéma illustrant les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique.....	51
<b>Figure 40</b> : Etiologie des lésions cérébrales du nouveau-né.....	54
<b>Figure 41</b> : Illustration des effets d'une alcoolisation <i>in utero</i> chez l'Homme. ....	55
<b>Figure 42</b> : Illustration des effets d'une alcoolisation <i>in utero</i> chez la Souris. ....	59
<b>Figure 43</b> : Modifications épigénétiques de gènes impliqués dans le neurodéveloppement et induites par une alcoolisation <i>in utero</i> . ....	63

<b>Figure 44:</b> Perturbation de l'orientation radiale des microvaisseaux cérébraux après une alcoolisation périnatale chez l'Homme et chez la Souris.....	64
<b>Figure 45:</b> Une alcoolisation <i>in utero</i> promeut la migration des interneurons issus des EGM.....	66

INTRODUCTION.....	1
<b>I. Développement du néocortex cérébral .....</b>	<b>3</b>
1. Les étapes de la neurogenèse .....	3
a. <i>La neurulation</i> .....	3
b. <i>Développement des vésicules céphaliques</i> .....	6
2. Mise en place du cortex cérébral .....	8
a. <i>Prolifération cellulaire</i> .....	8
b. <i>Migration cellulaire</i> .....	10
c. <i>Différenciation neuronale et synaptogenèse</i> .....	12
d. <i>Cytoarchitecture du néocortex cérébral</i> .....	16
3. Le réseau vasculaire cérébral .....	18
a. <i>Mise en place du réseau vasculaire cérébral</i> .....	18
b. <i>Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse</i> .....	19
c. <i>Mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse</i> .....	22
d. <i>Interactions entre les systèmes vasculaires et les cellules neurales</i> .....	23
<b>II. Développement du système GABAergique cortical .....</b>	<b>26</b>
1. Mise en place des interneurons GABAergiques.....	26
a. <i>Production des interneurons GABAergiques</i> .....	26
b. <i>Migration des interneurons GABAergiques</i> .....	28
2. Maturation cérébrale et rôle excitateur/inhibiteur du système GABAergique.....	33
3. Les différentes populations d'interneurons GABAergiques .....	35
a. <i>Les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine</i> .....	36
b. <i>Les interneurons GABAergiques exprimant la somatostatine</i> .....	37
c. <i>Les interneurons GABAergiques exprimant le neuropeptide Y</i> .....	37
d. <i>Les interneurons GABAergiques exprimant la calrétinine</i> .....	38
e. <i>Population particulière d'interneurons GABAergiques : les « neurones Hub »</i> .....	39
<b>III. Rôle du glutamate pendant le neurodéveloppement .....</b>	<b>40</b>
1. La neurotransmission glutamatergique .....	40
2. Le récepteur NMDA.....	42
a. <i>La sous-unité GluN1</i> .....	43
b. <i>La sous-unité GluN2</i> .....	44

c.	<i>La sous-unité GluN3</i> .....	45
d.	<i>Propriétés électrophysiologiques du récepteur NMDA</i> .....	46
3.	Glutamate et neurodéveloppement .....	48
4.	Excitotoxicité et pathologies cérébrales associées .....	49
5.	Rôles du système glutamatergique dans les lésions cérébrales du nouveau-né .....	52
<b>IV.</b>	<b>L'alcoolisation prénatale</b> .....	<b>55</b>
1.	La consommation d'alcool pendant la grossesse et ses conséquences .....	55
2.	Mécanismes d'action de l'éthanol .....	59
a.	<i>La fenêtre d'exposition à l'éthanol</i> .....	59
b.	<i>Les cibles de l'alcool</i> .....	60
c.	<i>L'éthanol et la mort cellulaire</i> .....	62
d.	<i>L'éthanol et l'expression génique</i> .....	62
3.	Effet d'une alcoolisation prénatale sur la mise en place du réseau vasculaire cérébral .....	64
4.	Effet d'une alcoolisation prénatale sur la migration neuronale .....	65
	OBJECTIFS DE LA THESE .....	67
	RESULTATS .....	70
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	67
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	174

---

# INTRODUCTION

---



## I. Développement du néocortex cérébral

### 1. Les étapes de la neurogenèse

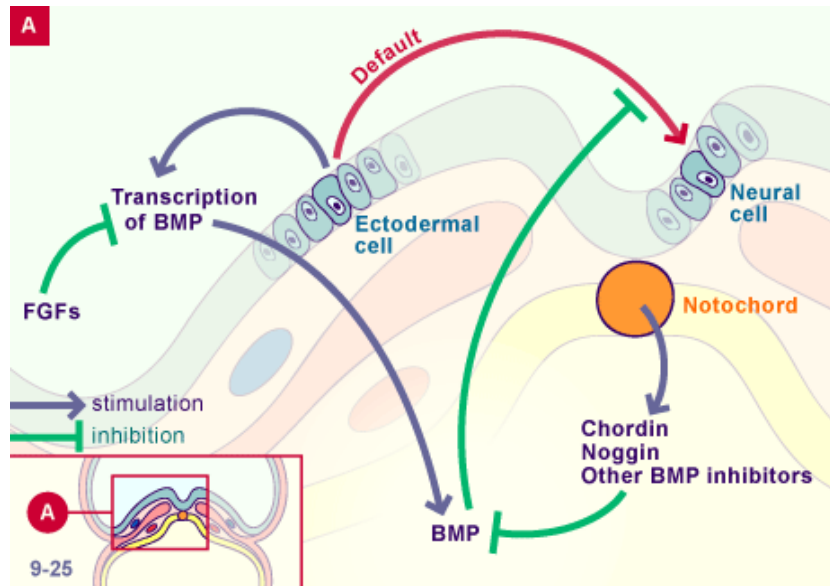
Chez l'embryon humain, la mise en place du système nerveux est un phénomène très précoce et va débiter dès le 19<sup>ème</sup> jour de gestation par la formation de la plaque neurale. Le système nerveux central (SNC) est complètement formé dès la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation mais sa maturation perdurera jusqu'au-delà de la naissance.

La neurogenèse débute après l'étape de gastrulation, qui correspond à la mise en place de la polarité antéro-postérieure et médio-latérale de l'embryon ainsi qu'à la formation des 3 feuillet primitifs. L'endoderme, feuillet le plus interne, donnera naissance aux poumons, viscères et foie. Le mésoderme, feuillet intermédiaire, formera les muscles striés, les tissus conjonctifs et le système vasculaire. Enfin, l'ectoderme, feuillet le plus externe, se divisera en neuroectoderme, pour donner naissance aux systèmes nerveux central et périphérique (SNP), et en épiderme (Murry and Keller, 2008).

#### a. La neurulation

La mise en place du système nerveux débute après l'étape de gastrulation par la neurulation. La neurulation peut être décrite comme une séquence cranio-caudale de réarrangements cellulaires entraînant un épaissement du feuillet ectodermique permettant la création de la plaque neurale. L'épithélium ectodermique de cette plaque neurale devient alors un neuroépithélium qui donnera naissance à l'ensemble des cellules du SNC mature, à savoir les neurones et les différentes cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) : c'est l'induction neurale. Plusieurs molécules sont connues pour réguler cette induction neurale, comme celles de la famille des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) qui inhibe la transformation des cellules ectodermales en cellules neurales. La production de Chordin, Noggin ou Cerberus par la notochorde permet de lever l'inhibition des BMP induisant l'induction neurale qui s'effectue par défaut (Sudheer *et al.*, 2012 ; Figure 1).

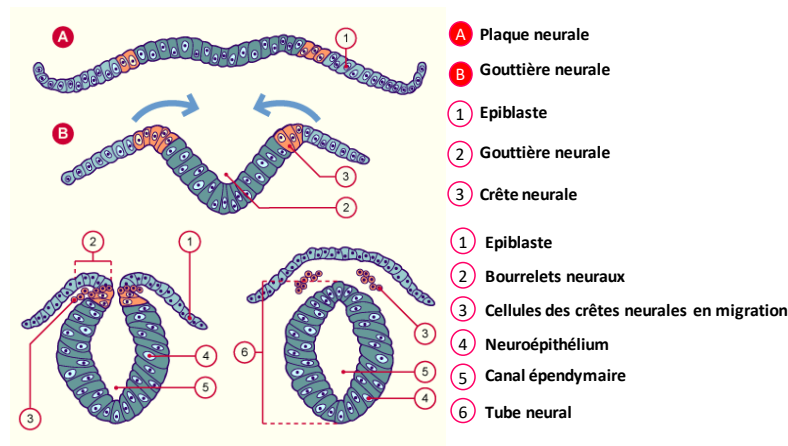




**Figure 1 : Voies moléculaires responsables de l'induction neurale.**

La différenciation des cellules ectodermiques est sous le contrôle des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), qui inhibent l'induction neurale, le processus de différenciation par défaut. La synthèse d'inhibiteurs des BMP, comme Chordin, Noggin ou Cerberus lève l'effet inhibiteur des BMP et permet le processus d'induction neurale. FGF : *Fibroblast Growth Factor*. Modifié d'après Embryologie.ch.

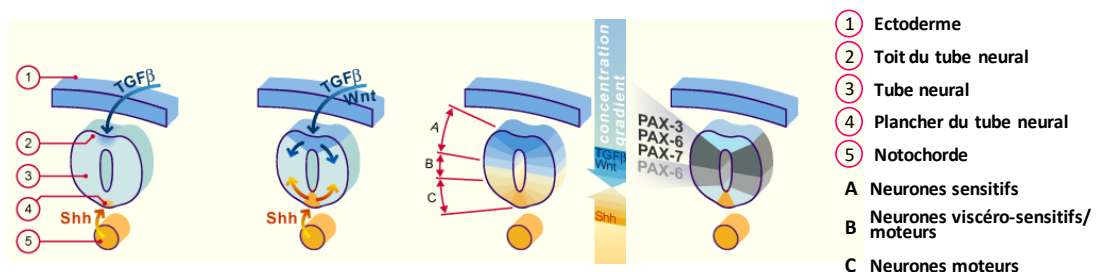
Au 20<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire, les bords latéraux de la plaque neurale vont se soulever et se replier vers l'intérieur transformant la plaque neurale en gouttière neurale. Les lèvres de la gouttière vont ensuite se rejoindre dans le plan médian pour fusionner et former un tube neural entièrement individualisé (O'Rahilly and Müller, 1999; Figure 2). Parallèlement à la fermeture du tube neural, une population de cellules voit le jour au niveau des crêtes neurales. Ces cellules possèdent une grande capacité migratoire ainsi qu'une diversité phénotypique importante et vont donner naissance plus tard aux cellules des ganglions spinaux et végétatifs, aux neurones du système nerveux entérique, aux cellules neurosécrétrices de la médullosurrénale mais également à des éléments non nerveux comme du cartilage, des cellules pigmentaires et du tissu osseux.



**Figure 2 : Initiation de la formation de la gouttière et du tube neural.**

Les bords de la plaque neurale se surélèvent et forment les bourrelets neuraux, délimitant la gouttière neurale. Ils vont ensuite fusionner et former le tube neural. Des amas de cellules se détachent, migrent et formeront les crêtes neurales. Modifié d'après Embryologie.ch.

Les cellules composant le tube neural vont ensuite se différencier en différentes classes de neurones sous l'influence de différents gradients moléculaires. Par exemple, la production de TGF- $\beta$  (*Tissue Growth Factor  $\beta$* ) et de Wnt par l'ectoderme entraînera la différenciation des cellules du toit du tube neural en neurones sensitifs. La production de Shh (*Sonic hedgehog*) par la notochorde va entraîner la différenciation des cellules du plancher du tube neural en neurones moteurs. Les cellules se trouvant à l'interface de ces gradients moléculaires se différencieront quant à elles en neurones viscéro-sensitifs et en neurones moteurs (Figure 3). Ces différents signaux moléculaires vont entraîner l'activation ou l'inhibition de gènes dorsalisants tels que PAX3 et PAX7 (*PAired box*) permettant ainsi la polarisation dorso-ventrale du tube neural (Vazin *et al.*, 2014).

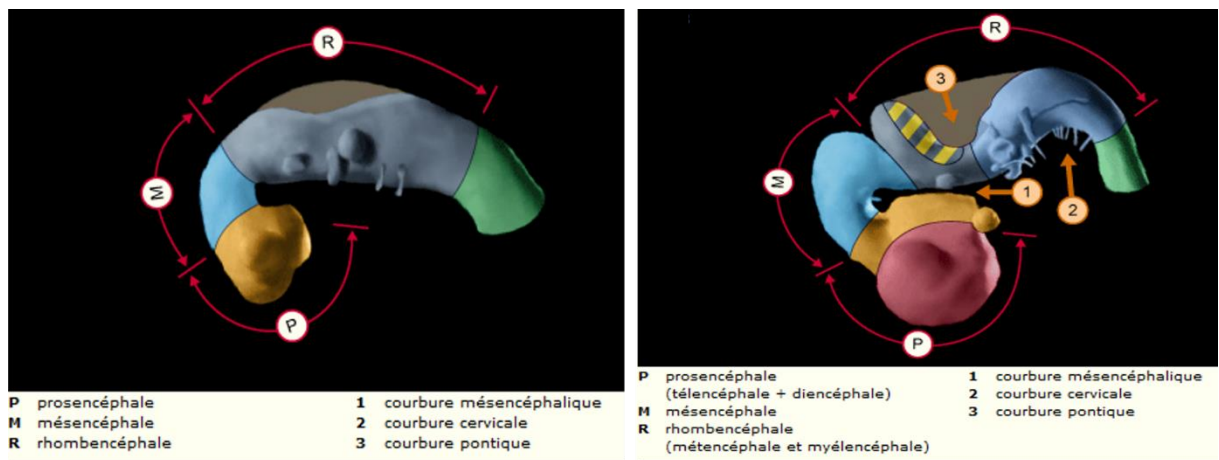


**Figure 3 : Différenciation des différentes classes de neurones au niveau du tube neural.**

Le gradient de signaux moléculaires TGF- $\beta$  (*Tissue growth factor  $\beta$* ) et Wnt va induire la formation de neurones sensitifs. Le gradient de Shh produit par la notochorde est responsable de la formation des neurones moteurs. A l'interface de ces deux gradients, les neurones viscéro-sensitifs et moteurs se différencient. Modifié d'après Embryologie.ch.

**b. Développement des vésicules céphaliques**

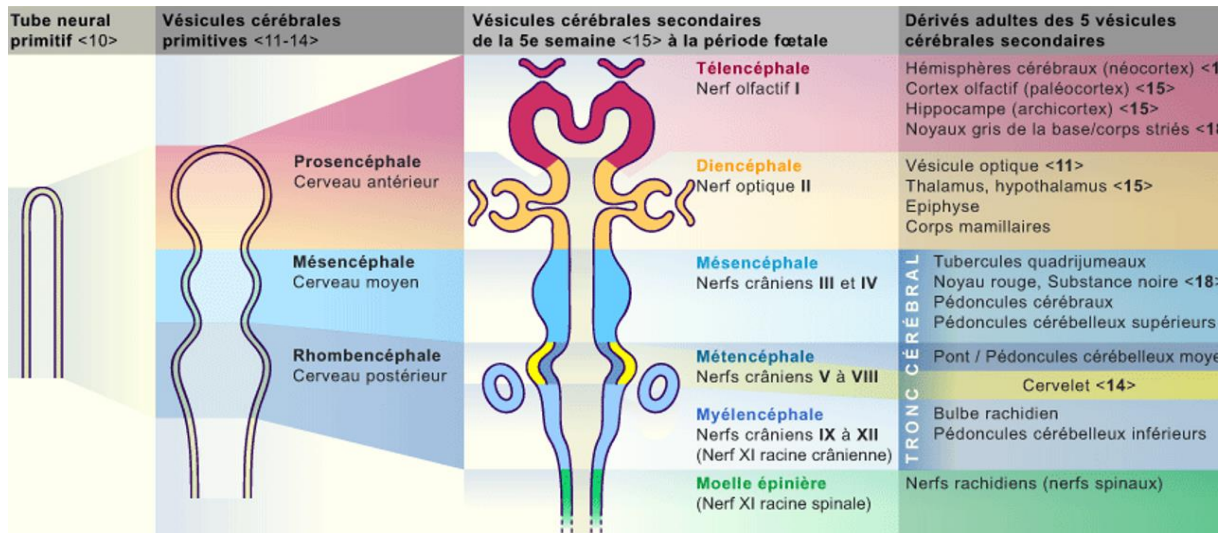
Au 25<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire, les vésicules cérébrales primaires puis secondaires vont se mettre en place à partir du tube neural. En effet, la partie antérieure du tube neural va se recourber en forme de crosse déterminant la courbure du mésencéphale et des cervicales. L'extrémité antérieure de la crosse va se renfler et donner naissance au prosencéphale. Le mésencéphale, quant à lui, va être issu d'une dilatation de la flexion céphalique et le rhombencéphale va se former en position caudale entre les flexions céphalique et cervicale (Figure 4).



**Figure 4 : Formation des vésicules céphaliques primaires et secondaires.**

Le tube neural se subdivise en prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale dans sa partie antérieure et va se différencier en moelle épinière dans sa partie postérieure. Ces vésicules primaires vont se subdiviser en vésicules secondaires à l'exception du mésencéphale et donneront naissance à l'ensemble des structures de l'encéphale. Modifié d'après Embryologie.ch.

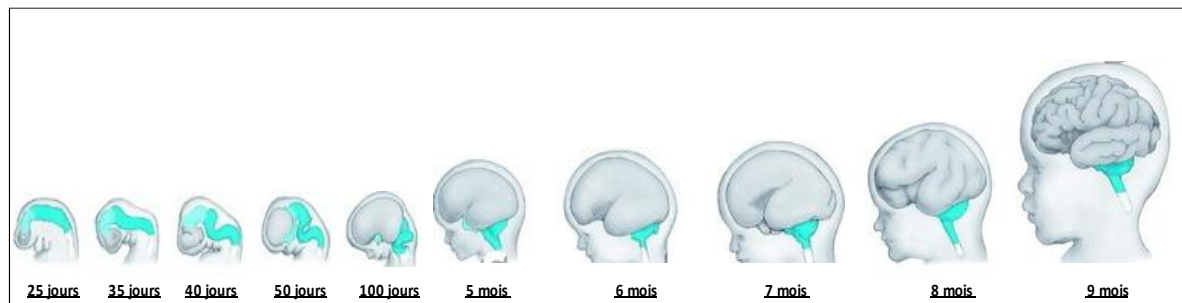
Au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire, ces 3 vésicules cérébrales primaires vont ensuite se subdiviser pour donner naissance aux vésicules cérébrales secondaires. Le prosencéphale va se diviser en télencéphale et en diencéphale et le rhombencéphale en métencéphale et myelencéphale (O'Rahilly and Müller, 1999). Seul le mésencéphale ne se divise pas. Ces 5 vésicules secondaires donneront naissance à l'ensemble des structures nerveuses constituant l'encéphale (Figure 5).



**Figure 5 : Origine embryologique des grandes divisions de l'encéphale.**

Tableau récapitulatif des principales structures de l'encéphale dérivant des vésicules céphaliques embryonnaires. Modifié d'après Embryologie.ch.

Ces 5 vésicules secondaires vont subir alors des modifications pour donner naissance aux structures adultes et définitives. En particulier, la vésicule télencéphalique va subir des déformations importantes pour donner naissance au cortex cérébral. Elle va en effet se diviser selon l'axe de symétrie de l'animal pour former les deux hémisphères cérébraux puis va se développer en direction rostrale, dorsale et caudale pour envelopper le diencéphale et le mésencéphale. A partir du 100<sup>ème</sup> jour et jusqu'à la fin de la gestation, le développement du cortex va s'étendre en direction rostrale, ventrale et latérale puisque limité en direction caudale par la boîte crânienne, recouvrant ainsi l'ensemble des structures nerveuses dérivant des autres vésicules secondaires (Figure 6).

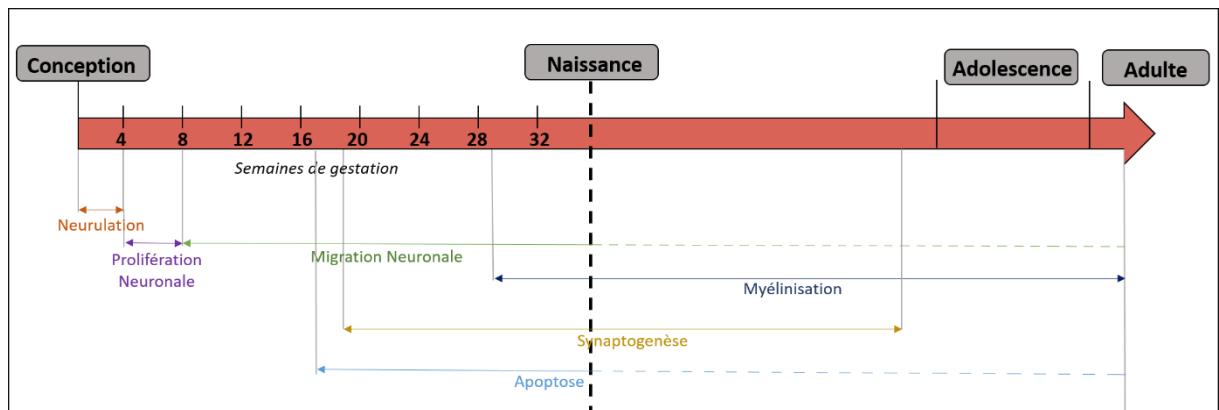


**Figure 6 : De la vésicule télencéphalique à la formation du cortex cérébral.**

Des déformations multidirectionnelles complexes de la vésicule télencéphalique vont être à l'origine de la formation du néocortex, qui à terme, recouvrira les différentes structures nerveuses de l'encéphale.

## 2. Mise en place du cortex cérébral

Le cortex cérébral va se développer entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> mois de gestation chez l'Homme à partir de la partie dorsale du télencéphale. La formation du cortex fait intervenir 5 étapes développementales : la prolifération, la migration, la différenciation, la synaptogenèse puis l'apoptose (Monk *et al.*, 2001). Cette dernière étape correspondant à différentes phases de mort cellulaire programmée, qui ont lieu de manière concomitante avec les autres étapes (Sanes, 2000). Ces différentes étapes d'apoptose sont importantes dans le développement normal des mammifères car elles permettent l'élimination des cellules excédentaires et la régulation du nombre de cellules neuronales et gliales (Figure 7). En effet, au cours de l'embryogenèse 50 à 70 % des cellules nerveuses meurent par ce processus (De Zio *et al.*, 2005).

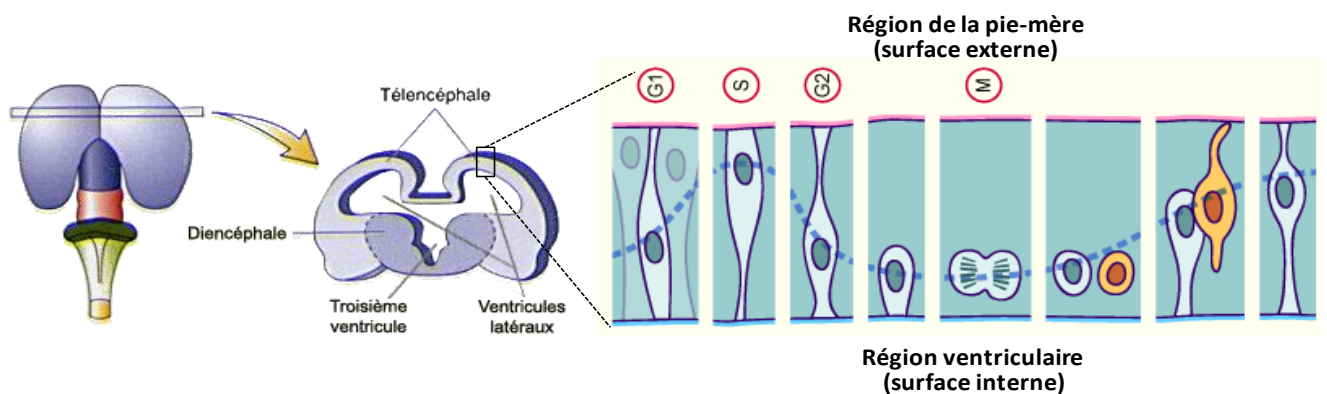


**Figure 7 : Chronologie des événements majeurs pendant le développement du cortex cérébral chez l'Homme.** Cette échelle de temps représente la chronologie des événements majeurs entraînant la formation du cerveau en commençant par la neurulation suivie par les processus de prolifération et migration cellulaire pour terminer par les étapes de synaptogenèse et de myélinisation. A ces trois derniers événements se superpose une phase d'apoptose. D'après Tau and Peterson, 2010

### a. Prolifération cellulaire

Une fois formé, le tube neural est constitué initialement d'une seule couche de cellules épithéliales. La neurogenèse commence par une étape d'intenses divisions cellulaires de ces cellules épithéliales entraînant l'épaississement du neuroépithélium et la formation de la zone ventriculaire (ZV) au contact de la lumière du tube neural. Cette ZV est une zone germinative constituée de cellules neuroépithéliales bipolaires et jointives également appelées cellules souches neurales (Bystron *et al.*, 2008). Ces cellules prolifératives vont émettre des prolongements cytoplasmiques jusqu'à la surface externe du tube neural permettant ainsi la

migration des noyaux cellulaires. En effet, un cycle de division cellulaire débute par une étape de nucléokinèse radiale d'un précurseur de la ZV permettant ainsi la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN ; Caviness and Rakic, 1978; Hollyday, 2001). Une fois cette réplication achevée, les deux noyaux nouvellement formés vont migrer en sens inverse pour regagner la ZV. La cellule proliférative va rétracter son prolongement cytoplasmique et se scinder en deux cellules filles après la mitose. Ce processus de division cellulaire asymétrique permet donc la production de cellules neuronales sans diminuer la réserve de progéniteurs de la ZV (Figure 8 ; Abdel-Mannan *et al.*, 2008). Le destin de ces cellules va dépendre du plan de clivage au cours de la division. En effet, après clivage dans le plan vertical, les deux cellules filles vont demeurer dans la ZV et se diviser à nouveau. Si ce clivage se produit dans le plan horizontal, la cellule fille qui est située le plus loin de la zone ventriculaire ne se divise plus et amorce sa migration (Figure 8, en jaune), tandis que la deuxième recommence un cycle de division.



**Figure 8 : Divisions cellulaires au niveau de l'endothélium germinatif du néocortex.**

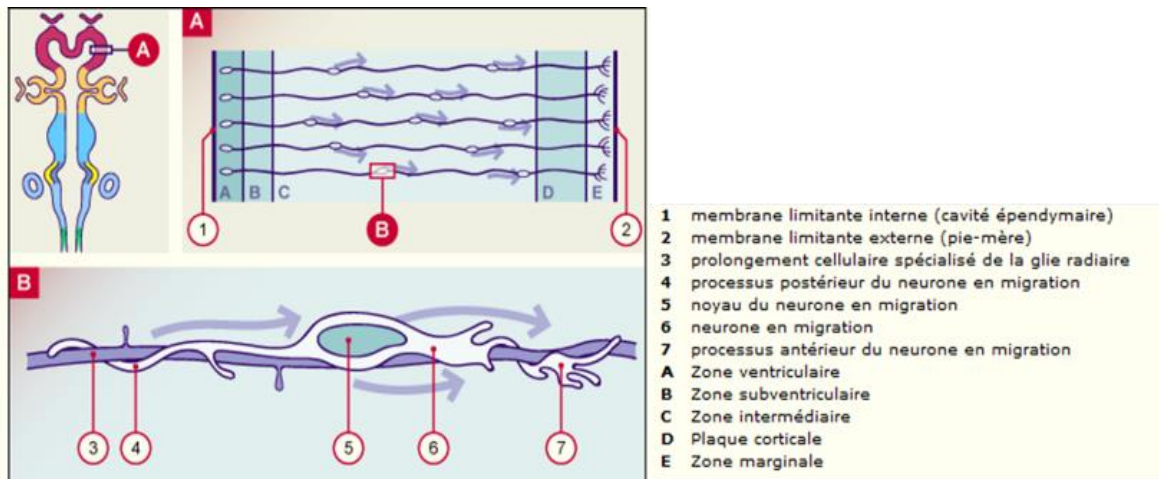
Chaque cellule exécute un déplacement caractéristique se déroulant en plusieurs étapes. Tout d'abord, un cycle de division débute par la nucléokinèse radiale d'un précurseur depuis la zone ventriculaire vers la surface piaie (externe), où se déroule la réplication de l'ADN. Les deux noyaux regagnent ensuite la zone ventriculaire, où le neuroblaste rétracte ses projections cytoplasmiques et se scinde en deux cellules filles qui vont soit demeurer dans la zone ventriculaire et se diviser à nouveau soit amorcer leur migration (en jaune). Modifié d'après Embryologie.ch.

Au bout d'un nombre variable de cycles, certaines cellules filles vont perdre leur capacité à synthétiser de l'ADN, n'émettent plus de prolongements et vont quitter la ZV. L'accumulation de ces cellules progénitrices intermédiaires va permettre la création d'une nouvelle zone germinative, la zone sous-ventriculaire (ZSV ; Caviness Jr. and Takahashi, 1995;

Lui *et al.*, 2011). D'autres cellules filles demeurent dans la ZV où elles entament un nouveau cycle de division jusqu'à ce que tous les neurones de néocortex soient produits. La ZV va générer des neurones corticaux glutaminergiques et GABAergiques ainsi que les premières cellules gliales : la glie radiaire. Les cellules originaires de la ZSV vont subir 1 à 3 divisions symétriques et vont être orientées essentiellement vers un lignage glial (astrocytes et oligodendrocytes ; (Haubensak *et al.*, 2004). Chez l'Homme, la plupart des neurones du néocortex sont générés entre la 6<sup>ème</sup> et la 17<sup>ème</sup> semaine de gestation (Letinić and Kostović, 1997).

### **b. Migration cellulaire**

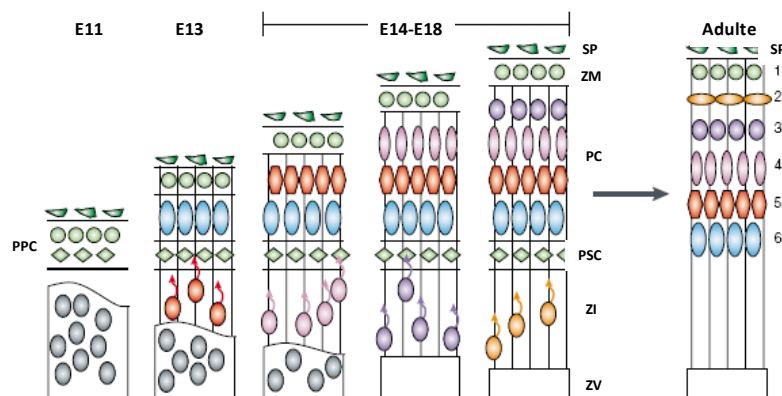
Une fois générés au niveau des zones germinatives, les neuroblastes vont devoir migrer pour atteindre leur position définitive, c'est le début du processus de corticalisation. En effet, la mise en place des 6 couches du cortex cérébral est la résultante de différentes vagues de migration radiale, premier mécanisme permettant la mise en place neuronale (Nadarajah *et al.*, 2003), puis tangentielle dans un deuxième temps (Marín and Rubenstein, 2001). Lors des étapes de migration radiale, le guidage des neuroblastes est assuré par les cellules gliales radiales (Hatten and Mason, 1990). Ce processus de migration se déroule entre le 2<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> mois de gestation chez l'Homme et entre le jour embryonnaire 11 (E11) et 18 (E18) chez la Souris (Gupta *et al.*, 2002). En effet, à E11 chez la Souris, après une accumulation au niveau de la zone ventriculaire, une première vague de neurones post-mitotiques va migrer radialement et établir une première couche neurale transitoire : la préplaque corticale. Cette première vague de migration est suivie à E13 par la migration à travers la zone intermédiaire (ZI) d'une seconde vague de neurones, formant ainsi une nouvelle couche, la plaque corticale (PC), située entre la plaque sous-corticale (PSC) et la zone marginale (ZM ; Caviness Jr. and Takahashi, 1995). Enfin, entre E14 et E18, de nombreuses vagues de migration de neurones post-mitotiques vont avoir lieu en utilisant la glie radiaire comme support (Figure 9).



**Figure 9 : Migration radiale des neurones post-mitotiques.**

Les neuroblastes générés au niveau de la zone ventriculaire vont migrer radialement à travers la zone intermédiaire jusqu'à la plaque corticale qui se forme en dessous de la zone marginale. Cette migration utilise la glie radiaire comme support physique. Modifié d'après Embryologie.ch.

Ces cellules vont traverser la plaque sous-corticale et former les 6 couches du néocortex. Cette morphogenèse corticale s'effectue selon un gradient « *inside-out* » car les premiers neurones générés vont former les couches les plus profondes du cortex (VI, V et IV) alors que les neurones générés plus tardivement vont former les couches les plus superficielles (II et III ; (McConnell and Kaznowski, 1991; Valcanis and Tan, 2003). La plaque sous-corticale, structure transitoire, va disparaître dans les premiers mois suivant la naissance (Figure 10).



**Figure 10 : Formation des six couches corticales chez la Souris.**

A partir du 11<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E11), la préplaque corticale, composée des premiers neurones post-mitotiques migrants, se met en place. Une seconde vague de neurones va générer la plaque corticale. Plusieurs séries de migrations successives ont lieu entre E14 et E18 et vont conduire à la formation des six couches du néocortex. PPC : préplaque corticale ; ZV : zone ventriculaire ; ZI : zone intermédiaire ; PC : plaque corticale ; PSC : plaque sous-corticale ; ZM : zone marginale. Adapté de Gupta *et al.*, 2002.



Dans un deuxième temps, les neuroblastes originaires des éminences ganglionnaires migrent tangentiellement du télencéphale ventral vers le télencéphale dorsal (Marín, 2013; Marín and Rubenstein, 2003) et seront à l'origine des interneurons GABAergiques (Faux *et al.*, 2012). Ce mode de migration sera présenté ultérieurement dans ce manuscrit, dans un chapitre spécifique consacré aux interneurons GABAergiques.

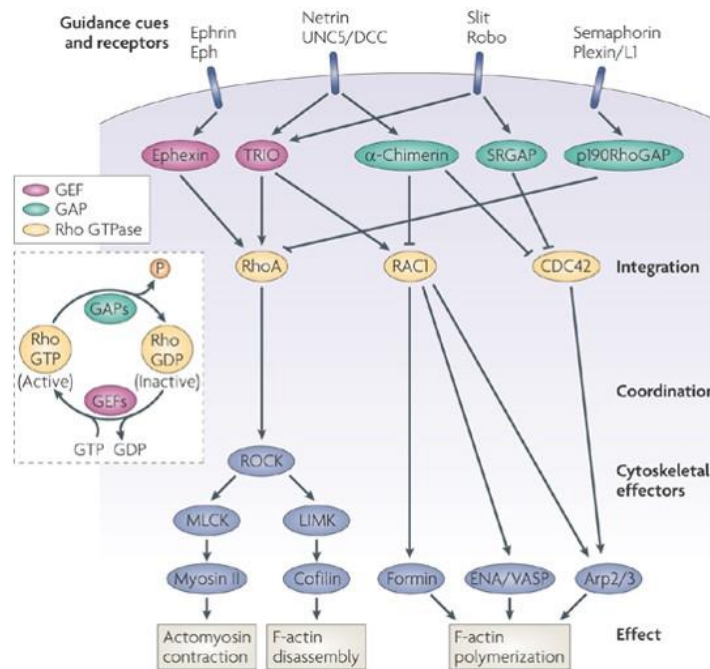
A la fin du développement cortical, le neuroépithélium originellement formé d'une seule couche de cellule est considérablement remanié. La ZV est alors constituée d'une couche unique de cellules épendymaires délimitant les ventricules cérébraux, la ZI forme désormais la substance blanche sous-corticale et la PC est différenciée en cortex cérébral à 6 couches de cellules.

### ***c. Différenciation neuronale et synaptogenèse***

Une fois leur migration jusqu'à leur emplacement définitif achevée, les précurseurs neuronaux vont initier leurs différenciations et établir des connexions entre eux et avec les cellules gliales et les éléments de la matrice extracellulaire (MEC). Les neuroblastes vont donc émettre des prolongements dendritiques et axonaux, parfois sur de longues distances, pour permettre ces connexions intercellulaires et la formation de nombreuses synapses. De nombreuses molécules sont impliquées dans la création des connexions, comme par exemple des molécules d'adhésion cellulaire telles que les *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM), des glycoprotéines présentes sur la surface externe de pratiquement toutes les cellules du SNC. Mais également des N-cadhérines, glycoprotéines dépendantes du calcium dont l'inactivation entraîne une désorganisation importante du cortex (Kadowaki *et al.*, 2007) ou encore des intégrines qui permettent l'ancrage des cellules sur les glycoprotéines de la MEC comme les fibronectines, les laminines et les collagènes (Schmid and Anton, 2003).

Au niveau morphologique, la croissance de l'axone ainsi que son guidage jusqu'à sa destination cible sont assurés par une structure transitoire : le cône de croissance (Marín *et al.*, 2010). Ce dernier va explorer l'environnement extracellulaire sous l'influence de signaux spécifiques. Ses facultés exploratrices sont la conséquence de sa capacité à réorganiser rapidement et de manière très contrôlée le cytosquelette d'actine ainsi que les microtubules en réponse aux signaux environnementaux. En effet, l'extrémité du cône de croissance est

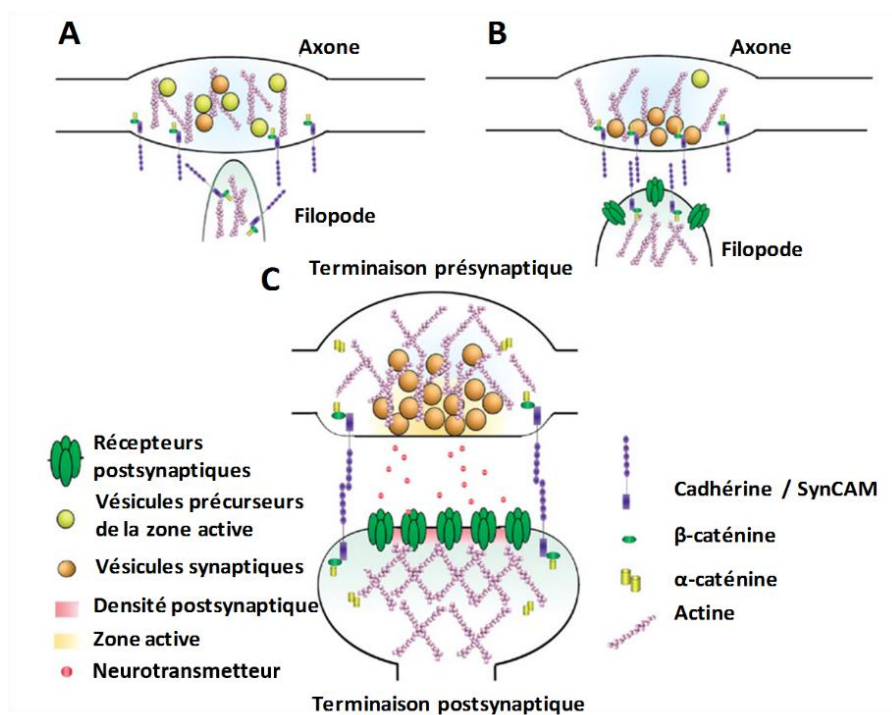
constituée de feuilletts membranaires aplatis, les lamellipodes, desquels partent des filipodes, de fins prolongements de filaments d'actine et de myosine qui vont s'allonger et se rétracter rythmiquement (Luo, 2002). Pour orchestrer le trajet que le neurone va suivre, ces signaux peuvent être répulsifs ou attractifs et soit à proximité permettant par exemple d'éviter une cible inappropriée ou de modifier le trajet de l'axone, ou soit à distance permettant la croissance orientée de l'axone. D'un point de vue moléculaire, il existe 2 types de signaux de guidage de l'axone : des signaux non diffusibles ou diffusibles. Les signaux diffusibles comprennent les molécules de la MEC (laminines, collagènes et fibronectine) et les molécules d'adhérence cellulaire (CAM et cadhérines) alors que les signaux non diffusibles comprennent des signaux chémoattractifs comme les molécules de la famille des nétrines/Slit ou chémorépulsifs comme les sémaphorines ou les éphrines (Figure 11). Ce principe de guidage par chimiotactisme repose sur la présence d'un gradient de concentration de ces molécules diffusibles.



**Figure 11 : Molécules de guidage influençant le cône de croissance.**

Des molécules de guidage comme les éphrines, les nétrines, Slit ou les sémaphorines vont influencer la direction du cône de croissance en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques, ce qui entraîne un réagencement du cytosquelette d'actine. En effet, ces molécules sont capables d'entraîner soit la contraction et le désassemblage du réseau d'actine, soit au contraire entraîner une polymérisation de ce réseau. D'après Lowery and Van Vactor, 2009.

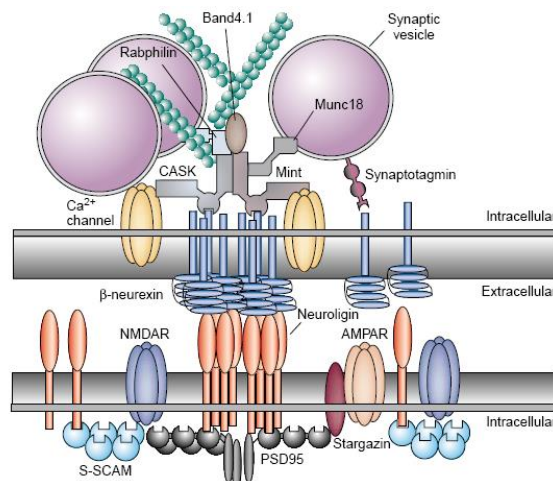
Dès que la cellule cible est atteinte, le cône de croissance se différencie en arborisation terminale et établit des connexions étroites avec cette cellule, connexions nommées synapses qui sont présentes au sein du cortex cérébral chez l'Homme dès la 9<sup>ème</sup> semaine de gestation (Molliver *et al.*, 1973). Cette adhésion cellule-cellule est dépendante du calcium et est régulée par des protéines d'adhésion cellulaire de la famille des cadhérines qui forment des adhésions de faible ou de forte adhérence. En effet, la reconnaissance entre les éléments pré et post-synaptiques est réalisée par l'intermédiaire de protéines contenant un domaine immunoglobuline comme la *Synaptic cell adhesion molecule 1* (SynCAM1) présente au niveau du cône de croissance (Melom and Littleton, 2011) et les cadhérines (Arikath and Reichardt, 2008). Ces protéines, en se liant à l'actine, vont permettre la stabilisation de l'ébauche de la synapse (Figure 12). La réorganisation rapide et persistante du cytosquelette d'actine est indispensable au neurodéveloppement et à la plasticité synaptique (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).



**Figure 12 : Formation des synapses et localisation du complexe cadhérine-caténine à différents stades de la synaptogenèse.**

(A) Initiation de la synaptogenèse avec des contacts naissants entre un axone et un filopode dendritique. A ce stade, la cadhérine est distribuée sur l'ensemble de la structure synaptique. (B) Stabilisation de la structure synaptique avec agglutination de la cadhérine. (C) La synapse mature est caractérisée par une terminaison pré-synaptique contenant des vésicules de neurotransmetteurs et une densité post-synaptique contenant des récepteurs et des protéines d'échafaudage. Adapté de Arikath and Reichardt, 2008.

Après cette reconnaissance locale, une zone pré-synaptique va se développer grâce à un réseau de protéines d'échafaudage appelé cytomatrice qui est caractérisée par une accumulation de vésicules synaptiques et de vésicules de transport ainsi qu'une augmentation des canaux calciques membranaires indispensables au processus d'exocytose. Parallèlement, au niveau post-synaptique, on observe la mise en place d'une région appelée densité postsynaptique ou PSD. Cette jonction intercellulaire spécialisée regroupe des récepteurs aux neurotransmetteurs, des canaux, des protéines de la transduction du signal et un réseau de protéine d'échafaudage comme par exemple PSD95, qui fait partie des MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase* (Dean and Dresbach, 2006), S-CAM ou SAP102 (*Synapse-associated protein 102* (Zheng *et al.*, 2011) qui participe au recrutement des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques au niveau de la synapse excitatrice. Deux protéines apparaissent comme particulièrement impliquées dans la mise en place des connexions synaptiques, la neurexine pré-synaptique et la neuroligine post-synaptique qui possèdent la capacité de se lier l'une à l'autre (Craig and Kang, 2007). La neurexine permet l'accumulation et la stabilisation des vésicules synaptiques ainsi que l'initiation de l'alignement des protéines d'ancrage *via* son domaine transmembranaire. La neuroligine quant à elle, permet également la concentration des récepteurs et des canaux ioniques *via* son interaction avec les protéines post-synaptiques (Figure 13).



**Figure 13 : Interactions moléculaires impliquées dans la synapse mature.**

La liaison entre les neuroligines et les  $\beta$ -neurexines permet la formation et la stabilisation des éléments pré- et postsynaptiques ainsi que la liaison avec des protéines d'échafaudage. Les  $\beta$ -neurexines se lient aux protéines CASK et Mint qui permettent la liaison avec des canaux calciques. Elles sont indispensables à la libération des neurotransmetteurs. Les neuroligines peuvent se lier aux protéines PSD95 et S-CAM qui permettent le recrutement des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Adapté de Dean and Dresbach, 2006.

La consolidation des contacts synaptiques entre les neurones demeure indispensable à la survie des cellules. En effet, il existe une action trophique réciproque entre les éléments pré- et post-synaptiques. Cette interaction repose sur des molécules spécifiques, les neurotrophines comme le NGF (*Nerve Growth Factor*) par exemple, qui va réguler la croissance, la différenciation et donc la survie des neurones. Lorsque des neurones ne forment pas de connexions synaptiques stables, ils ne bénéficient pas de cet apport trophique. On observe alors une atrophie de l'axone ainsi qu'une perte des structures post-synaptiques associées et ces neurones vont dégénérer par apoptose car considéré comme en excès ou mal intégrés.

#### ***d. Cytoarchitecture du néocortex cérébral***

Chez l'Homme, le néocortex est organisé en 6 couches distinctes numérotées de I à VI, de la surface vers la profondeur, possède une épaisseur de 1,5 à 4,5 mm et est constitué de 10 à 16 milliards de neurones (Fischl and Dale, 2000). Ce tissu cortical acquiert une organisation d'autant plus complexe qu'il a à exercer des fonctions importantes. Les 6 couches corticales vont varier en termes de composition et de densité neuronale, ce qui leur confère des fonctions différentes (Figure 14). On peut donc distinguer d'un point de vue histologique :

-La couche I ou couche moléculaire ou plexiforme. Elle contient majoritairement des fibres d'association (axones et prolongements dendritiques) et quelques rares cellules horizontales de Cajal-Retzius.

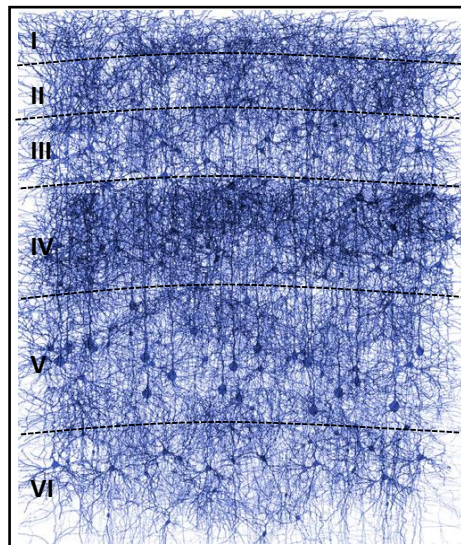
-La couche II ou couche granulaire externe. Elle est constituée d'une population dense de petites cellules pyramidales et étoilées. Elle va recevoir des afférences d'autres aires corticales (connexions cortico-corticales afférentes).

-La couche III ou couche pyramidale externe. Elle contient des cellules pyramidales et étoilées de taille moyenne ainsi que des interneurons dont les axones projettent vers d'autres aires corticales (connexions cortico-corticales afférentes).

-La couche IV ou couche granulaire interne. Elle est composée par une population de cellules réceptrices de petite taille. Elle va recevoir des afférences de l'extérieur du cortex (par exemple du thalamus) et des informations de l'hémisphère opposé (connexions extra-corticales afférentes).

-La couche V ou couche pyramidale interne. Elle est constituée de grandes cellules pyramidales et étoilées : les cellules de Betz dont les dendrites projettent vers les couches I et IV ainsi que vers d'autres aires extra-corticales (tronc cérébral ou moelle épinière).

-La couche VI qui est formée de cellules polymorphes, qui sont des petites cellules pyramidales, étoilées ou fusiformes qui vont envoyer des prolongements sur le thalamus (connexions extra-corticales efférentes).



**Figure 14 : Vue schématique de la composition histologique des six couches du néocortex chez l'Homme.** Les différentes couches corticales sont identifiables par rapport à la morphologie et la densité des neurones qui les composent. Modifié d'après IBM and Switzerland Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.

D'un point de vue fonctionnel, le néocortex est composé d'un cortex sensitif récepteur localisé dans les couches corticales I, II et IV, d'un cortex moteur effecteur dans les couches III et V et d'un cortex associatif qui comprend les couches I et VI.

Au niveau cellulaire, le néocortex est principalement composé de cellules gliales (astrocytes, microglie et oligodendrocytes) et de 2 grandes populations de neurones : les neurones glutamatergiques qui sont excitateurs (dépolarisants) et qui projettent leurs axones au niveau d'autres régions corticales ou à l'extérieur du cortex et les neurones GABAergiques qui sont inhibiteurs (hyperpolarisants) chez l'adulte et qui vont moduler localement l'activité des neurones glutamatergiques (Petroff, 2002).

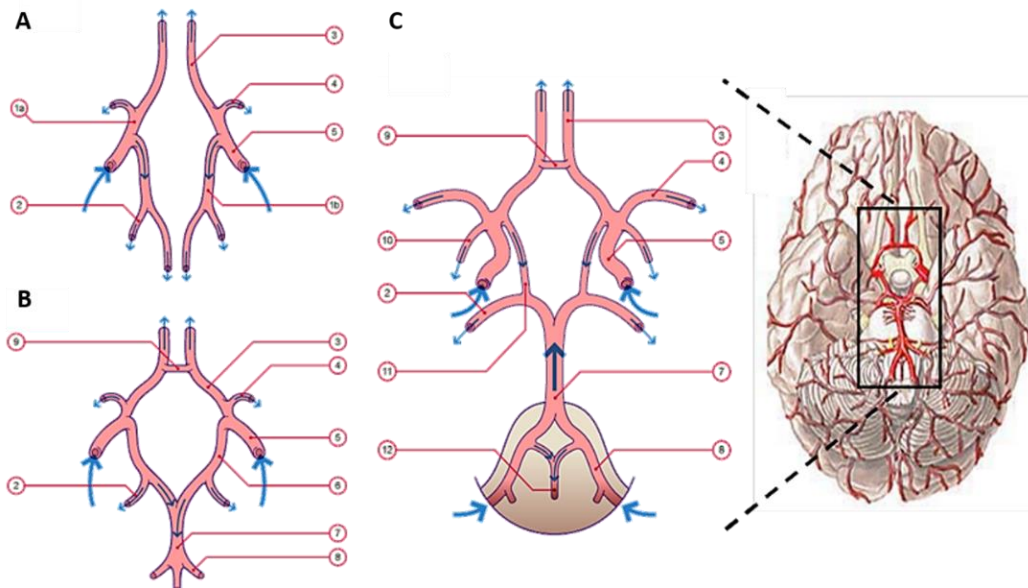
### 3. Le réseau vasculaire cérébral

#### a. *Mise en place du réseau vasculaire cérébral*

La mise en place du réseau vasculaire cérébral commence précocement pendant le neurodéveloppement, dès la 3<sup>ème</sup> semaine de gestation, avant même la fermeture du tube neural. Elle repose sur 2 processus : la vasculogénèse d'une part, qui se caractérise par la formation de vaisseaux sanguins *de novo* par différenciation des angioblastes en cellules endothéliales et qui est propre à la période embryonnaire (Drake, 2003; Risau and Flamme, 1995) et l'angiogénèse d'autre part, qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus d'angiogénèse a lieu aussi bien pendant la période embryonnaire qu'à l'âge adulte, en condition physiologique comme pathologique (Risau, 1997).

Au niveau cérébral, durant la 3<sup>ème</sup> semaine de gestation, les vaisseaux de la pie-mère envahissent le SNC et convergent de façon centripète permettant l'irrigation des ventricules (Bautch and James, 2009; Greenberg and Jin, 2005). Une fois les ventricules atteints, ces premiers vaisseaux, également appelés les perforantes, vont ensuite former des vaisseaux sanguins récurrents ventrifuges. Il s'en suit la mise en place de collatérales par angiogénèse qui vont vasculariser l'ensemble du parenchyme cérébral (Chalothorn and Faber, 2010). Le prosencéphale va être irrigué le premier par les artères carotidiennes internes puis, plus tardivement, le rhombencéphale et le mésencéphale vont être irrigués par le tronc basilaire. Les artères cérébrales sont donc issues de 2 systèmes vasculaires : l'un antérieur dérivant des artères carotidiennes internes et l'autre postérieur issu des artères vertébrales (Figure 15). Au début de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation, ces artères vont se rejoindre et former le polygone de Willis au niveau de la face ventrale du mésencéphale et du diencéphale (Van Overbeeke *et al.*, 1991). Cette structure est agencée de telle manière que le cerveau reçoit en permanence du sang nutritif, même si une des artères le composant est lésée ou obstruée : c'est un système de suppléance. Les artères collatérales issues du polygone de Willis qui vont irriguer les différentes régions du cerveau sont de type terminale, c'est-à-dire qu'elles ne forment pas d'anastomose avec les artères voisines, ce qui explique la gravité des atteintes cérébrales en cas de lésions vasculaires. Cependant, ce système qui gère environ 15 % du débit sanguin de l'organisme possède sa propre régulation, le mettant à l'abri d'éventuelles fluctuations

périphériques (Figure 15 ; Boylan *et al.*, 2000). Chez le rongeur, l'organisation ainsi que l'origine embryonnaire des principales artères cérébrales présente de nombreuses similitudes avec celle de l'Homme, cependant il existe certaines différences majeures dont il faut tenir compte. Par exemple, chez le Rat, l'artère olfactive persiste à l'âge adulte, tandis que chez l'Homme, cette artère est importante chez l'embryon puis régresse progressivement pour ne laisser qu'une petite et inconstante branche à l'âge adulte (Lee, 1995).



**Figure 15 : Développement embryonnaire du polygone de Willis chez l'Homme.**

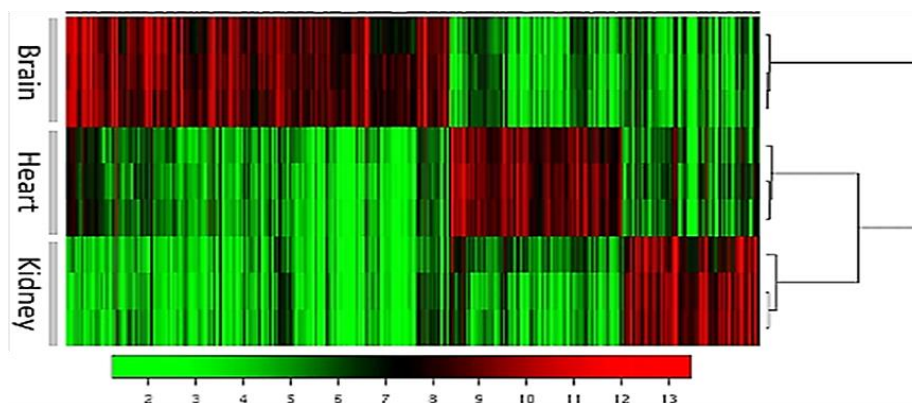
(A) Entre E25 et E41. Initialement la carotide interne présente la seule source artérielle du cerveau. Elle se divise en deux branches antérieure (1a) et postérieure (1b). La branche antérieure bifurque en artère cérébrale moyenne et antérieure, alors que la branche postérieure donne l'artère communicante postérieure. (B) Entre E41 et E46. Les deux artères vertébrales issues des sous-clavières fusionnent et s'unissent avec l'artère spinale antérieure pour former le tronc basilaire. Celui-ci bifurque pour donner naissance aux deux artères communicantes postérieures, qui sont reliées aux artères carotides internes (ou aux artères cérébrales moyennes) par l'intermédiaire des artères communicantes postérieures. Du côté antérieur, les artères cérébrales antérieures ont établi une anastomose par le biais de l'artère communicante antérieure. (C) Entre E46 et E56. L'artère communicante antérieure et la réunion des artères cérébrales postérieures forment un hexagone artériel, le polygone de Willis, à l'origine embryonnaire double : carotidienne et vertébrale. 1a : Branche antérieure de l'artère carotide interne ; 1b : Branche postérieure de l'artère carotide interne ; 2 : Artère cérébrale postérieure ; 3 : Artère cérébrale antérieure ; 4 : Artère cérébrale moyenne ; 5 : Artère carotide interne ; 6 : Artère communicante postérieure ; 7 : Tronc basilaire ; 8 : Artère vertébrale ; 9 : Artère communicante antérieure ; 10 : Artère choroïdienne antérieure ; 11 : Artère communicante postérieure atrophiée ; 12 : Artère spinale antérieure. D'après Embryology.ch.

### **b. Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse**

L'angiogenèse est un processus physiologique complexe qui peut s'effectuer selon 2 modes : le bourgeonnement ou « *sprouting* » et l'intussusception (Burri *et al.*, 2004). Ce processus a été particulièrement étudié au niveau de certains organes comme le cœur, le rein



et le cerveau, mais aussi dans un contexte pathologique particulier : la cancérogenèse (Guo *et al.*, 2016, 2012). Même si des études transcriptomiques ont révélé que le vasculome cérébral se distingue de celui des vaisseaux périphériques (Figure 16), les mécanismes cellulaires de l'angiogenèse restent globalement les mêmes (Guo *et al.*, 2012).

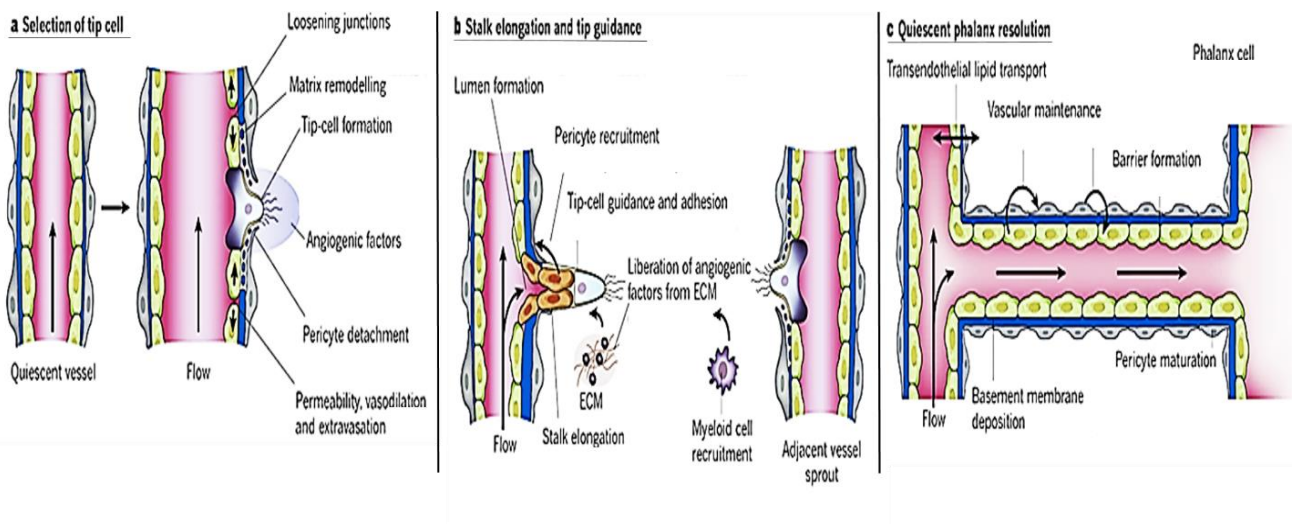


**Figure 16 : Cartographies comparant le transcriptome endothélial de trois organes : le cerveau, le cœur et le rein chez la Souris.**

Le vasculome du cerveau de souris diffère sensiblement de ceux du cœur et du rein. Les gènes sous et surexprimés entre les différents organes sont visualisés en vert et en rouge, respectivement. D'après Guo *et al.*, 2012.

L'étape de bourgeonnement permet la jonction ou "*branching*" entre deux vaisseaux et débute par l'individualisation d'une cellule initiatrice ou *Tip cell* au sein d'un vaisseau quiescent. Cette étape est initiée par un stimulus angiogénique sous le contrôle du VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*), des récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 et de la voie Notch (Jakobsson *et al.*, 2010). Cette *Tip cell* va s'extraire du vaisseau et commencer à migrer sous l'influence de facteurs de guidance comme les sémaphorines et éphrines et d'un remaniement dynamique du cytosquelette et de la MEC, permettant ainsi l'ébauche d'un vaisseau naissant (Gelfand *et al.*, 2009). En effet, la dégradation de la membrane basale et de la MEC par des protéases comme le t-PA (*tissue plasminogen activator*) et les MMP-2 et -9 (*matrix metalloproteinase 2 et 9*) permet la migration des *Tip cells* (London *et al.*, 2009; Vestweber *et al.*, 2009). Au cours de ce processus, l'intégrité du vaisseau est altérée au niveau de la zone d'émission de la collatérale entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire et donc l'extravasation de protéines plasmatiques (Carmeliet and Jain, 2011). En particulier, il a été décrit une perte des jonctions VE-cadhérines (*Vascular Endothelial*) et ZO-1 (*Zona Occludin-1*) entre les cellules endothéliales jouxtant la *Tip cell* (London *et al.*, 2009; Vestweber *et al.*, 2009).

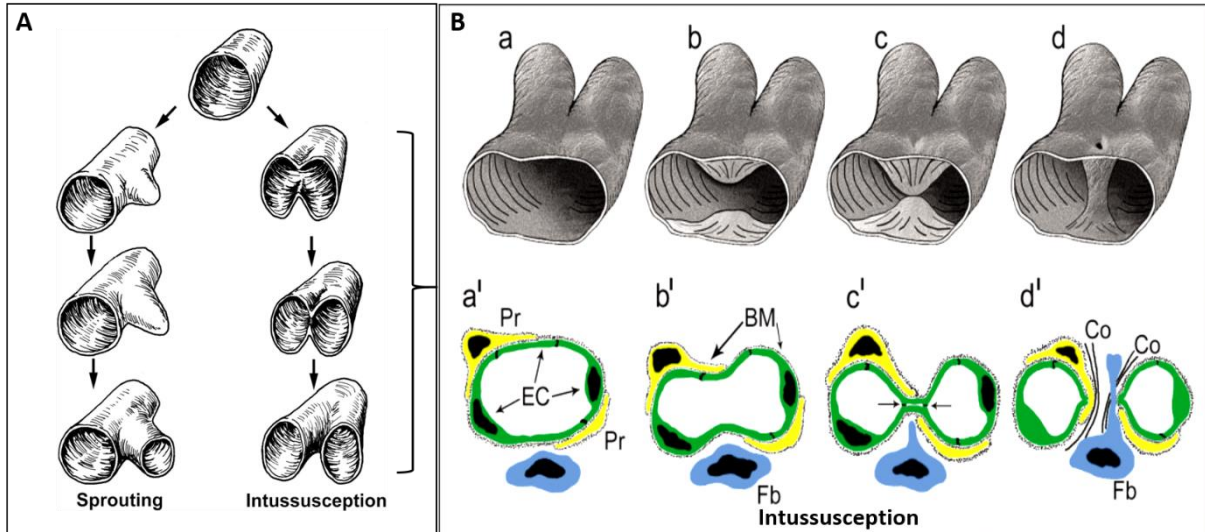
Cette phase d'émergence de la *Tip cell* qui constitue alors la cellule de tête du bourgeonnement va se poursuivre par une phase d'élongation vasculaire. En effet, un gradient de VEGF-A local permet de guider les *fillipodia* de la *Tip cell* via le VEGF-R2 (Gerhardt *et al.*, 2003). Au cours de sa migration, la *Tip cell* est suivie par des cellules endothéliales dites cellules de tige ou *Stalk cells*, qui vont se diviser pour former le corps du nouveau vaisseau (Figure 17 ; Siemerink *et al.*, 2013). Pendant l'étape d'élongation, les *Stalk cells* sont stabilisées grâce à une régulation fine de l'expression du VEGF-R2. En effet, la liaison du VEGF-A sur le VEGF-R2 exprimé par les *Tip cells* va entraîner la sécrétion de DLL4 (*Delta Like canonical Notch Ligand 4*), un ligand du récepteur Notch, qui une fois fixé à son ligand va réprimer l'expression de VEGF-R2 par les *Stalk cells* et stabiliser le vaisseau nouvellement formé (Siemerink *et al.*, 2013).



**Figure 17 : Le bourgeonnement vasculaire ou *branching*.**

(A) Sous l'action du VEGF-A, une cellule initiatrice du point de bourgeonnement (*Tip-cell*) va s'individualiser au sein d'un vaisseau quiescent. L'émergence de la *Tip-cell* requiert une dégradation de la membrane basale et un décollement des péricytes. La perte des jonctions serrées entre les cellules endothéliales se traduit par une perméabilité vasculaire accrue qui permet l'extravasation de protéines plasmatiques. Cette destructuration du vaisseau quiescent va permettre la migration de la *Tip-cell*. (B) En réponse aux signaux de guidance (sémaphorines et éphrines), la *Tip-cell* migre hors de la paroi vasculaire et, via les intégrines, adhère à la matrice extra-cellulaire. En arrière de la *Tip-cell*, les cellules du corps du bourgeonnement (*Stalk cells*) prolifèrent, s'allongent et génèrent un nouveau lumen. Le bourgeon est alors perfusé. Les cellules de corps vont recruter les péricytes puis la membrane basale va se stabiliser. (C) Après fusion de deux bourgeons avoisinants, la mise en continuité des lumens permet une perfusion du néo-vaisseau. Les cellules endothéliales de cette nouvelle anastomose acquièrent un phénotype quiescent. D'après Carmeliet et Jain, 2011.

L'angiogenèse peut également se dérouler selon un processus d'intussusception qui permet la formation de nouveaux vaisseaux par subdivision d'un vaisseau préexistant par la formation de cloisons (ou *septums* ; Burri and Tarek, 1990). En effet, un pilier central va se former au travers de la lumière vasculaire séparant ainsi le vaisseau initial en deux conduits le plus souvent de manière symétrique (Figure 18). Plusieurs types de septations ont été décrites : simples, multiples, opposés ou encore deltoïdes (Burri *et al.*, 2004).



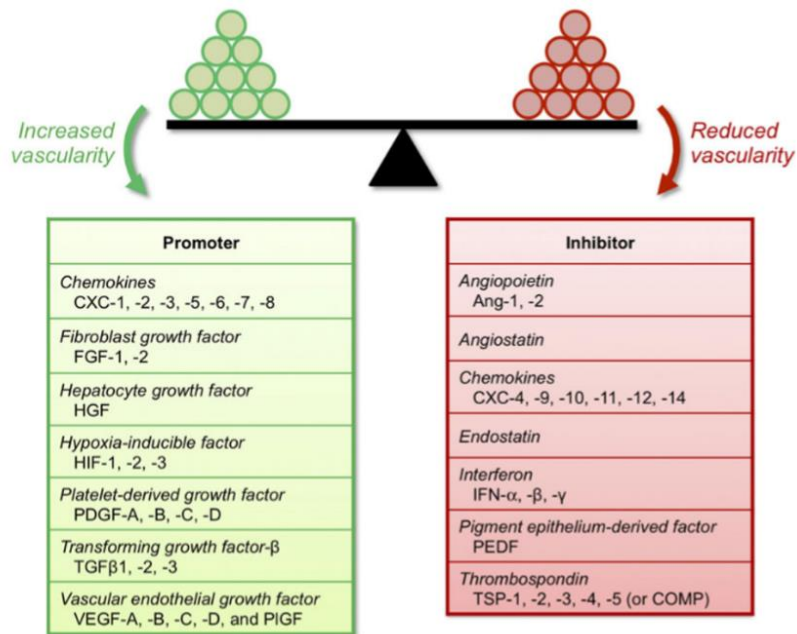
**Figure 18 : Représentations schématiques de la formation d'un pilier au sein d'un vaisseau lors du processus d'intussusception.**

(A) La formation d'un nouveau vaisseau peut s'effectuer selon un mode de *sprouting* ou selon un mode d'intussusception. (B) (a,b,a',b') Protrusion des parois capillaires opposées. (c,c') Contact des cellules endothéliales (EC) et formation d'une bicouche. (d,d') La bicouche et la membrane basale (BM) se perforent, aboutissant à la formation d'un pilier creux. La perforation s'agrandit sous l'invasion de fibroblastes (Fb), de fibres de collagène (Co) et de péricytes (Pr). D'après Burri *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2004.

### c. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse

Au niveau mécanistique, de nombreux acteurs moléculaires ont été décrits comme jouant un rôle dans la formation du réseau vasculaire, comme par exemple : le VEGF, Notch, le complexe Wnt/ $\beta$ -catenin, les sémaphorines, les neuropilines, les plexines, la GPCR124 (*G protein-coupled adhesion receptor*), le TGF- $\beta$  ou encore les facteurs de guidance Slit, Netrin et NOGO (Ruhrberg and Bautsch, 2013; Wittko-Schneider *et al.*, 2014). Il est important de noter que ces acteurs ont également en parallèle une action sur les cellules neurales (Gelfand *et al.*, 2009). Par exemple, le VEGF joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en induisant une activité mitotique au sein des cellules endothéliales, c'est donc un inducteur de l'angiogenèse. L'activation des récepteurs Ephrin-A ou B induit une augmentation des

processus angiogéniques et du bourgeonnement vasculaire et Sema3A en se fixant à son récepteur Npn-1 va induire une perméabilité vasculaire (Basile *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2006; Toyofuku *et al.*, 2005).



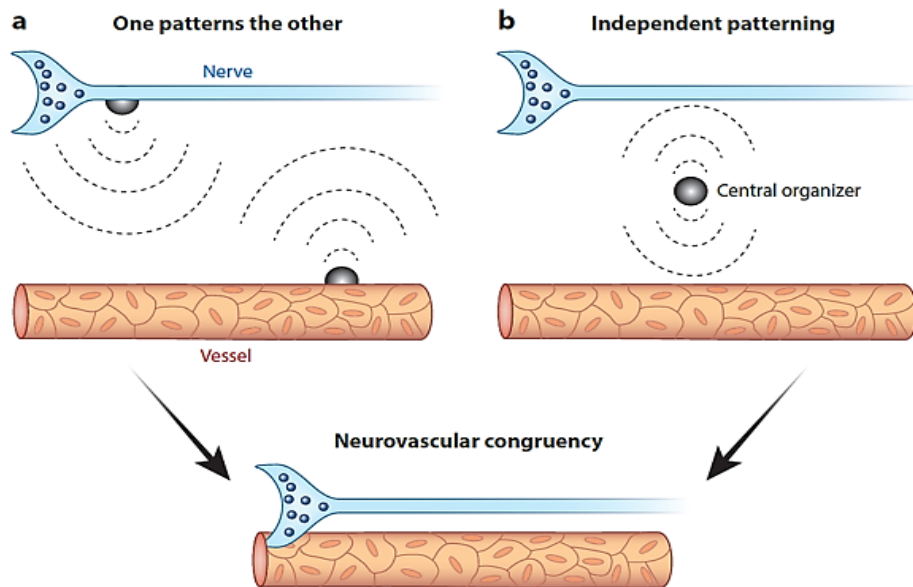
**Figure 19 : Molécules impliquées dans l'angiogenèse.**

Certains acteurs moléculaires vont influencer la formation du réseau vasculaire en promouvant ou en inhibant l'angiogenèse. Par exemple, certaines chémokines, le *fibroblast growth factor* (FGF), le *hepatocyte growth factor* (HGF), le facteur *hypoxia-inducible factor* (HIF), le *platelet-derived growth factor* (PDGF), le *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et le VEGF sont décrits comme des inducteurs de l'angiogenèse alors que l'angiopoïétine, l'angiostatine, l'endostatine, d'autres chémokines, certains interférons, le *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) et la thrombospondine (TSP) sont des inhibiteurs de l'angiogenèse. D'après Logsdon *et al.*, 2014.

#### **d. Interactions entre les systèmes vasculaires et les cellules neurales**

La mise en place du réseau vasculaire cérébral influence fortement la cytoarchitecture des cellules nerveuses cérébrales (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). En effet, au cours du développement, la vascularisation cérébrale est concomitante avec la neurogenèse, la précédant de 24 heures environ. Cette mise en place successive assure ainsi un apport en nutriments et en oxygène aux cellules neurales pendant leur mise en place. Pour expliquer cette congruence entre ces deux réseaux, deux modèles d'interactions neurovasculaires ont été proposés récemment : le premier appelé "*One patterns the other*", où chacun des deux systèmes possède son propre centre organisateur et va impacter sur l'autre système, et un second appelé "*Independent patterning*", où les nerfs et les vaisseaux vont répondre aux signaux d'un centre organisateur commun (Figure 20 ; Andreone *et al.*, 2015). Il est à noter

que cette forte interaction entre les réseaux vasculaire et neuronal est retrouvée également au niveau périphérique où ces réseaux sont quasiment superposables (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Mukoyama *et al.*, 2005).



**Figure 20 : Représentation schématique de deux modèles aboutissant à la congruence neurovasculaire.**

(A) Le modèle " *One patterns the other* ", dans lequel le système (nerveux ou vasculaire) orchestre la mise en place du second. Ce modèle permet une mise en place en parallèle des deux systèmes, indépendamment de leur position relative vis-à-vis du milieu environnant. (B) Le modèle " *Independent patterning* ", dans lequel la mise en place des deux systèmes est contrôlée par des signaux attractifs et répulsifs originaires d'un centre organisateur unique. D'après Andreone *et al.*, 2015.

Le bon fonctionnement du cerveau repose entre autre sur la bonne position des précurseurs neuronaux, et donc d'une migration correcte à partir de leur lieu d'origine. De récentes études démontrent que certains précurseurs neuronaux (Saghatelian, 2009; Won *et al.*, 2013a) et gliaux (Tsai *et al.*, 2016) utilisent les vaisseaux sanguins comme support physique pour leur migration. Plus tardivement, le réseau vasculaire régule également la croissance axonale et la mise en place du réseau neuronal et il a été démontré que les cellules nerveuses peuvent quant à elles contrôler la morphologie des vaisseaux sanguins. La très forte interaction entre ces deux réseaux s'explique par le fait que de nombreux facteurs angiogéniques agissent de manière paracrine sur la fonction neuronale et qu'à l'inverse des neurotrophines peuvent moduler la fonction endothéliale (Figure 21). A titre d'exemple, le VEGF est un facteur proangiogénique qui favorise la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales. Il a été également démontré qu'il exerçait des effets neurotrophique

et neuroprotecteur sur les cellules nerveuses dans des conditions physiologique et pathologique chez le nouveau-né et chez l'adulte (Carmeliet and Storkebaum, 2002; El Ghazi *et al.*, 2012). De même, certains membres des familles des sémaphorines, des nétrines et des éphrines initialement caractérisés dans le SNC comme des acteurs clés du guidage axonal, sont également impliqués dans le guidage vasculaire (Tam and Watts, 2010).

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

**Figure 21: Effets des facteurs angiogéniques et neurogéniques sur les systèmes nerveux et vasculaire.**

bFGF : *basic fibroblast growth factor* ; BDNF : *brain-derived neurotrophic factor* ; GDNF ; *glial cell line derived neurotrophic factor* ; IGF-1 : *insulin-like growth factor 1* ; IL-8 : *interleukin-8* ; NGF : *nerve growth factor* ; VEGF : *vascular endothelial growth factor*. D'après Park *et al.*, 2003.

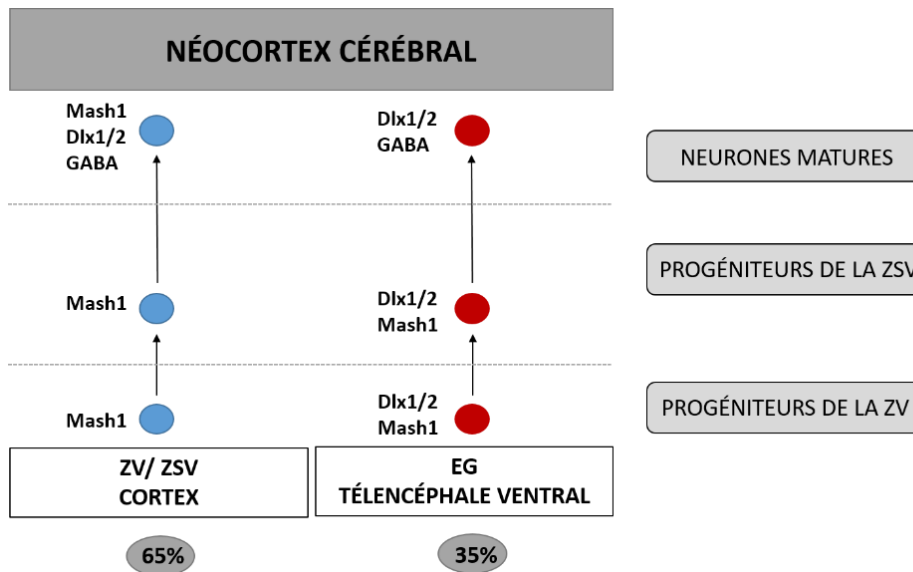
Ces interactions privilégiées persisteront chez l'adulte avec notamment la mise en place de l'unité neurovasculaire et de la barrière hémato-encéphalique (Rizzo and Leaver, 2010) ainsi que le contrôle de la migration des neurones olfactifs *via* la route caudorostral (Snapyan *et al.*, 2009).

## II. Développement du système GABAergique cortical

### 1. Mise en place des interneurons GABAergiques

#### a. Production des interneurons GABAergiques

Dans le cortex cérébral mature, l'homéostasie de l'activité neuronale est assurée par une balance entre les systèmes neuronaux excitateur et inhibiteur. La composante inhibitrice est assurée en majorité par les neurones GABAergiques, des interneurons utilisant le GABA comme neurotransmetteur et qui représentent 20 à 30 % des neurones corticaux (Corbin and Butt, 2011). Ces neurones sont localisés autour des neurones pyramidaux excitateurs afin d'en assurer leur régulation (Le Magueresse and Monyer, 2013). Il existe chez l'Homme deux lignages de précurseurs d'interneurons GABAergiques distincts par leurs origines embryonnaires (Letinic *et al.*, 2002). Le premier lignage, qui représente 65 % de l'innervation corticale GABAergique, est originaire des ZV et ZSV du télencéphale dorsal et exprimera les facteurs de transcription *distal-less homeobox ½* (*Dlx ½*) et *mammalian achaete-scute homolog-1* (*Mash1*) une fois mature. Le second lignage est originaire des éminences ganglionnaires (EG) du télencéphale ventral et représente 35 % des interneurons GABAergiques. Une fois mature, cette population sera également caractérisée par l'expression de *Dlx ½* mais pas de *Mash1*, dont l'expression cesse pendant leur migration (Figure 22 ; (Letinic and Rakic, 2001). Contrairement à l'Homme, chez la Souris la quasi-totalité des interneurons GABAergiques est originaire des EG du télencéphale ventral (Wonders and Anderson, 2006).

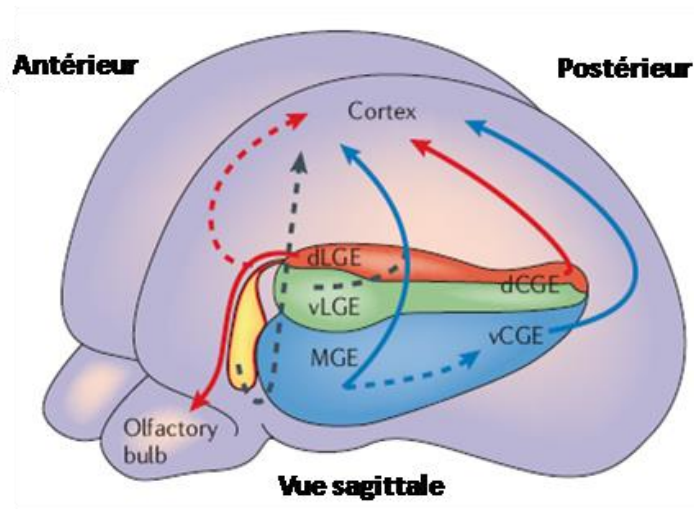


**Figure 22 : Origine des neurones corticaux chez l'Homme.**

Un lignage de précurseurs GABAergiques, généré au niveau des zones ventriculaires et sous-ventriculaires corticales, est caractérisé par l'expression de Mash1 (bleu). A l'issue de leur migration au niveau du néocortex, ces précurseurs expriment Mash1 et Dlx1/2 et représentent 65 % des interneurones GABAergiques corticaux totaux. Un second lignage caractérisé par l'expression de Dlx1/2 et Mash1, est originaire des éminences ganglionnaires (rouge). Au terme de leur migration, ces interneurones vont exprimer uniquement Dlx1/2 et représenter environ 35 % des interneurones GABAergiques totaux. ZV : Zone ventriculaire ; ZSV : Zone sous-ventriculaire, EG : éminences ganglionnaires. D'après Letinic and Rakic, 2001.

Au cours du neurodéveloppement, les EG correspondent à un renflement transitoire du subpallium apparaissant après la fermeture du tube neural à E11 chez la Souris et correspondant à la 5<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme (Müller and O'Rahilly, 1987). Les EG sont divisés en 3 sous-groupes en fonction de leur localisation anatomique : l'éminence ganglionnaire médiane (EGM ; López-Bendito *et al.*, 2004) au niveau rostral qui produit la grande majorité des progéniteurs GABAergiques et les éminences ganglionnaires latérale et caudale (Wonders and Anderson, 2006). Ces structures embryonnaires vont évoluer, fusionner et disparaître après la naissance (Corbin and Butt, 2011). En plus de ces 3 zones germinatives, une dernière zone de production des progéniteurs GABAergiques a été décrite au niveau de l'aire préoptique (APO ; Gelman and Marín, 2010). L'APO est une région de l'hypothalamus qui contribue à générer une petite partie de l'innervation GABAergique corticale chez la Souris (Kelsom and Lu, 2013).



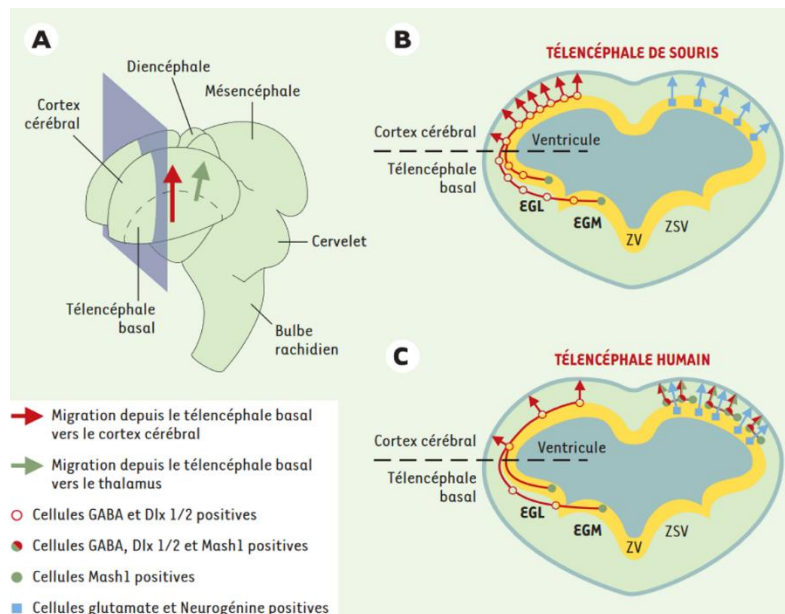


**Figure 23 : Subdivisions des éminences ganglionnaires chez l'Homme.**

Au niveau du télencéphale ventral, les éminences ganglionnaires sont décomposées en éminences ganglionnaires médianes (EGM), latérales (EGL) et caudales (EGC). Chaque subdivision des éminences ganglionnaires est caractérisée par l'expression de facteurs de transcription spécifiques comme Nkx2.1 au niveau des EGM ou ER81 au niveau des EGC dorsales (EGCd). D'après Wonders and Anderson, 2006.

### ***b. Migration des interneurones GABAergiques***

Une fois générés au niveau des EG et de l'APO du télencéphale basal, les progéniteurs GABAergiques vont devoir migrer pour atteindre leur position définitive au sein du néocortex mais également au niveau du striatum de l'hippocampe ou encore des bulbes olfactifs. Chez la Souris, contrairement aux neurones glutamatergiques, les progéniteurs GABAergiques vont dans un premier temps migrer de manière tangentielle à travers le parenchyme cérébral puis dans un deuxième temps leur migration deviendra radiale pour permettre de coloniser les couches corticales en formation. Chez l'Homme, cette migration ne concerne qu'un tiers des progéniteurs GABAergiques. Les deux tiers restants sont produits localement au niveau du cortex et vont migrer radialement pour coloniser les couches corticales, de la même manière que les neurones glutamatergiques (Narboux-Nême and Wassef, 2003). Dans la suite de cet exposé, nous nous sommes concentrés sur la migration tangentielle des progéniteurs GABAergiques issus des EG.

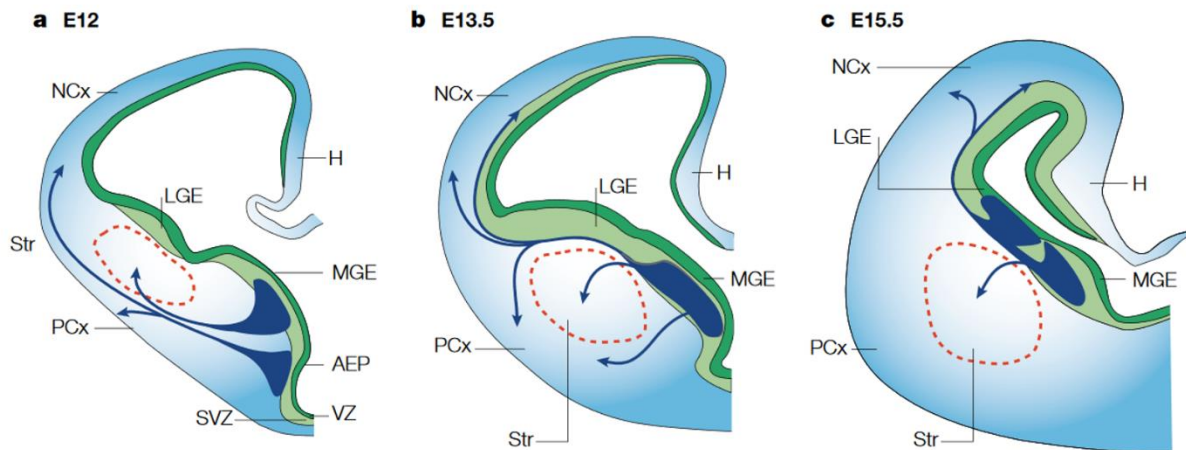


**Figure 24 : Migration des progéniteurs GABAergiques depuis leur lieu de production jusqu'au néocortex.**

(A) : Représentation d'un cerveau embryonnaire de souris. La flèche rouge représente la migration tangentielle des progéniteurs GABAergiques du télencéphale basal vers le néocortex, la flèche verte représente la migration de ces progéniteurs du télencéphale basal vers le thalamus, spécifique de l'Homme. (B) : Coupe transversale du télencéphale de Souris. La totalité des progéniteurs GABAergiques (en rouge) sont produit au niveau des éminences ganglionnaires médiane et latérale (EGM et EGL) du télencéphale basal et vont migrer tangentiellement à travers le télencéphale puis radialement à travers le cortex. La totalité des progéniteurs glutamatergiques proviennent du cortex et vont migrer radialement pour coloniser les différentes couches. (C) : Coupe transversale du télencéphale humain. Environ un tiers des progéniteurs GABAergiques est produit au niveau du télencéphale basal, le reste est produit au niveau cortical et va migrer radialement, comme les progéniteurs glutamatergiques. D'après Narboux-Nême and Wassef, 2003.

Il a été décrit deux voies de migration tangentielle différentes : une voie superficielle ou piale et une voie profonde ou périventriculaire (Gupta *et al.*, 2002; Marín and Rubenstein, 2003). Chez la Souris, la mise en place de cette population GABAergique débute à E12.5 pour se terminer après la naissance (Tanaka and Nakajima, 2012) alors que chez l'Homme, la principale vague de migration des neurones corticaux s'étend de la 10<sup>ème</sup> à la 25<sup>ème</sup> SG, même si certains progéniteurs GABAergiques commencent à migrer avant cette période (Letinic *et al.*, 2002). Plus précisément, on peut distinguer trois phases de migration chez la Souris. Tout d'abord une phase précoce à E11.5-E12 durant laquelle les neurones issus principalement des EGM vont migrer jusqu'à la surface du néocortex en empruntant préférentiellement la voie de migration tangentielle superficielle, suivie par une phase intermédiaire à E13.5 qui concerne une deuxième vague de progéniteurs issus des EGM qui vont emprunter la voie profonde de migration et enfin une phase tardive E15.5 qui concerne les progéniteurs issus des EGL qui vont migrer préférentiellement *via* la voie profonde (Tanaka *et al.*, 2003). Il est a

noté que durant la phase de migration intermédiaire, des progéniteurs GABAergiques provenant des EGM vont aller peupler le striatum (Marín and Rubenstein, 2003), d'autres provenant des EGL vont migrer vers le bulbe olfactif, c'est la migration caudo-rostrale qui persiste à l'âge adulte (Snappyan *et al.*, 2009), et enfin des progéniteurs issus des EGC vont aller coloniser l'hippocampe (Yozu *et al.*, 2005).

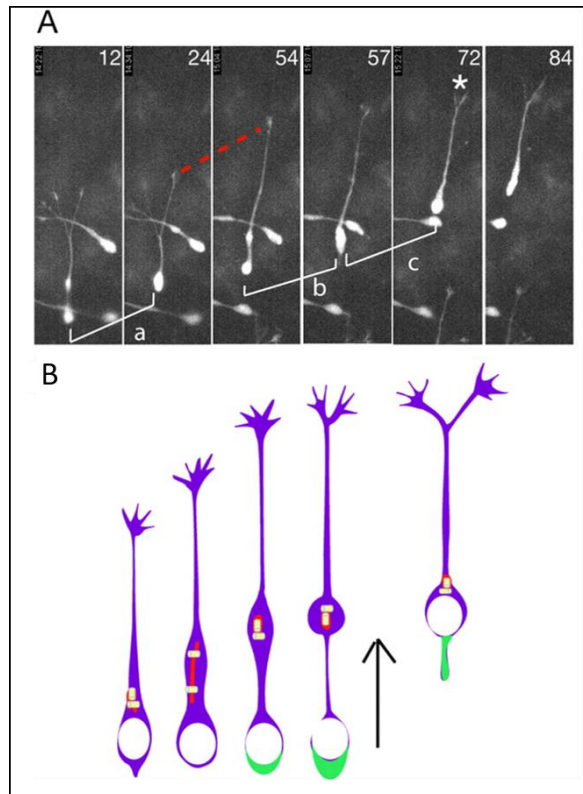


**Figure 25 : Différentes phases de migration des progéniteurs GABAergiques au cours du temps.**

(A) Une première phase précoce de migration à E12 qui concerne majoritairement les neurones GABAergiques issus des EGM qui vont migrer tangentiellement *via* la voie superficielle. (B) Une phase intermédiaire à E13.5 de migration des progéniteurs issus des EGM qui vont migrer tangentiellement à travers la voie profonde de migration. (C) Une phase tardive à E15.5 qui concerne les progéniteurs issus des EGL qui vont migrer *via* la voie profonde de migration. D'après Marín and Rubenstein, 2001.

Il a été décrit récemment que pendant leur phase de migration tangentielle, les progéniteurs GABAergiques vont se servir du réseau vasculaire déjà mis en place comme support physique et comme guide de leur migration (Won *et al.*, 2013a). En effet, les cellules endothéliales du réseau vasculaire cérébral vont sécréter du GABA qui va se fixer sur les récepteurs GABA-A et GABA-B exprimés par les précurseurs GABAergiques en migration. La fixation du GABA va ainsi agir comme un signal de guidage assurant la communication entre la cellule en migration et la cellule endothéliale (Won *et al.*, 2013a). Une fois leur migration tangentielle achevée, les précurseurs GABAergiques doivent migrer radialement afin d'atteindre leur destination finale au sein de la plaque corticale (Ang *et al.*, 2003). De façon intéressante, les interneurons vont utiliser la glie radiale comme support de migration et comme support structural de leur positionnement dans le néocortex (Yokota *et al.*, 2007).

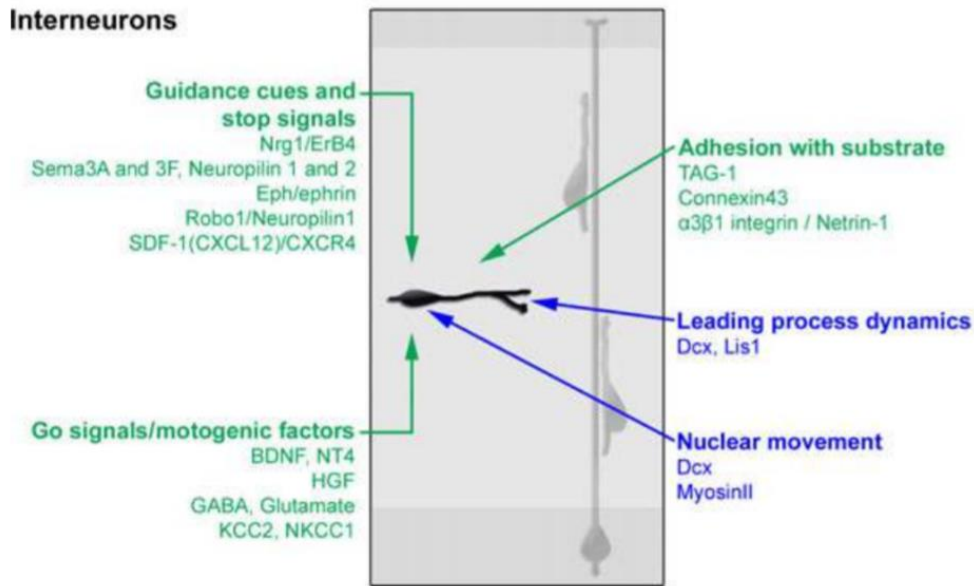
Les interneurones corticaux vont coloniser les couches corticales par des cycles migratoires répétés, alternant une phase de repos pendant laquelle la cellule étend son prolongement et une phase de nucléokinèse. Ce mode de migration est qualifié de saltatoire (Bellion *et al.*, 2005).



**Figure 26 : Mode de migration des interneurones corticaux.**

(A) : Enregistrement en temps réel de la migration d'un interneurone provenant de l'éminence ganglionnaire médiane (temps en minutes). Les lettres a, b et c représentent les trois translocations du noyau. Entre les phases de translocation, le prolongement de guidage s'allonge (pointillés rouge). L'étoile représente le prolongement de guidage en train de se diviser en deux branches. (B) : Schéma illustrant la phase de repos des noyaux pendant laquelle le prolongement de guidage va croître puis la phase de translocation nucléaire ou nucléokinèse. D'après Bellion *et al.*, 2005.

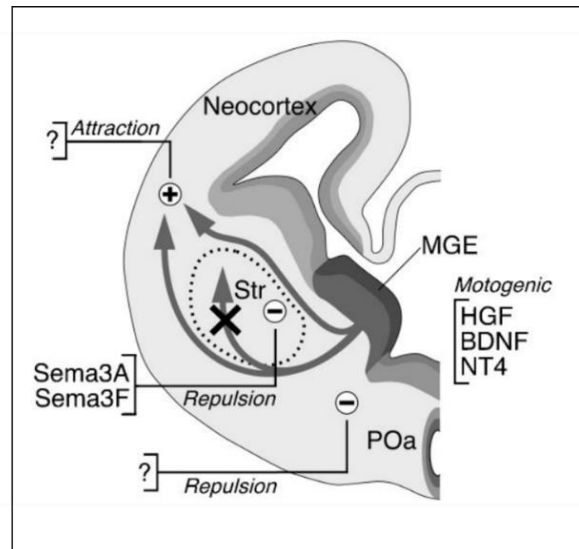
La migration des interneurones GABAergiques est un processus complexe hautement régulé par différents facteurs. De la même manière que pour la migration radiale, on peut distinguer des facteurs de régulation propre à la cellule en migration comme par exemple la doublecortine (DCX) et des facteurs indirects de la signalisation « cellule à cellule » concernant le guidage des cellules et leur adhésion aux substrats comme par exemple la Neuréguline 1 (Nrg1), les sémaphorines 3A et 3F (Sema) ou la Neuropilin1 pour les signaux STOP ou le BDNF, le GABA et le glutamate pour les signaux GO (Manent *et al.*, 2011).



**Figure 27 : Molécules contrôlant la migration des interneurons GABAergiques dans le néocortex.**

Les mécanismes et molécules propre à la cellule en migration sont listés en bleus, comme Dcx, Lis1 ou MyosinII et les mécanismes indirects de la signalisation « cellule à cellule » sont listés en vert et séparés selon leur rôle : arrêt ou stimulation de la migration de la cellule, signaux STOP ou GO. D'après Manent *et al.*, 2011.

Il apparaît donc que la migration des interneurons GABAergiques est régulée en grande partie par une modulation du microenvironnement présent autour du neurone en migration. En effet, au cours de leur migration, les interneurons vont être guidés par des gradients chémoattractants ou répulsifs. Par exemple, des motogènes comme le GDNF, Nrg1, le BDNF, le NT4 (*NeuroTrophin4*) et l'HGF ont été décrits comme stimulant la vitesse de migration des interneurons issus des EG (Marín and Rubenstein, 2003; Pozas and Ibáñez, 2005; Yau *et al.*, 2003). A l'inverse, les sémaphorines de classe 3 ont été décrites comme ayant une action répulsive et empêchent ainsi l'entrée des interneurons en migration dans le striatum en formation (Marín and Rubenstein, 2003).



**Figure 28 : Facteurs influençant la migration des interneurons au cours du neurodéveloppement.**

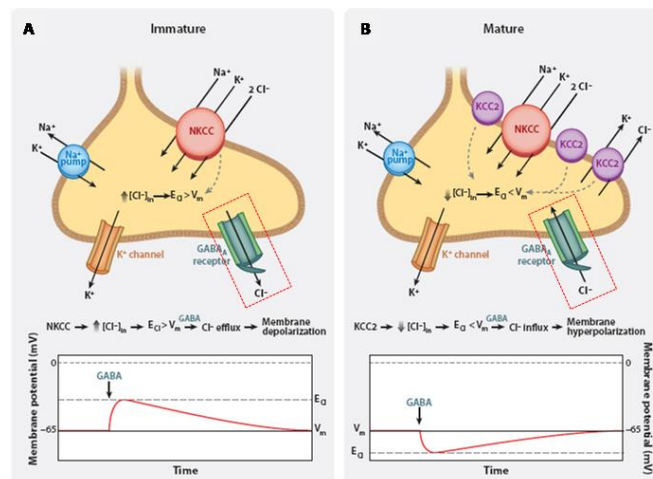
Différents facteurs motogéniques stimulent la migration des interneurons GABAergiques provenant de l'EGM comme l'HGF, le BDNF ou NT4. Une activité répulsive au niveau de l'aire préoptique (POa) empêche la migration ventrale des interneurons en les dirigeant vers le néocortex et l'expression de sémaphorines de classe 3 empêche la migration des interneurons vers le striatum en formation. BDNF : *brain derived neurotrophic factor*, NT4 : *neurotrophin4*, HGF : *hepatocyte growth factor*, Sema : sémaphorines, Str : striatum. D'après Marín and Rubenstein, 2003.

Il est à noter que certains neurotransmetteurs sont indispensables à la mise en place de l'innervation GABAergique corticale comme le GABA ou le glutamate. En effet, les neurones en migration ont une plus forte affinité pour le GABA que les précurseurs encore localisés dans l'EGM car ces cellules expriment les récepteurs GABA-A et GABA-B (Cuzon *et al.*, 2006). De plus, il a été récemment démontré que le GABA serait également sécrété par les cellules endothéliales du réseau vasculaire cérébral assurant ainsi le guidage des progéniteurs GABAergiques en plus de support physique (Won *et al.*, 2013a).

## 2. Maturation cérébrale et rôle excitateur/inhibiteur du système GABAergique

Le système GABAergique est le principal système inhibiteur du SNC mature et régule la synchronisation des neurones glutamatergiques. Cependant, il a été démontré que ce système est excitateur pendant le développement embryonnaire et la période périnatale. En effet, le GABA va agir comme facteur morphogénétique et posséder des actions excitatrices transitoires pendant cette période (Ben-Ari *et al.*, 2012; Fishell and Rudy, 2011). Ce phénomène est d'autant plus important que les synapses sécrétant le GABA sont formées

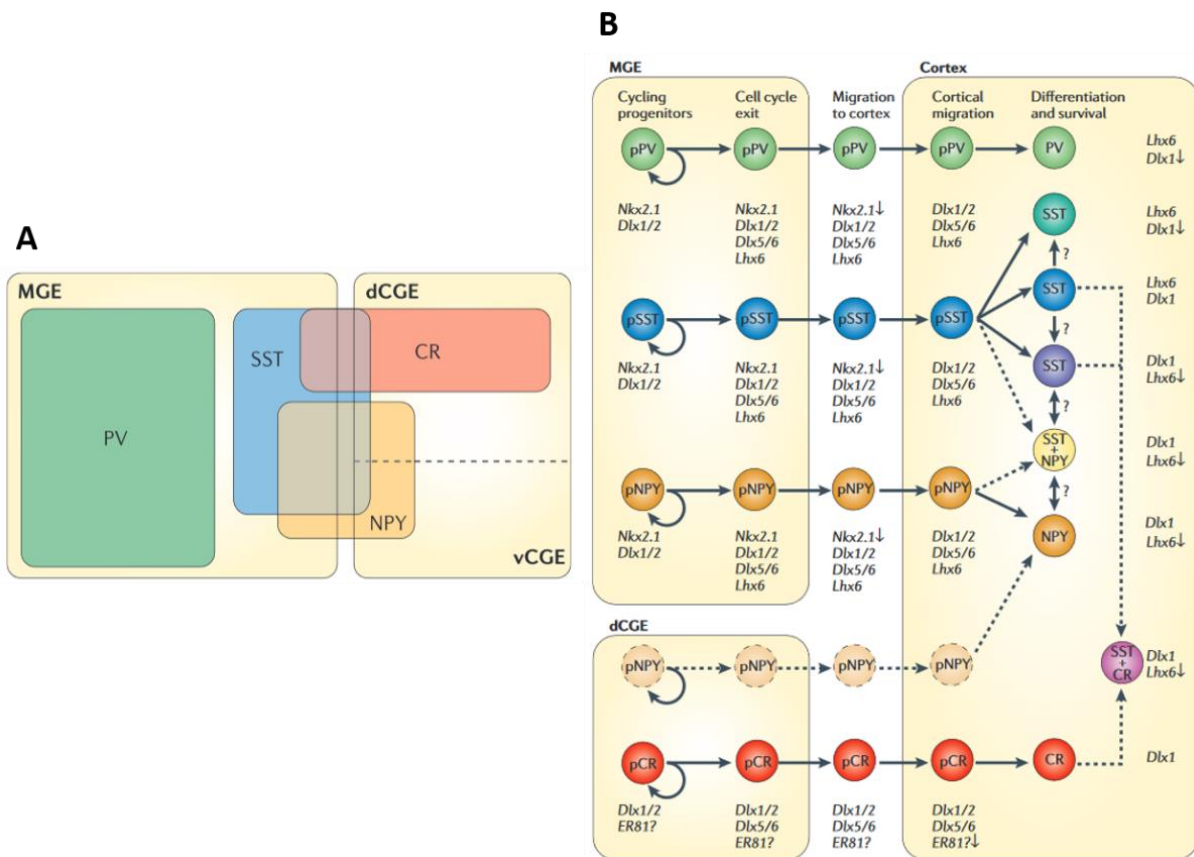
avant les synapses excitatrices glutamatergiques (Ben-Ari, 2002) et assurent donc l'excitation des neurones immatures et la mise en place des connections neuronales. Ce phénomène est expliqué par la réduction progressive de la concentration intracellulaire de chlore ( $\text{Cl}^-$ ) qui est responsable d'un potentiel d'équilibre positif de cet ion au niveau des neurones post-synaptiques immatures, ce qui provoque un efflux de  $\text{Cl}^-$  et une dépolarisation lors de la fixation du GABA sur son récepteur (Ben-Ari, 2002; Boulland and Chaudhry, 2012). Le *shift* excitation/inhibition GABAergique est lié à l'expression de transporteurs du  $\text{Cl}^-$  dont NKCC ( $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$  Cotransporteur), responsable de la recapture du  $\text{Cl}^-$  et KCC ( $\text{K}^+\text{Cl}^-$  Cotransporteur), responsable de l'extrusion de ce même ion. En effet, le NKCC est présent pendant le développement embryonnaire alors que l'expression de KCC est induite après la naissance (Ben-Ari, 2002). De ce fait, le NKCC permet l'accumulation de  $\text{Cl}^-$  dans le compartiment intracellulaire des neurones et donc l'action dépolarisante transitoire du GABA. Ce *shift* semble induit par l'activation des synapses GABAergiques elles-mêmes ce qui produit des courants post-synaptiques suffisants pour induire l'expression de KCC et la réduction de la concentration intracellulaire en  $\text{Cl}^-$  conduisant alors à l'action hyperpolarisante du GABA (Figure 29 ; (Fishell and Rudy, 2011). Ce *shift* a lieu aux environs du 7<sup>ème</sup> jour de vie postnatale chez les rongeurs, alors qu'il a lieu avant la naissance chez les primates (Ben-Ari *et al.*, 2012).



**Figure 29 : Comparaison des effets excitateurs / inhibiteurs du GABA en fonction de la maturité des neurones.** Les neurones immatures expriment le co-transporteur NKCC, qui utilise le gradient de sodium ( $\text{Na}^+$ ) pour transporter le chlore ( $\text{Cl}^-$ ) à l'intérieur de la cellule, ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$ . Donc, le potentiel d'équilibre du  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}^-}$ ) est supérieur au potentiel membranaire ( $V_m$ ), et l'activation du récepteur  $\text{GABA}_A$  par fixation du GABA va entraîner un efflux de  $\text{Cl}^-$  et une dépolarisation neuronale (effet excitateur). (B) Les neurones matures co-expriment les co-transporteurs NKCC et KCC2 dont l'expression est supérieure à celle de NKCC et dont l'activité provoque une diminution de la concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$ . Le potentiel d'équilibre du  $\text{Cl}^-$  devient inférieur au potentiel membranaire, c'est pourquoi la fixation du GABA sur son récepteur va entraîner un influx de  $\text{Cl}^-$  et une hyperpolarisation neuronale (effet inhibiteur). D'après Fishell and Rudy, 2011.

### 3. Les différentes populations d'interneurones GABAergiques

Il existe une grande diversité d'interneurones GABAergiques au sein du système nerveux central, et cette population de neurones peut être subdivisée en sous-type d'interneurones caractérisés par la synthèse ou non de facteurs de transcription, de protéines liant le calcium ou de neuropeptides. Ainsi, la différenciation et la spécification des interneurones corticaux sont assurées par l'expression de différents facteurs de transcription en fonction des sous-populations et du degré de maturation corticale (Figure 30 ; Wonders and Anderson, 2006).



**Figure 30 : Expression des facteurs de transcription spécifiques de différents types d'interneurones GABAergiques corticaux au cours de leur genèse, leur migration et de leur maturation.**

(A) : Contribution des éminences ganglionnaires médiane et caudale aux différentes sous-populations d'interneurones GABAergiques. L'EGM donne naissance à la totalité des neurones GABAergiques à parvalbumine (PV), la plupart des interneurones à somatostatine (SST) et à une partie des interneurones à calrétinine (CR) et à neuropeptide Y (NPY). L'EGC donne naissance à la majorité des neurones à CR, la moitié des interneurones NPY et une petite portion des neurones à SST. (B) : Profils d'expression des différents facteurs de transcription localisés au sein des interneurones GABAergiques lors de leur migration et de leur différenciation. D'après Wonders and Anderson, 2006.



**a. Les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine**

La population d'interneurones GABAergiques à parvalbumine (PV) représente 50 % des interneurons GABAergiques. Elle est issue des EGM et exprime *NK2 Homeobox 1* (Nkx 2.1), *Dlx 1/2* et *LIM Homeobox 6* (Lhx6) pendant leur migration tangentielle puis le niveau d'expression de Lhx6 va se maintenir alors que celui de Nkx 2.1 va chuter une fois dans le cortex (Wonders and Anderson, 2006). La parvalbumine est une protéine proche de l'albumine qui fixe le calcium et qui va jouer un rôle dans le cycle cellulaire et la production de seconds messagers (Grateron *et al.*, 2003). Un déficit en neurones GABAergiques à PV au sein du cortex va conduire à une perte de la synchronisation des oscillations gamma et à l'émergence de déficits cognitifs comme la schizophrénie (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012). Cette population peut également être subdivisée selon des critères morphologiques en 3 groupes aux morphologies cellulaires distinctes (Wonders and Anderson, 2006). On peut identifier les *large basket cells* (LBC) ou grandes cellules en panier (Figure 30) localisées dans les couches II-V, dont le soma multipolaire mesure 20-25  $\mu\text{m}$  et d'où s'étendent au minimum 3 dendrites primaires rayonnant dans toutes les directions. Les axones quant à eux sont orientés verticalement ou horizontalement et projettent loin, jusqu'à 900-1000  $\mu\text{m}$ . Les LBC sont la source principale d'inhibition horizontale à travers les colonnes corticales et sont les seuls interneurons sous le contrôle excitateur direct du thalamus. On peut également identifier les *nest basket cells* (NBC) ou cellules à nid de panier (Figure 30) qui sont localisées dans les couches corticales II-IV. Ces cellules mesurent jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  et ont une forme somatique irrégulière contribuant à une projection dendritique radiaire. L'arborisation dendritique de ces cellules est locale et compacte tout comme l'arborisation axonale qui s'étend jusqu'à 150  $\mu\text{m}$ , indiquant un contrôle inhibiteur local de ces neurones. Enfin, on peut également identifier les cellules en chandelier localisées dans les couches corticales II-VI caractérisées par des dendrites lisses à orientation radiaire, un corps cellulaire ovale et multipolaire. L'axone de ces cellules présente une vaste ramification de ses segments préterminaux qui forment des petites rangées orientées verticalement faisant penser à des bougies sur un chandelier. Ces cellules sont considérées comme les neurones inhibiteurs les plus puissants dans le néocortex (Druga, 2009).

**b. Les interneurones GABAergiques exprimant la somatostatine**

La population d'interneurones GABAergiques à somatostatine (SST) représente 30 % des neurones inhibiteurs. Elle est également issue des EGM et exprime les mêmes facteurs de transcription que les interneurones à PV au cours de leur migration. La SST est un peptide inhibiteur qui agit comme un modulateur impliqué dans de nombreux processus physiologique et pathologique (Lin and Sibille, 2015). Par exemple, la SST a été décrite comme étant un inhibiteur de la sécrétion de l'hormone de croissance au niveau de l'hypophyse (Faria *et al.*, 1989) et aurait donc un rôle dans l'acromégalie (Howlett *et al.*, 2013). Ainsi, le puissant rôle inhibiteur de cette population de neurones est responsable du contrôle de la composante inhibitrice distale au sein du néocortex (Gentet *et al.*, 2012). D'un point de vue morphologique, cette population de cellule est divisée en deux sous-populations. La première est identifiée comme des *small basket cells* (SBC) ou petites cellules à panier et se caractérise par un corps cellulaire multipolaire ou bipolaire pouvant mesurer jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre (Hendry *et al.*, 1984). Ces cellules vont créer des synapses sur des neurones pyramidaux et d'autres interneurones GABAergiques (Markram *et al.*, 2004). La deuxième sous-population localisée principalement dans les couches corticales II-V est identifiée sous la terminologie de cellules de Martinotti. Le corps cellulaire de ces cellules est ovoïde, les dendrites sont orientées verticalement et leur arborisation dendritique est la plus vaste parmi tous les interneurones, projetant de 300 à 2000  $\mu\text{m}$ . Les axones quant à eux, projettent jusqu'à la couche corticale I et vont créer des synapses quasiment uniquement avec des neurones pyramidaux (Wang *et al.*, 2002). Ces cellules sont également appelées « neurones à impulsion régulière » car leur seuil d'activation fonctionnelle est bas (Kawaguchi and Kubota, 1993).

**c. Les interneurones GABAergiques exprimant le neuropeptide Y**

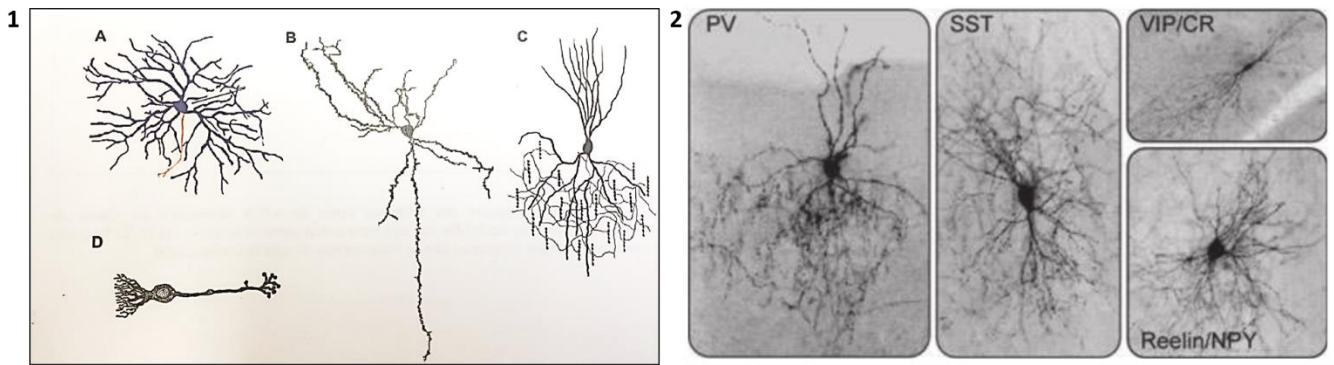
Les neurones GABAergiques exprimant le neuropeptide Y (NPY) vont exprimer quant à eux les facteurs de transcription Nkx2.1, Dlx1/2 et Lhx6 au cours de leur migration tangentielle. Le NPY intervient dans la régulation de plusieurs processus physiologiques comme la prise de nourriture ou la température corporelle (Bi *et al.*, 2012; Keen-Rhinehart *et al.*, 2013). Cette population de neurones est issue des EGM et EGC et 50 % de cette population sont également des interneurones à SST et auront donc la même morphologie que décrite précédemment, à

savoir en *small basket cells* et cellules de Martinotti et seront principalement situés dans la couche corticale I (Figure 30). Il existe également une troisième morphologie appelée « *neurogliaform-like* » qui est la plus commune pour cette population de neurones dont les corps cellulaires présentent une forte arborisation axonale et sont principalement situés dans les couches corticales superficielles (Karagiannis *et al.*, 2009).

**d. Les interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine**

La population d'interneurones GABAergiques à calrétinine, qui représente 15 % de l'innervation GABAergique, est issue des EGC et est principalement localisée dans les couches corticales II-IV. Ces neurones vont exprimer les facteurs de transcription Dlx1/2 et ER81 au cours de leur migration à travers le néocortex. La calrétinine est une protéine qui lie le calcium et intervient dans le contrôle cellulaire par la production de seconds messagers et le maintien de l'homéostasie cellulaire (Barinka and Druga, 2010). Ces cellules sont principalement retrouvées sous forme de petites cellule bipolaires (Figure 31). Les corps cellulaires de ces cellules sont ovoïdes ou en broche et leur extension dendritique est verticale permettant de projeter vers le haut du néocortex, dans la couche I mais aussi vers le bas, dans la couche VI. Ces cellules vont créer peu de contacts à courte distance avec des neurones pyramidaux (Druga, 2009).

Il est à noter qu'il existe une dernière population de neurones GABAergiques exprimant une autre protéine liant le calcium, la calbindine-D 28K (CB ; Kayakabe *et al.*, 2013). La CB est principalement exprimée par les neurones de Meynert ou encore par les cellules de Purkinje dans le cervelet (Celio, 1990) et va intervenir dans les voies de transmission du système limbique. On ne retrouve qu'une petite population de neurones positifs à la CB dans le néocortex localisée dans les couches II-III (Celio, 1990; Kayakabe *et al.*, 2013).



**Figure 31 : Caractéristiques morphologiques des interneurones GABAergiques.**

(1) A : Morphologie en panier caractéristique des *small basket cells* (SBC), *nest basket cells* (NBC) et *large basket cells* (LBC). B : Cellules de Martinotti. C : Cellules en chandelier. D : Petite cellule bipolaire. (2) Morphologie des différents sous-types d'interneurones GABAergiques. Les interneurones à PV sont en forme de LBC, de NBC ou de cellules en chandelier, les interneurones à SST et NPY sont en forme de SBC ou cellules de Martinotti et enfin les interneurones à VIP/CR sont en forme de petites cellules bipolaires. D'après Druga, 2009; Gelman and Marín, 2010.

#### ***e. Population particulière d'interneurones GABAergiques : les « neurones Hub »***

Il a été décrit plus récemment une population d'interneurones GABAergiques particulière au sein du cortex : les « neurones Hub ». Cette population possède un rôle majeur dans la synchronisation des réseaux neuronaux au niveau du cortex (Buzsáki and Draguhn, 2004) mais aussi et surtout au niveau de l'hippocampe (Bonifazi *et al.*, 2009; Villette *et al.*, 2016) indispensable à la maturation de structures cérébrales (Spitzer, 2006). Ces neurones sont générés très précocement au cours du développement et sont distincts des autres interneurones car ils possèdent un très grand nombre de connexion, c'est pourquoi ils sont qualifiés de « neurones Hub » pour *superconnected nodes*. Les « neurones Hub » sont subdivisés en différents sous-types en fonction de la morphologie de leur réseau dendritique. En effet, certains neurones possèdent une arborisation dendritique très dense et localisée et sont alors appelés « neurones Hub » *basket-like*, alors que d'autres établissent des connexions à longue distance et sont principalement localisés dans l'hippocampe ((Bonifazi *et al.*, 2009; Villette *et al.*, 2016). Une perturbation dans la mise en place de ce type d'interneurones pourrait engendrer une désynchronisation de l'activité spontanée des réseaux neuronaux en formation, et provoquer ainsi l'apparition de troubles neurologiques tels que l'épilepsie (Bui *et al.*, 2015; Case and Soltesz, 2011; Morgan and Soltesz, 2008).

### III. Rôle du glutamate pendant le neurodéveloppement

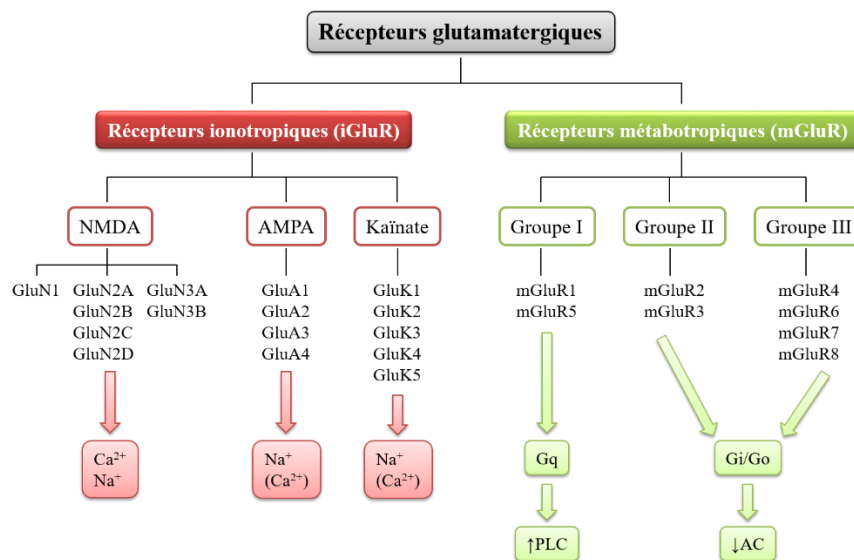
#### 1. La neurotransmission glutamatergique

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur présent en grande quantité dans le SNC des mammifères. En effet, plus de la moitié des synapses cérébrales sécrètent ce neurotransmetteur (Meldrum, 2000). Une synapse est une zone de contact assurant la communication entre deux neurones ou entre un neurone et une cellule effectrice permettant ainsi la transmission de l'influx nerveux. Elle est constituée des éléments pré- et post-synaptiques, séparés par la fente synaptique. La transmission synaptique excitatrice est principalement assurée par le glutamate et est contrebalancée par la transmission synaptique inhibitrice assurée majoritairement par le GABA, permettant ainsi une homéostasie cérébrale (El-Khoury *et al.*, 2014). Chez l'Homme, les premières étapes de la mise en place des synapses glutamatergiques dans le cortex sont terminées avant la naissance alors que chez le rongeur, ces étapes se déroulent durant les 4 semaines qui suivent la naissance (Lohmann and Kessels, 2014). Au cours d'une dépolarisation, l'élément pré-synaptique va libérer le glutamate dans la fente synaptique à partir du pool vésiculaire. Le glutamate va alors agir sur des récepteurs spécifiques situés en position post-synaptique, pré-synaptique mais aussi extra-synaptique sur des astrocytes ou encore sur des cellules endothéliales.

Le glutamate est synthétisé à partir de glutamine ou d' $\alpha$ -cétoglutarate et agit sur différents mécanismes cellulaires par l'intermédiaire de ses récepteurs. Les récepteurs au glutamate peuvent être divisés en deux types : les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (iGluR). Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G constitués d'une partie N-terminale extracellulaire et d'une partie C-terminale intracellulaire (Kim *et al.*, 2008). La famille des mGluR comprend 8 membres, regroupés en 3 sous-familles (I, II et III) selon leur homologie de séquence, leurs propriétés pharmacologiques et leurs caractéristiques de transduction du signal (Figure 31). Les récepteurs du groupe I (mGluR1 et mGluR5) sont couplés à une protéine  $G_q$  qui va donc activer la phospholipase C. Cette activation va entraîner la production de seconds messagers comme le diacylglycérol et l'inositol triphosphate qui vont à leur tour activer une protéine kinase C et entraîner la libération de  $Ca^{2+}$ , participant ainsi à l'excitabilité neuronale. Les récepteurs du groupe II (mGluR2 et mGluR3) et du groupe III (mGluR4, mGluR6,

mGluR7 et mGluR8) sont couplés quant à eux à une protéine  $G_{i/o}$  ce qui entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase provoquant ainsi la diminution de la production intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (Meldrum, 2000). Tous les mGluR sont exprimés de manière ubiquitaire au sein du SNC, à la fois dans les cellules gliales et dans les neurones, à l'exception du mGluR6, localisé spécifiquement dans la rétine. Les mGluR ne répondent qu'à des expositions prolongées au glutamate. Leur activation va donc être responsable de modulations lentes des réponses synaptiques *via* une régulation des canaux potassiques ou sodiques et des iGluR (Attwell and Gibb, 2005).

Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs tétramériques formant un canal transmembranaire perméable aux cations. Trois classes de récepteurs ionotropiques ont été identifiées en fonction de leur affinité sélective à un ligand. On retrouve ainsi les récepteurs sensibles au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA), à l' $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) et au kaïnate (Figure 32). Le récepteur NMDA est perméable principalement au  $Ca^{2+}$  alors que les récepteurs AMPA et kaïnate sont majoritairement perméables aux ions  $Na^+$ . Les récepteurs NMDA et AMPA sont les principaux récepteurs post-synaptiques, le plus souvent colocalisés au niveau de la synapse glutamatergique, alors que les récepteurs kaïnates sont pré- et post-synaptiques, jouant ainsi un rôle de modulateur de la transmission synaptique (Traynelis *et al.*, 2010a).



**Figure 32: Les différents types de récepteurs au glutamate.**

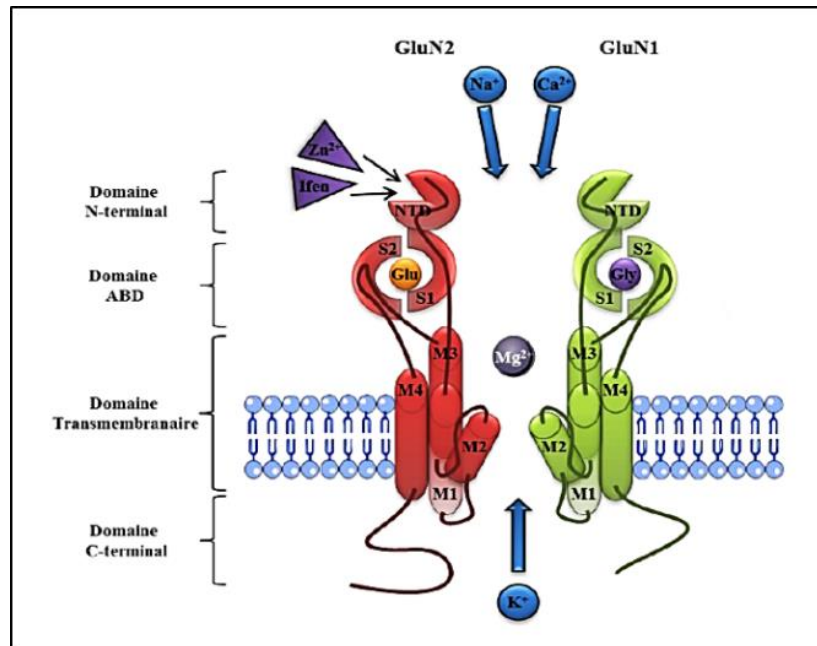
Classification des récepteurs du glutamate et voies de signalisation associées. AC : adénylate cyclase ; GluA1-4 : sous-unités des récepteurs AMPA ; GluK1-5 : sous-unités des récepteurs Kaïnate ; GluN : sous-unités des récepteurs au NMDA ; Gq : protéine G de type Gq ; Gi/Go : protéine G de type Gi/Go ; PLC : phospholipase C. D'après Chandrasekar, 2013.

Pour la suite de cet exposé, nous allons nous intéresser particulièrement au récepteur NMDA, étudié pour son implication dans les processus excitotoxiques observés dans le néocortex immature (Paoletti and Neyton, 2007).

## 2. Le récepteur NMDA

Le récepteur NMDA a été identifié dans les années 70 et depuis, son implication dans la formation des synapses, l'apprentissage, la mémoire ou encore dans les dommages ischémiques a été démontré. Ce récepteur est également impliqué dans de nombreux effets du glutamate pendant le neurodéveloppement. Par exemple, la présence de récepteur NMDA fonctionnels sur les cônes de croissance permet le guidage de l'axone et la formation initiale des synapses (Wang *et al.*, 2011). Le récepteur NMDA est un récepteur ionotrope majoritairement perméable au  $\text{Ca}^{2+}$ , mais aussi au  $\text{K}^+$  et au  $\text{Na}^+$  dans une moindre mesure, permettant ainsi une dépolarisation membranaire. Ces récepteurs sont largement exprimés dans le SNC et jouent un rôle clé dans la signalisation glutamatergique par leur diversité, leur composition en sous-unités ou leurs propriétés électrophysiologique et pharmacologique (Groc *et al.*, 2009).

Le récepteur NMDA est constitué d'un assemblage tétramérique de 3 différentes sous-unités: GluN1, GluN2 et GluN3 formant ainsi un canal perméable aux ions chargés positivement (Paoletti *et al.*, 2013). Il est composé de 2 sous-unités GluN1 obligatoires associées soit à 2 sous-unités GluN2 (formant ainsi un dihéromère) soit à une sous-unité GluN2 et à une sous-unité GluN3 (trihéromère ; Figure 33).



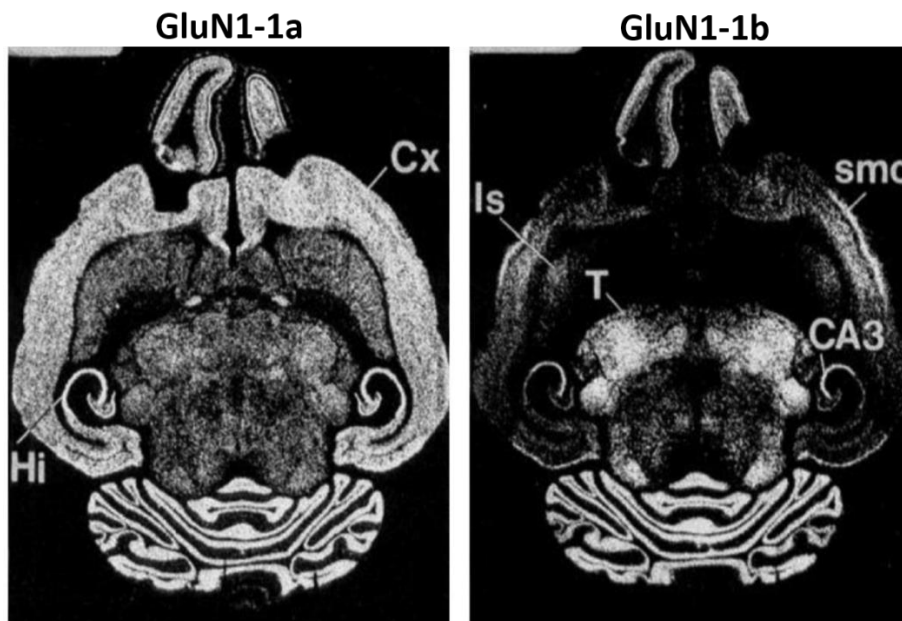
**Figure 33: Architecture transmembranaire d'un récepteur NMDA.**

La région extracellulaire du récepteur inclut le domaine N-terminal (domaine NTD : *N-terminal domain*), qui contient des sites modulateurs liant le  $Zn^{2+}$  et les sites de liaison des agonistes (domaine ABD : *Agonist Binding Domain*). Les domaines S1 et S2 du domaine ABD de la sous-unité GluN2 (sous-unité en rouge) forment le site de liaison du glutamate et ceux de la sous-unité GluN1 (sous-unité en vert) forment le site de liaison du co-agoniste, la glycine (ou D-sérine). Le canal est perméable aux ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ . Le  $Mg^{2+}$  extracellulaire induit un blocage en se fixant au cœur du canal, au potentiel de repos. La région C-terminale (domaine CTD : *C-Terminal Domain*) de la sous-unité GluN2 contient de nombreux sites d'interaction avec des protéines cytosoliques. D'après Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004.

#### a. La sous-unité GluN1

La sous-unité GluN1 est la sous-unité indispensable. C'est une glycoprotéine de 115kDa issue de la transcription d'un seul gène (*GRIN1* pour *Glutamate Receptor Ionotropic N-methyl-D-aspartate*). Il existe 8 isoformes différentes de cette sous-unité formés par épissage alternatif : GluN1-1a, GluN1-1b, GluN1-2a, GluN1-2b, GluN1-3a, GluN1-3b, GluN1-4a et GluN1-4b qui vont conférer au récepteur des propriétés fonctionnelles différentes (Vance *et al.*, 2012). Même si l'expression de GluN1 dans le SNC est ubiquitaire, l'expression de ces différents isoformes varie considérablement selon les régions cérébrales et le stade de développement (Laurie and Seeburg, 1994). Cette sous-unité permet également la fixation du co-agoniste du récepteur NMDA, la glycine ou la D-sérine.





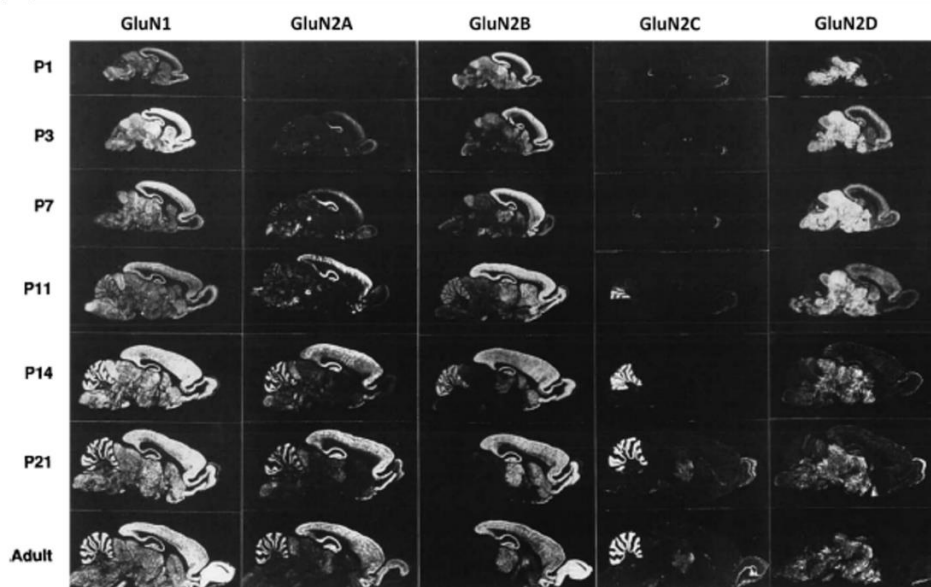
**Figure 34: Distribution des ARNm des sous-unités GluN1-1a et 1b au niveau du SNC chez le Rat.**

Profil d'expression des isoformes GluN1-1a et GluN1-1b à 12 jours postnataux illustrant les différences de distribution des différents isoformes de la sous-unité GluN1. GluN : sous-unité du récepteur NMDA ; Cx : cortex ; Hi : hippocampe ; CA3 : corne d'Ammon 3 ; Is : striatum latéral ; T : thalamus ; smc : cortex sensorimoteur. D'après Paoletti, 2011.

### **b. La sous-unité GluN2**

La sous-unité GluN2 est codée par 4 gènes différents (*GRIN2A-B-C* et *-D*) permettant ainsi la synthèse de 4 sous-types : GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D. Ces différentes sous-unités portent le site de fixation du glutamate, mais seules ou associées entre elles, elles ne peuvent former un récepteur fonctionnel. Ces sous-unités sont également les principaux facteurs de l'hétérogénéité fonctionnelle du récepteur. En effet, la composition en sous-unité GluN2 est à l'origine de la diversité des cinétiques de désactivation des courants, de la diversité de la conductance, de la sensibilité au  $Mg^{2+}$  ou de la liaison aux agonistes et antagonistes (Paoletti, 2011; Paoletti *et al.*, 2013). Ces sous-unités présentent également un profil d'expression spatio-temporelle très variable. Chez le rongeur, au stade embryonnaire, seules les sous-unités GluN2B et GluN2D sont exprimées. Après la naissance, la sous-unité GluN2A commence à être produite pour progressivement augmenter et finir par être exprimée dans pratiquement toutes les zones du SNC (Paoletti, 2011). Parallèlement, la sous-unité GluN2B voit son expression augmenter jusqu'à un pic au 7<sup>ème</sup> jour de vie post-natale pour ensuite fortement diminuer et se restreindre à quelques structures cérébrales à l'âge adulte, au profit de GluN2A : c'est le « switch » d'expression entre GluN2B et GluN2A (Liu *et al.*, 2004). La sous-

unité GluN2C est quant à elle principalement restreinte au cervelet, aux bulbes olfactifs et à l'hippocampe et son expression apparait plus tardivement, vers 10 jours de vie (Cull-Candy *et al.*, 2001). Enfin ; la sous-unité GluN2D est retrouvée uniquement dans le diencéphale et le tronc cérébral et son expression est plus faible que les autres sous-unités (Cull-Candy *et al.*, 2001).



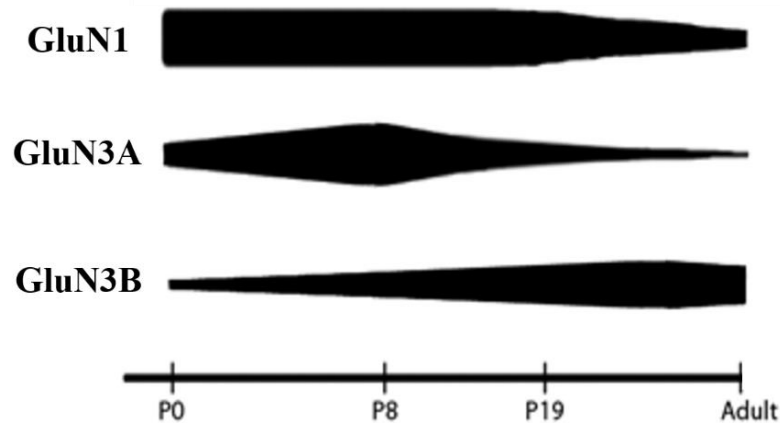
**Figure 35: Distribution des ARNm des sous-unités GluN1 et GluN2 au niveau du SNC chez le Rat.**

Modifications postnatales de l'expression des ARNm des sous unités GluN1, GluN2A, B, C, D. GluN : sous-unité du récepteur NMDA ; PX : jour postnatal X. D'après Paoletti, 2011.

### c. La sous-unité GluN3

La sous-unité GluN3 possède 2 sous-types : GluN3A et GluN3B, codés par 2 gènes différents. Ces sous-unités ne possèdent pas de site de liaison au glutamate mais possèdent un site de liaison pour son co-agoniste : la glycine (Henson *et al.*, 2010). Il a été démontré que l'association de cette sous-unité avec les sous-unités GluN1 et GluN2 diminue la conductance et la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la sensibilité au  $\text{Mg}^{2+}$  (Domingues *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2008). De plus, cette sous-unité se comporte comme un « frein moléculaire » de la maturation synaptique. En effet, sa surexpression entraîne une diminution de la croissance des synapses et de la densité des épines dendritiques tandis que sa sous-expression accélère la maturation synaptique (Roberts *et al.*, 2009). L'expression de la sous-unité GluN3A augmente jusqu'à atteindre son maximum à P8 et décroît à partir de P12 jusqu'à l'âge adulte pour quasiment disparaître sauf dans quelques zones du SNC comme le thalamus, l'amygdale ou encore le

tronc cérébral (Pachernegg *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2002). A l'opposé, la sous-unité GluN3B est très faiblement exprimée en période périnatale puis son expression augmente progressivement pour devenir maximale et ubiquitaire à l'âge adulte (Low and Wee, 2010).



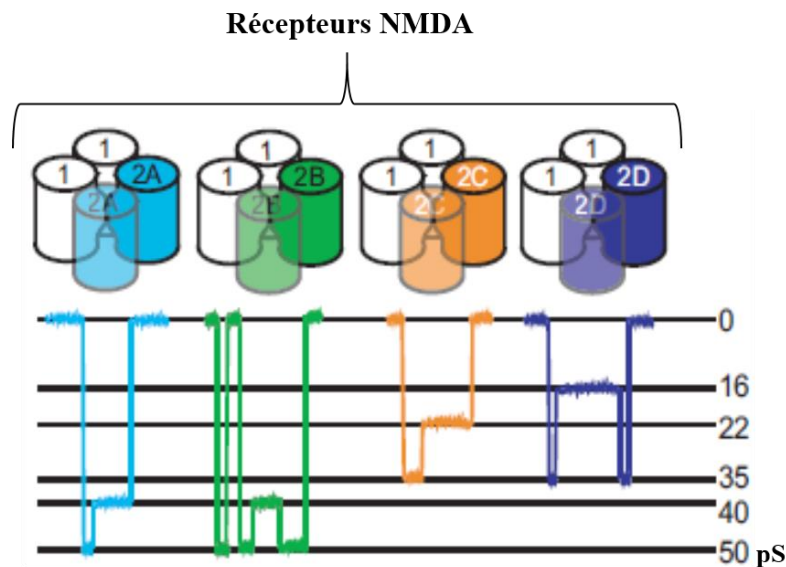
**Figure 36: Expression des sous-unités GluN1, GluN3A et GluN3B chez le Rat au cours du développement.**  
Profil d'expression des sous-unités GluN1, GluN3A et GluN3B à différents stades de développement chez le Rat, P0, P8, P19 et stade adulte. GluN : sous-unité du récepteur NMDA ; PX : jour postnatal X. D'après Low and Wee, 2010.

#### **d. Propriétés électrophysiologiques du récepteur NMDA**

Le récepteur NMDA est un récepteur canal perméable aux cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ). Dans des conditions de potentiel de membrane de repos, c'est-à-dire  $-60\text{mV}$ , le canal est bloqué par un ion magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). L'activation des récepteurs AMPA avoisinants va entraîner une dépolarisation membranaire amenant le potentiel de membrane à  $-40\text{mV}$  et permettant ainsi la libération de cet ion et donc le passage des cations à travers le canal lorsque le glutamate se fixe sur le récepteur NMDA. Il a été démontré que le récepteur AMPA possédait une cinétique d'activation et de désactivation plus rapide que le récepteur NMDA (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

Différents sous-types de récepteur NMDA coexistent au sein du SNC, caractérisés par des propriétés électrophysiologiques particulières, directement liées à la combinaison tétramérique des sous-unités. Les récepteurs NMDA sont ainsi divisés en 2 classes : « les canaux à forte conductance », formés par les récepteurs comprenant les sous-unités GluN2A

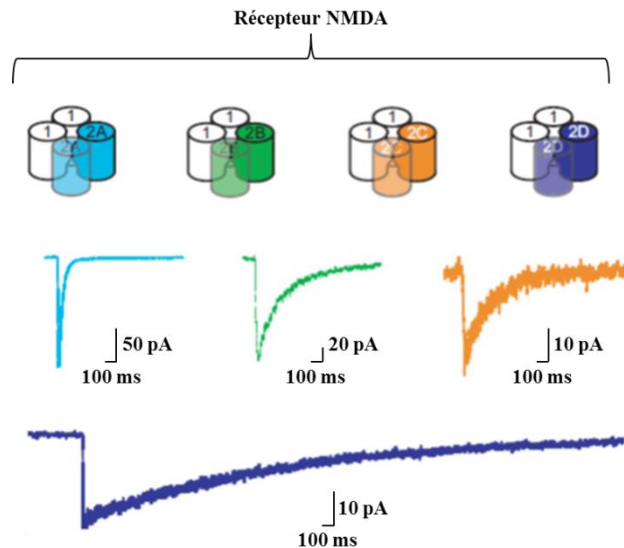
et GluN2B, et les « canaux à faible conductance » formés par ceux dotés des sous-unités GluN2C et GluN2D (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).



**Figure 37: Conductance des récepteurs NMDA en fonction de leur composition en sous-unité GluN2.**

Le type de sous-unité GluN2 composant le R-NMDA est déterminant pour les propriétés du récepteur. Les R-NMDA riches en sous-unités GluN2A (turquoise) et GluN2B (vert) forment des canaux de forte conductance (40 à 50 pS), tandis que les R-NMDA possédant les sous-unités GluN2C (orange) et GluN2D (bleu) forment des canaux de faible conductance (GluN2C : 22 à 35 pS ; GluN2D : 16 à 35 pS). D'après Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004.

L'affinité des récepteurs pour l'ion  $Mg^{2+}$  varie selon leur composition en sous-unité GluN2. En effet, les R-NMDA contenant les sous-unités GluN2A ou GluN2B présentent une plus grande affinité pour le  $Mg^{2+}$  que les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D (Monyer *et al.*, 1994). Il a également été démontré que les récepteurs NMDA trihétéromères contenant les sous-unités GluN2 et GluN3 ont une perméabilité calcique plus faible que les dihétéromères GluN1/GluN2 (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). La cinétique de désactivation du récepteur varie également en fonction de sa composition en type de sous-unité GluN2. Les récepteurs NMDA présentant la sous-unité GluN2A ont une cinétique de désactivation rapide (100 ms), c'est-à-dire que le temps de décroissance du signal électrophysiologique est très court, tandis que les récepteurs possédant les sous-unités GluN2B ou GluN2C présentent une cinétique de désactivation plus longue (250 ms) mais qui reste cependant plus courte que celle des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2D (4 s) (Figure 38 ; (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004)



**Figure 38: Cinétique de désactivation des récepteurs NMDA en fonction de leur composition en sous-unités GluN2.**

Suite à l'application de 1mM de glutamate pendant 1 ms, les constantes de temps de désactivation du récepteur sont : GluN2A (turquoise), 100 ms ; GluN2B (vert), 250 ms ; GluN2C (orange), 250ms ; GluN2D (bleu), 4 s. D'après Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004.

Il est à noter que l'activité des récepteurs NMDA peut être modulée positivement ou négativement par des molécules ou des ions pouvant agir sur différents sites dont le site de fixation du glutamate, ou du co-agoniste mais aussi sur le canal et l'ion  $Mg^{2+}$ . À titre d'exemples, le MK801, la kétamine ou encore la mémantine vont agir comme des bloqueurs intra-canaux, mais avec des propriétés pharmacologiques différentes alors que l'ifenprodil est un antagoniste non compétitif interagissant préférentiellement avec la sous-unité GluN2B (Gray *et al.*, 2016; Paoletti and Neyton, 2007).

### 3. Glutamate et neurodéveloppement

Il a été démontré que le glutamate joue un rôle majeur au cours du neurodéveloppement et que les précurseurs neuronaux possèdent des récepteurs au glutamate bien avant l'étape de la synaptogenèse (Luján *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2001). Par exemple, la présence de récepteurs NMDA sur les précurseurs des cellules granulaires a été démontré comme précédant l'apparition des synapses (Komuro and Rakic, 1993). Il a également été mis en évidence que l'inhibition du récepteur NMDA entraînait un arrêt de la maturation pouvant mener à la mort cellulaire (Adams *et al.*, 2004; Fiske and Brunjes, 2001; Roux *et al.*, 2015) alors

qu'à l'inverse, l'activation de ces récepteurs régule la prolifération cellulaire des précurseurs glutamatergiques et promeut la migration et la différenciation neuronale ainsi que la synaptogenèse (Luhmann *et al.*, 2015; Pérez-Otaño and Ehlers, 2004; Pregno *et al.*, 2011; Tanaka, 2013). De plus, l'inactivation de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA dans les interneurons GABAergiques conduit à l'apparition de troubles comportementaux et physiologiques de type schizophrénique. En effet, l'hypofonctionnement de la transmission de ces interneurons entraîne une désynchronisation de l'activité électrique et donc un déséquilibre de la balance excitation/inhibition au sein du SNC (Belforte *et al.*, 2010).

Le glutamate, *via* le récepteur NMDA, joue également un rôle crucial dans la plasticité synaptique, plasticité associée au processus de potentialisation à long terme (LTP) qui va permettre une stimulation durable et synchrone entre deux neurones, et de dépression à long terme (LTD) qui, au contraire, ramène les synapses à un niveau d'activité basale (Dalton *et al.*, 2012; Latif-Hernandez *et al.*, 2016; Sanderson *et al.*, 2016). Ces deux processus sont impliqués dans les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage.

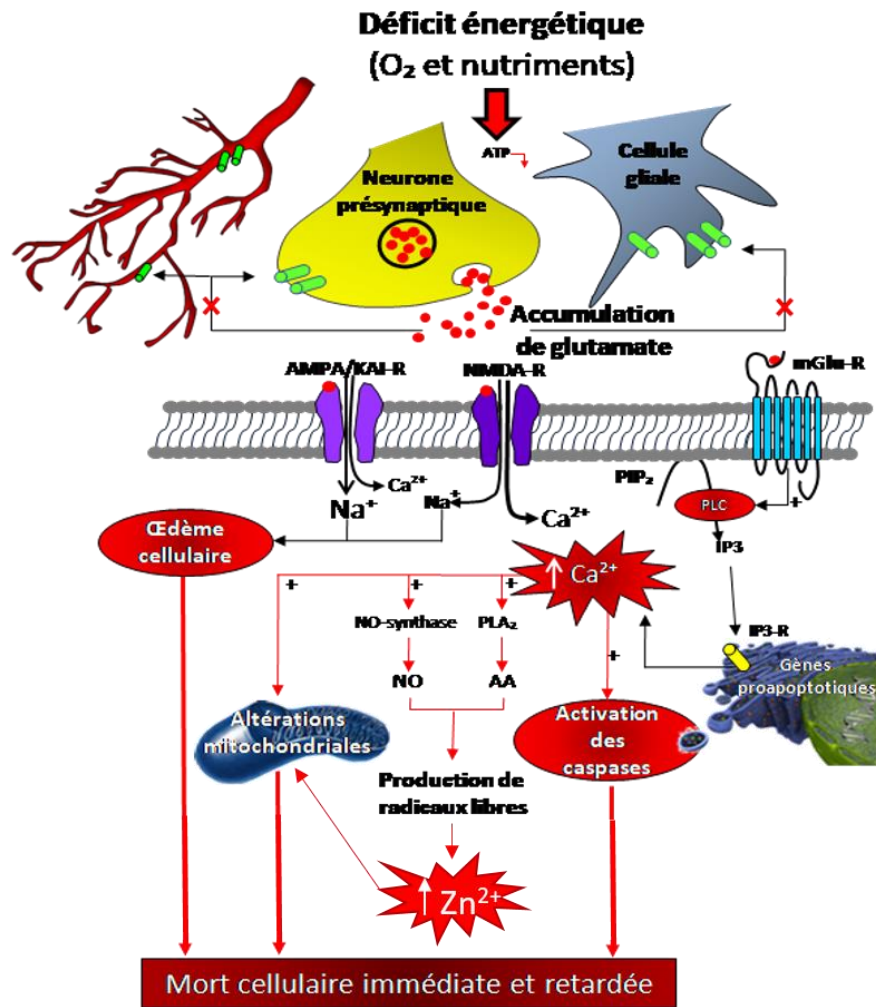
Toutes ces données suggèrent qu'une inhibition du récepteur NMDA pendant le développement aurait un effet délétère sur la mise en place des réseaux neuronaux, sur les fonctions cognitives ainsi que sur la mémorisation et l'apprentissage (Akgül and McBain, 2016; Zhu *et al.*, 2016) et pourrait être liée à l'apparition de différentes pathologies comme le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF ; (Olney *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*, 2008) ou encore la schizophrénie (Rompala *et al.*, 2013).

#### **4. Excitotoxicité et pathologies cérébrales associées**

En 1969, Olney démontre qu'une injection de glutamate induit une neurodégénérescence de la rétine mais également de l'ensemble du SNC chez le Singe (Olney, 1969; Olney and Sharpe, 1969). Il décrit par la suite le concept d'excitotoxicité comme étant une mort neuronale induite par une stimulation massive des récepteurs glutamatergiques des synapses excitatrices (Olney, 1984).

Ce phénomène d'excitotoxicité est causé par un déficit d'oxygénation et de perfusion (hypoxo-ischémie) conduisant à un déséquilibre entre les apports énergétiques et les besoins des cellules nerveuses. Cette défaillance énergétique va se traduire par une déplétion des

réserve en adénosine triphosphate (ATP) et un dysfonctionnement des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-dépendantes, qui aboutit à une dépolarisation neuronale. En se dépolarisant, les neurones vont libérer de façon massive et incontrôlée le glutamate. L'accumulation de glutamate au niveau synaptique et extra-synaptique est favorisée par le blocage des systèmes de recapture ATP-dépendant du glutamate (*excitatory amino acid transporters* ou EAATs) présents au niveau neuronal, glial et vasculaire (Perego *et al.*, 2000; Rueda *et al.*, 2015). Cette concentration anormale de glutamate va entraîner d'une part, une stimulation excessive des récepteurs AMPA et kainate provoquant une entrée massive de  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Cet influx de  $\text{Na}^+$  va conduire à une entrée d'eau qui induira un œdème cellulaire et la destruction du tissu nerveux *via* un processus nécrotique (Bonde *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2013). De plus, l'activation prolongée des récepteurs NMDA et la dépolarisation des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire vont entraîner un important influx calcique, qui sera augmenté par la mobilisation du calcium intracellulaire, notamment stocké dans le réticulum endoplasmique, suite à l'activation de la voie de l'inositol triphosphate *via* les récepteurs métabotropiques (Mehta *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2005). Cette concentration intracellulaire excessive de calcium va conduire à l'activation des protéases (dégradant le cytosquelette), de lipases telles que la phospholipase  $A_2$  (générant des radicaux libres), l'activation de la calmoduline, de NO-synthases et à l'induction de gènes précoces impliqués dans l'expression ou la régulation de l'apoptose (Gavaldà *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 2013). Il a été récemment décrit que cette production de radicaux libres va entraîner une mobilisation du Zinc intracellulaire responsable entre autre des altérations des mitochondries (Granzotto and Sensi, 2015). A terme, la mise en place de cette cascade conduit à une mort neuronale importante, une activation microgliale, une prolifération astrocytaire et un réarrangement microvasculaire (Kaindl *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2013). L'ensemble de ces effets immédiats et retardés du glutamate va aboutir au développement de lésions cérébrales (Figure 39).



**Figure 39: Schéma illustrant les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique.**

La libération massive et incontrôlée du glutamate associée au blocage de ses systèmes de recapture provoque une accumulation du neurotransmetteur au niveau synaptique et extrasynaptique. La suractivation des récepteurs ionotropiques et métabotropiques modifie l'homéostasie ionique pouvant conduire à un œdème cellulaire, une augmentation excessive des concentrations de calcium intracellulaire, un stress oxydatif et l'activation des caspases. Selon l'intensité de ces différents processus, la cellule pourra dégénérer selon un mécanisme nécrotique (mort immédiate) ou apoptotique (mort retardée). + : effet stimulateur ; AA : acide arachidonique ; AMPA/KAI-R : récepteur  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate/kainate du glutamate ; ATP : adénosine triphosphate ;  $\text{Ca}^{2+}$  : ion calcium ; IP3 : inositol triphosphate ; IP3-R : récepteur de l'inositol triphosphate ;  $\text{Na}^+$  : ion sodium ; NMDA-R : récepteur N-méthyl-D-aspartate du glutamate ; NO : monoxyde d'azote ; mGlu-R : récepteur métabotropique du glutamate ;  $\text{PIP}_2$  : phosphatidylinositol bisphosphate ;  $\text{PLA}_2$  : phospholipase A<sub>2</sub> ; PLC : phospholipase C. Les flèches noires reflètent les voies classiquement associées à la transmission glutamatergique et dont la dérégulation aboutira à l'induction d'un processus excitotoxique.

Dans le SNC mature, la cascade excitotoxique est impliquée dans divers types de lésions cérébrales. En effet, on retrouve ce mécanisme lors de processus hypoxo-ischémique (Hsieh *et al.*, 2017), d'accident traumatique (Sommer *et al.*, 2017) et de phénomènes épileptiques (Vishnoi *et al.*, 2016). L'excitotoxicité est aussi au cœur du déclin neuronal observé dans les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Pallo *et al.*, 2016), la maladie



de Parkinson (Blaylock, 2017), la maladie de Huntington (Beste *et al.*, 2015) ou encore dans la sclérose latérale amyotrophique (Grigoriev *et al.*, 2016).

Dans le SNC immature, elle est un acteur majeur de la mise en place des lésions cérébrales du nouveau-né (Volpe, 2009a).

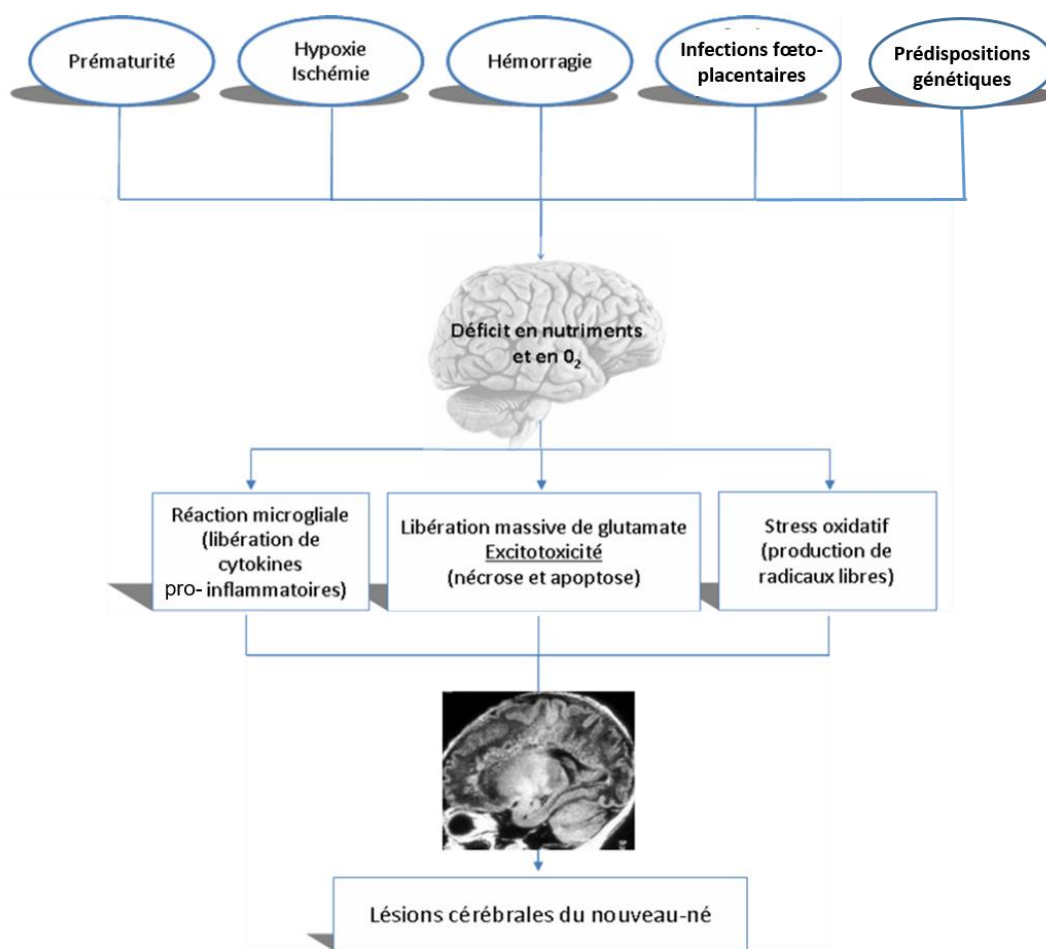
## **5. Rôles du système glutamatergique dans les lésions cérébrales du nouveau-né**

Chez le nouveau-né, les lésions cérébrales du nouveau-né sont la première cause de décès ou de handicaps (moteurs ou cognitifs). Comme son nom l'indique, ces lésions décrivent un ensemble de désordres caractérisés par des troubles permanents des fonctions motrices et/ou cognitives causés par des dommages affectant le cerveau immature (Andersen *et al.*, 2011). En plus de ces atteintes motrices et cognitives, il est également retrouvé dans 25 à 50 % des cas, des troubles du comportement, de l'attention ou de la socialisation chez ces patients (Marret *et al.*, 2013). La prévalence des infirmités motrices d'origine cérébral (IMC) diminue depuis les années 80, passant de 1,90 à 1,77 enfants pour 1000 naissances (Sellier *et al.*, 2016). On observe également une diminution significative de la mortalité périnatale grâce aux progrès réalisés dans la prise en charge et la réanimation des nouveau-nés. Les patients présentant une paralysie cérébrale nécessitent une prise en charge lourde et très longue, souvent à vie, ce qui représente un coût sociétal élevé estimé dans une étude danoise à environ 850 000 € par patient (Kruse *et al.*, 2009). Les IMC sont donc un problème de santé publique, aussi bien au niveau médical, avec une forte prévalence, qu'au niveau social et économique.

On peut identifier plusieurs facteurs de risque, comme un poids de naissance et un âge gestationnel faibles (Blair and Watson, 2006; Himmelmann and Uvebrant, 2014). En plus de la prématurité, il a été identifié différents événements survenant pendant la grossesse ou l'accouchement comme facteurs de risques de l'apparition de ces lésions cérébrales. C'est notamment le cas des infections foëto-placentaires (toxoplasmose ou cytomégalo virus), de l'exposition à des substances toxiques (alcool ou drogues), des accidents hypoxo-ischémiques ou encore la survenue d'hémorragies cérébrales. Ces événements vont être à l'origine d'un déficit en nutriments, en oxygène et en différents facteurs trophiques ce qui va entraîner différentes réactions, comme la libération de cytokines pro-inflammatoires par la microglie

(Favrais *et al.*, 2011; Kaindl *et al.*, 2012), une excitotoxicité par la libération massive de glutamate ou encore un stress oxydatif par la production de radicaux libres (Buonocore *et al.*, 2017), qui vont être à l'origine des lésions cérébrales du nouveau-né (Volpe, 2009b). De plus, il a été récemment suggéré que certains patients présentant des paralysies cérébrales présentent des prédispositions génétiques. En effet, ces enfants présenteraient des mutations de gènes impliqués dans le neurodéveloppement et la synaptogenèse, comme les protéines AP4 (*activating enhancer binding protein 4*), KANK1 (*KN Motif And Ankyrin Repeat Domains*) ou encore ADD3 (*Adducin 3*), ainsi que des variations des CNV (*copy number variants*) de ces mêmes gènes (Fahey *et al.*, 2017).

Enfin, il est important de préciser que la vulnérabilité des différentes structures cérébrales varie en fonction de leur degré de maturation. Chez les enfants nés à terme, c'est la substance grise, en cours de maturation, qui est particulièrement sensible alors que chez les grands prématurés (avant 33 semaines d'aménorrhée), des lésions de la substance blanche, regroupées sous le terme de leucomalacies périventriculaires sont préférentiellement observées (Pavlova and Krägeloh-Mann, 2013). Ces lésions de la substance blanche affectent entre 5 et 15 % des prématurés et constituent les causes les plus fréquentes de paralysie cérébrale chez ces enfants. En raison des progrès réalisés dans la prise en charge périnatale des nouveau-nés prématurés, la proportion des lésions focales majeures a très fortement diminuée au profit de lésions diffuses de la substance blanche (Delcour *et al.*, 2012). Ces lésions sont caractérisées par une astrogliose réactionnelle diffuse, une activation microgliale, une hypomyélinisation et une dégénérescence axonale (Kaindl *et al.*, 2009) et sont souvent associées à des troubles comportementaux, cognitifs et sensorimoteurs comme des troubles de la discrimination tactile et de la proprioception (Delcour *et al.*, 2012).



**Figure 40: Etiologie des lésions cérébrales du nouveau-né.**

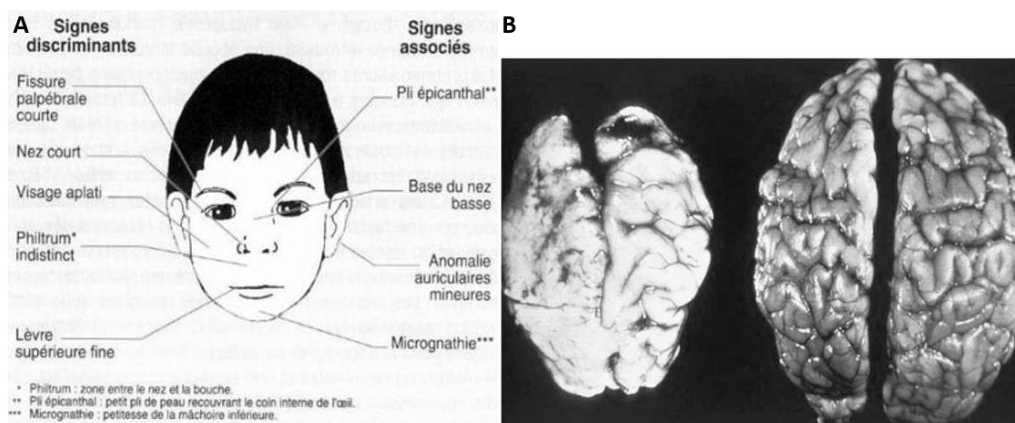
La prématurité, les troubles vasculaires, les infections fœto-placentaires ainsi que certaines prédispositions génétiques sont à l'origine d'un déficit énergétique qui va provoquer une perturbation de l'homéostasie nerveuse. Il en résulte le développement d'un processus inflammatoire, d'une excitotoxicité et d'un stress oxydatif conduisant au développement de lésions cérébrales. D'après Volpe, 2009b.

De la même manière, certains types cellulaires seront plus affectés que d'autres en fonction du degré de maturation du cerveau. Ainsi, chez les prématurés, les précurseurs d'oligodendrocytes constituent une population particulièrement sensible vis-à-vis d'un stress excitotoxique (Back and Rosenberg, 2014; Volpe, 2011). C'est pourquoi on observe préférentiellement des pathologies de la substance blanche à cet âge. Concernant les nouveau-nés à terme, certaines populations neuronales s'avèrent plus vulnérables que d'autres. En effet, des études menées chez le nouveau-né humain atteint de lésions cérébrales montrent, hormis des atteintes de la substance blanche, une importante diminution du nombre d'interneurones GABAergiques au sein du néocortex (Robinson *et al.*, 2006). La perte des neurones GABAergiques est impliquée dans le syndrome de Miller-Dieker (Pancoast *et al.*, 2005), l'autisme (Maloney *et al.*, 2013) ou encore la schizophrénie (Nakazawa *et al.*, 2012).

## IV. L'alcoolisation prénatale

### 1. La consommation d'alcool pendant la grossesse et ses conséquences

La consommation d'alcool par l'Homme de manière générale est décrite depuis 7000 avant Jésus-Christ et la consommation spécifique d'alcool par les femmes pendant la grossesse ainsi que les conséquences chez les nouveau-nés remonte à au moins plusieurs siècles. En effet, Aristote décrivait au 4<sup>ème</sup> siècle avant J-C que « les femmes insensées, ivres et farfelues engendrent le plus souvent des enfants semblables à elles-mêmes, moroses et alanguis ». Il faut cependant attendre jusqu'en 1968 pour qu'un pédiatre français, Paul Lemoine, décrive de façon exhaustive le tableau clinique d'enfants souffrant d'atteintes associées à une exposition périnatale à l'alcool (Lemoine *et al.*, 2003). Le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale ou SAF est, quant à lui, décrit en 1973 (Jones and Smith, 1973). Le SAF se caractérise par un retard de croissance, une dysmorphie faciale (une hypoplasie de l'étage moyen de la face, un philtrum long et plat, une lèvre supérieure fine, des petits yeux largement espacés, un raccourcissement de la fente des paupières), une microcéphalie, des malformations cardiaques et squelettiques, des troubles du développement cérébral et notamment du corps calleux pouvant mener à une agénésie (Mattson *et al.*, 1997).



**Figure 41: Illustration des effets d'une alcoolisation *in utero* chez l'Homme.**

A : Dysmorphie cranio-faciale caractérisée entre autre par une fissure palpébrale courte, un nez court, un visage aplati, un philtrum indistinct et une lèvre supérieure fine. A ces anomalies peuvent s'ajouter un pli épicanthal, une base du nez basse, des anomalies auriculaires mineures et une micrognathie. B : Photographies d'un cerveau d'un enfant SAF à gauche versus celui d'un enfant sain à droite. D'après Clarke and Gibbard, 2003.

Cependant, une exposition prénatale à l'alcool ne se limite pas qu'à un phénotype SAF car tous les enfants ne présentent pas l'ensemble de ces signes et il existe donc une déclinaison de troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF ou FASD en anglais pour *Fetal Alcohol Spectrum Disorder* (Hoyme *et al.*, 2005; Sokol *et al.*, 2003). En France, ainsi que dans tous les autres pays industrialisés, on estime la prévalence du SAF à 1 – 1,5 enfant pour 1000 naissances et celle des TCAF à 1 pour 100 enfants (INSERM Collective Expertise Centre, 2000; Popova *et al.*, 2017). Cependant, dans certains pays en développement comme l'Afrique du sud, la prévalence du SAF peut drastiquement augmenter pour atteindre une valeur de 60 % naissances dans certaines communautés (Viljoen *et al.*, 2005).

D'un point de vue comportemental, les atteintes nerveuses causées par l'alcool peuvent se traduire par des déficits intellectuels, des troubles de l'apprentissage, de l'attention ou de la mémoire, ou encore par une hyperactivité (Tsang *et al.*, 2017, 2016). En effet, une diminution des capacités intellectuelles est observée chez les patients SAF, avec un quotient intellectuel moyen estimé à 70 (Lewis *et al.*, 2012). De plus, l'hippocampe, structure responsable des processus d'apprentissage et de mémorisation, est une structure dont le développement est particulièrement sensible aux effets tératogènes de l'éthanol, notamment au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse (Livy *et al.*, 2003). Ainsi, les enfants SAF présentent des problèmes d'apprentissage et de mémoire, notamment dans la mémorisation et les rappels des informations verbales et non verbales (Willoughby *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le SAF est également associé à des déficits de la fonction motrice (Williams *et al.*, 2014) comme des retards dans le développement moteur (Kalberg *et al.*, 2006), une diminution du temps de mise en mouvement (Simmons *et al.*, 2010), des anomalies du contrôle oculomoteur (Simmons *et al.*, 2010), des défauts dans la stabilité et l'équilibre posturale (Roebuck *et al.*, 1998) ou encore un retard dans l'exécution des mouvements dirigés (Domellöf *et al.*, 2011). De plus, ce syndrome est aussi associé à des troubles du langage, notamment dans la capacité sémantique et la compréhension grammaticale ce qui entraîne une difficulté à maintenir une conversation (Wyper and Rasmussen, 2011). D'autre part, des défauts d'attention sont fréquemment observés chez les patients SAF, qui montrent un risque élevé de développer une hyperactivité et des déficits d'attention (ADHD), une hyperkinésie, ainsi que des désordres psychiatriques comme la dépression (Steinhausen *et al.*, 1993). Il a été démontré que les effets d'une alcoolisation *in utero* perdurent à vie (Day and Richardson,

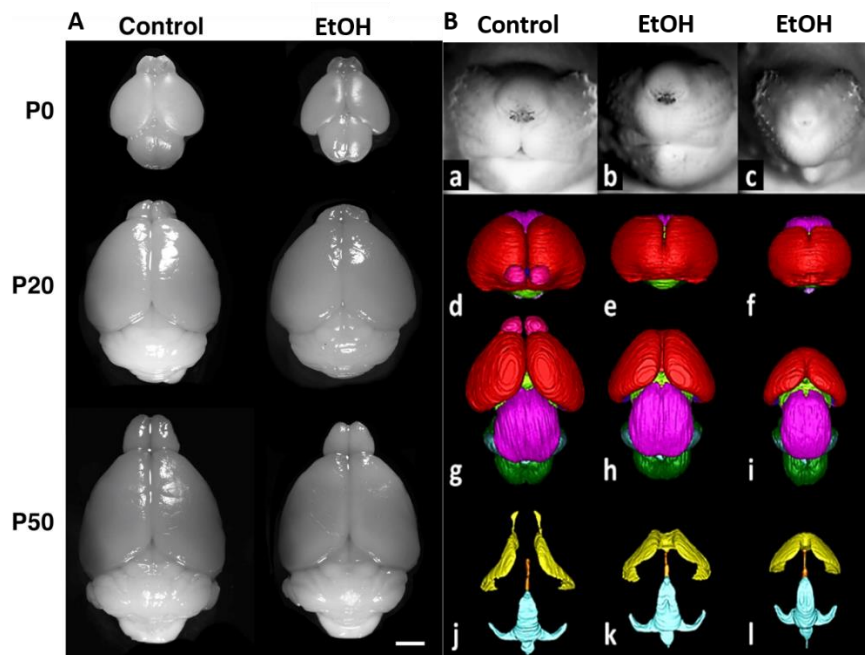
2004) et vont compromettre de façon durable l'insertion dans la société des individus concernés (Streissguth *et al.*, 1991a). Par exemple, 43 % des enfants américains présentant un SAF sont exclus du système scolaire et 70 % interrompent leur scolarité (Streissguth *et al.*, 1991b). Plus récemment, une étude menée sur la population canadienne a révélé que le coût imputable à la société pour la prise en charge et le manque à gagner représenté par ces enfants et jeunes adultes diagnostiqués TCAF est estimé à 1,8 milliard de dollars canadiens sur une année (Popova *et al.*, 2016). Enfin, il a été décrit que l'alcoolisation pré-natale va favoriser un terrain addictif. Ainsi, un lien a été établi entre une exposition pré et/ou périnatale à l'alcool et une susceptibilité favorisant les futurs comportements addictifs de l'individu (Coles and Platzman, 1993; Fabio *et al.*, 2013).

L'alcool consommé par la mère va arriver jusqu'au fœtus par diffusion passive *via* le placenta. Il a été démontré que l'alcoolémie de la mère et du fœtus sont identiques, néanmoins, le fœtus ne pouvant métaboliser l'alcool, son élimination devra se faire par retour dans la circulation maternelle ou encore par son passage dans le liquide amniotique. En plus de passer la barrière placentaire, il est connu que l'éthanol passe également la barrière hémato-encéphalique car c'est une molécule de bas poids moléculaire (46,06844 g/mol). Même s'il n'existe pas de seuil de toxicité, les conséquences d'une alcoolisation prénatale dépendent de certains paramètres tels que : la dose, la durée et la période d'exposition. En effet, il a été démontré que plus la quantité d'alcool consommée est importante, plus les symptômes seront importants (Sood *et al.*, 2001). Ces conséquences dépendent également de la période de gestation durant laquelle l'alcoolisation se déroule. En effet, même si le cerveau en développement est extrêmement sensible aux effets toxiques de l'alcool tout au long de sa formation, une alcoolisation au 1<sup>er</sup> trimestre de gestation induit en majeure partie des dysmorphies faciales et une atteinte des organes, alors qu'une alcoolisation au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre engendre le plus souvent des troubles du comportement et des retards mentaux (Guerra *et al.*, 2009). Ces effets sévères sur le développement cérébral fœtal sont à l'origine de dommages cérébraux responsables des désordres sociaux, des anomalies cognitives et comportementales observés à long terme et précédemment décrites (Guerra *et al.*, 2009).

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le TCAF, de nombreuses études ont été conduites chez l'animal, dans le but de comparer les atteintes développementales à

celles retrouvées chez l'Homme. On retrouve par exemple les anomalies de la face à la fois chez l'Homme et chez l'animal ainsi que les anomalies du neurodéveloppement (Godin *et al.*, 2010). Il a notamment été démontré qu'une consommation d'alcool durant la période de développement cérébral impacte négativement la migration et la prolifération neuronales (El Fatimy *et al.*, 2014; Luo and Miller, 1998), entraîne un retard de croissance intra-utérin et une microcéphalie (Abbott *et al.*, 2016), augmente la mortalité apoptotique (Farber *et al.*, 2010; Naseer *et al.*, 2014), perturbe la gliogenèse des astrocytes (Manzo-Avalos and Saavedra-Molina, 2010) ou encore la maturation des oligodendrocytes (Coutts and Harrison, 2015). Plus précisément, il est observé une ventriculomégalie (Swayze *et al.*, 1997) associée à des anomalies des ganglions de la base (Mattson *et al.*, 1996), du corps calleux (Sowell *et al.*, 2001), de l'hippocampe (Berman and Hannigan, 2000), de l'hypothalamus (Agapito *et al.*, 2014), de l'hypophyse, du cervelet, du bulbe olfactif (Washburn *et al.*, 2015), du diencephale (Livy *et al.*, 2001) et du tronc cérébral (Dikranian *et al.*, 2005). En outre, des anomalies corticales ont été mises en évidence avec un élargissement des sillons corticaux (Autti-Rämö *et al.*, 2002), une réduction de la taille du cortex frontal (Wass *et al.*, 2001), ainsi qu'un volume, une surface et une épaisseur anormale du cortex (Sowell *et al.*, 2008). Il est également décrit que les aires sensorielles primaires (Leigland *et al.*, 2013) ainsi que le cervelet sont des zones particulières sensibles aux effets de l'alcool. En effet, une exposition anténatale à l'alcool entraîne une dégénérescence cérébelleuse (Jaatinen and Rintala, 2008) associée à une diminution du volume et de la surface du cervelet, entraînant de nombreux déficits moteurs, mais également une altération du vermis antérieur du cervelet (O'Hare *et al.*, 2005) responsable de problèmes d'apprentissage verbal et de mémoire. Il est à noter que les régions cérébrales sont plus ou moins sensibles aux effets de l'éthanol. On observe par exemple que la diminution du volume de la substance blanche est plus importante que celle de la substance grise et que les lobes pariétaux sont plus touchés que les lobes temporaux ou occipitaux (Archibald *et al.*, 2001; Spadoni *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré au sein du laboratoire qu'une alcoolisation *in utero* perturbe l'angiogenèse cérébrale entraînant une complète désorganisation du réseau vasculaire cérébral (Jégou *et al.*, 2012).

Enfin, le système visuel est également affecté par une exposition prénatale à l'éthanol qui entraîne par exemple des anomalies au niveau du nerf optique ainsi qu'une apoptose pendant les étapes de synaptogenèse (Tenkova *et al.*, 2003).



**Figure 42: Illustration des effets d'une alcoolisation *in utero* chez la Souris.**

A : Images dorsales de cerveaux de souris contrôles et alcoolisées *in utero*. On remarque une diminution de la taille de manière générale, ou microcéphalie, chez les souris ayant reçu de l'alcool pendant la gestation. B : (a) Photo d'un fœtus de souris non exposé à l'éthanol et (b,c) deux exemples de fœtus présentant à des degrés divers des anomalies de la face, telles qu'une mandibule inférieure réduite et un sillon médian réduit voire absent au niveau du museau. (d-i) Reconstruction 3D des cerveaux et (j-l) de la morphologie des ventricules cérébraux. On note notamment une régression des bulbes olfactifs, de la taille des hémisphères cérébraux et une déformation des ventricules cérébraux. D'après Abbott *et al.*, 2016; Godin *et al.*, 2010.

## 2. Mécanismes d'action de l'éthanol

L'éthanol, qui ne possède pas de récepteur propre, va induire des effets délétères sur le développement cérébral *via* des mécanismes variés, de natures génétique, biochimique et cellulaire, entraînant ainsi des perturbations du neurodéveloppement. Une consommation d'éthanol pendant la grossesse perturbe toutes les étapes de la mise en place du système nerveux, telles que la prolifération cellulaire, la migration, la croissance et la différenciation.

### a. La fenêtre d'exposition à l'éthanol

Comme cité précédemment, les conséquences d'une alcoolisation prénatale vont être différentes suivant la fenêtre d'exposition. Plus précisément, il est décrit dans la littérature qu'une exposition à l'alcool au moment de la gastrulation perturbe l'extension de la plaque



préchordale et la voie de signalisation hedgehog impliquée dans l'organogenèse et la production des progéniteurs neuraux (Rubert *et al.*, 2006), ce qui provoque une malformation cérébrale : holoprosencéphalie, associée à une dysmorphie faciale (Smith *et al.*, 2014; Sulik, 2005). Plus tard, pendant l'embryogenèse, il a été démontré qu'une exposition *in utero* à l'éthanol entraîne une diminution du nombre de neurones dans l'hippocampe (Miller, 1995) et altère la migration cellulaire dans le cervelet et le cerveau (Aronne *et al.*, 2011; de la Monte *et al.*, 2009). En effet, au début de la neurogenèse (3<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme), l'éthanol cause une mort cellulaire apoptotique dans les crêtes neurales ce qui entraîne notamment une hypoplasie faciale (Smith *et al.*, 2014). Plus tard, pendant les phases de prolifération et de migration des cellules neuroépithéliales (7<sup>ème</sup> à 20<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme) l'éthanol perturbe la migration neuronale et entraîne une diminution du nombre de cellules gliales. Au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre, période la plus sensible aux effets neurotoxiques de l'alcool, on observe une perturbation de la synaptogenèse avec une diminution de la formation des synapses associée à une mort cellulaire (Ikonomidou *et al.*, 2000).

### **b. Les cibles de l'alcool**

Il est démontré dans la littérature une étroite interaction entre l'éthanol et les systèmes de neurotransmission, notamment le système inhibiteur GABAergique (Zorumski *et al.*, 2014a) et le système excitateur glutamatergique (Nevo and Hamon, 1995). Il a également été montré que l'éthanol interagissait avec les systèmes sérotoninergique et dopaminergique (Buske and Gerlai, 2011; Fernandes *et al.*, 2015).

Une des cibles principales de l'éthanol est le récepteur NMDA. Ses effets sur le récepteur NMDA sont variables en fonction du mode de consommation observé (Nevo *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2015a). En effet, lors d'une consommation aiguë d'alcool, l'éthanol inhibe la conductance cationique du R-NMDA et devient alors un antagoniste du récepteur tandis que lors d'une consommation chronique, une capacité de tolérance à l'alcool se met en place et l'éthanol augmente la transmission glutamatergique, en potentialisant l'action de la glycine (Farley and Mihic, 2015). Chez le rat, une exposition modérée à l'éthanol au cours d'une période correspondant au troisième trimestre de grossesse, induit des changements de

l'expression en sous-unités du R-NMDA et accroît la proportion de R-NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Brolese *et al.*, 2014). Au cours de ces vingt dernières années, il a été fait de nombreux progrès dans la connaissance des sites d'action et des mécanismes de régulation induits par l'action de l'éthanol sur le R-NMDA (Traynelis *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2015). En particulier, plusieurs études suggèrent que l'éthanol joue un rôle de modulateur allostérique sur l'activité du R-NMDA (Chu *et al.*, 1995 ; Peoples *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2012). Ainsi, plusieurs sites d'interaction au niveau du domaine transmembranaire 1 (TM1) de la sous-unité GluN1 et du domaine TM4 des sous-unités GluN2A et GluN2B ont été identifiés (Honse *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2015a ; Xu *et al.*, 2015).

Hormis le système glutamatergique, il est également bien établi qu'une alcoolisation *in utero* perturbe le système GABAergique en se fixant notamment sur le récepteur GABA<sub>A</sub>. Par exemple, l'éthanol perturbe la maturation du système GABAergique au sein de l'hippocampe, notamment au niveau de la corne d'Ammon 3 (CA3 ; Skorput *et al.*, 2015) entraînant des répercussions sur les processus d'apprentissage et de mémorisation (Zorumski *et al.*, 2014a).

La dérégulation de ces deux systèmes excitateur et inhibiteur va perturber les mécanismes de plasticité synaptique : la LTP, qui correspond à un renforcement durable de la transmission entre deux neurones, et la LTD, complémentaire de la LTP et qui correspond à la diminution durable de la transmission entre deux neurones (Sanes et Lichtman, 1999). En effet, plusieurs études ont démontrées qu'une alcoolisation périnatale entraînait une inhibition à long terme de la LTP (Zorumski *et al.*, 2014b) associée ou non à une dérégulation de la LTD (Coune *et al.*, 2017). Il est à noter que les effets d'une alcoolisation périnatale sur la LTP et LTD vont être différents entre les mâles et les femelles, par exemple, elle entraîne une inhibition de la LTP dans l'hippocampe chez les mâles tandis qu'elle promeut la LTP dans l'hippocampe chez les femelles (Titterness and Christie, 2012).

En plus des cibles neuronales, il a été démontré un effet important d'une alcoolisation prénatale sur les cellules gliales qui serait en partie responsable des atteintes neuronales rencontrées chez les enfants SAF. Par exemple, une exposition prénatale à l'alcool perturbe la maturation et la survie des oligodendrocytes entraînant des déficits de myélinisation et donc impacte la conduction neuronale à long terme. L'alcool peut également entraîner une activation de la microglie associée à une mortalité importante de ces cellules et entraîne également une mort des cellules astrocytaires (Wilhelm and Guizzetti, 2015).

**c. L'éthanol et la mort cellulaire**

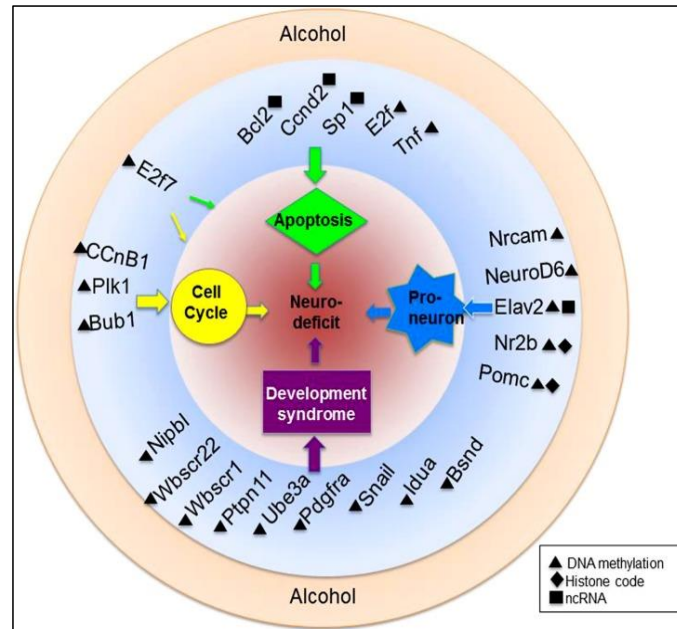
La diminution du volume cérébral observée chez les patients SAF est causée par les effets neurotoxique de l'éthanol qui entraîne notamment une neurodégénérescence apoptotique (Ikonomidou *et al.*, 2000). En effet, l'exposition à l'alcool pendant le neurodéveloppement active la caspase-3 de manière importante (Olney *et al.*, 2002a), entraînant une apoptose dans diverses régions, notamment dans le cortex cérébral et le cervelet (Olney *et al.*, 2002b; Pierce *et al.*, 1999). Cette mort neuronale passe par la voie intrinsèque de l'apoptose, régulée par Bax et Bcl-XL, qui vont perturber l'intégrité mitochondriale et entraîner la libération du cytochrome c et activer la caspase-3 (Young *et al.*, 2003).

L'éthanol peut également entraîner la mort des neurones en bloquant les récepteurs NMDA et en sur-activant les récepteurs GABA<sub>A</sub> (Ikonomidou *et al.*, 2000; Olney *et al.*, 2002b). Ces perturbations vont engendrer une dérégulation des influx calciques, un stress oxydatif, une neuroinflammation et des anomalies dans la synaptogenèse entraînant la mort cellulaire (Feldes *et al.*, 2014). Cette mort cellulaire provoquée par l'alcool est observée notamment dans l'amygdale, qui appartient au système limbique et permet de percevoir les émotions ou encore d'exprimer la peur, et dans le cortex piriforme qui appartient au cortex olfactif primaire et permet de se souvenir des odeurs (Balaszczuk *et al.*, 2011). Les cellules ganglionnaires et les neurones du système visuel sont aussi très sensibles aux effets pro-apoptotiques de l'alcool (Tenkova *et al.*, 2003).

**d. L'éthanol et l'expression génique**

Des études ont démontré qu'un processus épigénétique est associé aux troubles engendrés par une alcoolisation prénatale (Resendiz *et al.*, 2013 ; Subbanna *et al.*, 2015 ; Laufer *et al.*, 2015). Le terme "épigénétique" fait référence à des altérations stables mais potentiellement réversibles de l'information génétique, aboutissant à une modification de l'expression des gènes sans impliquer de changements de la séquence d'ADN sous-jacente. Ces modifications épigénétiques sont la résultante d'altérations de la structure tridimensionnelle de la chromatine qui modifie l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (Berger *et al.*, 2009). La régulation de l'expression génique est contrôlée par des processus de méthylation de l'ADN et de méthylation et/ou acétylation des

histones (Minarovits *et al.*, 2016). Il a été montré qu'une alcoolisation prénatale impactait durablement l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le neurodéveloppement (Figure 43 ; Resendiz *et al.*, 2013).



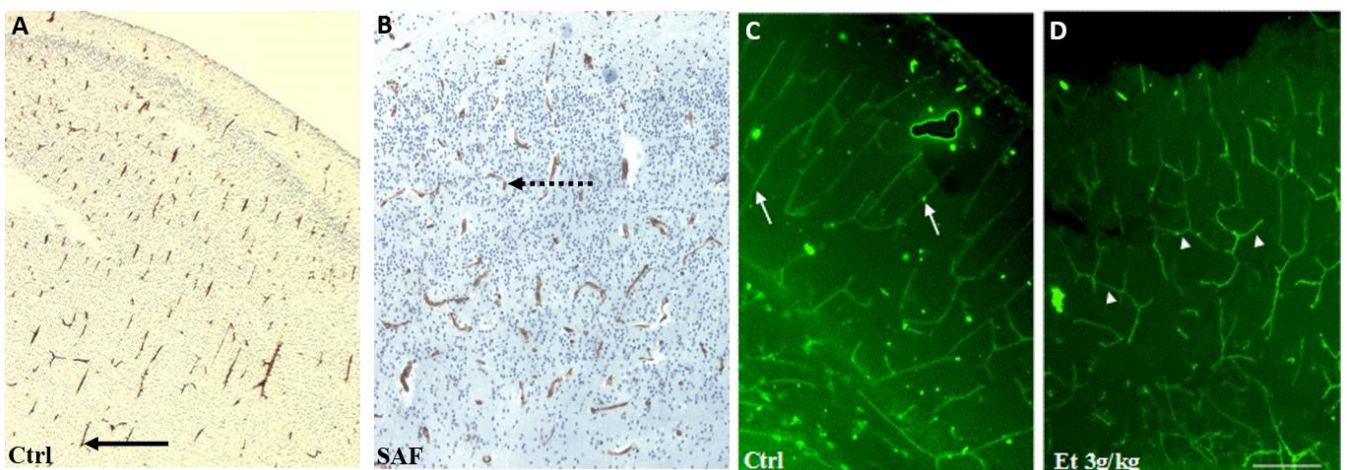
**Figure 43: Modifications épigénétiques de gènes impliqués dans le neurodéveloppement et induites par une alcoolisation *in utero*.**

L'alcool est connu pour modifier l'épigénome et notamment de gènes impliqués dans de grands mécanismes du neurodéveloppement tels que le cycle cellulaire, la survie cellulaire, la différenciation et la migration neuronale. D'après Resendiz *et al.*, 2014.

Par exemple, il a été mis en évidence qu'une alcoolisation prénatale chez la souris induit une surexpression à long terme du récepteur 1 aux cannabinoïdes (CB1R). Cette modification est associée à une acétylation accrue de l'histone H4 (Subbanna *et al.*, 2015). Chez le rat, une alcoolisation affecte également la déméthylation de gènes codant pour la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), un filament intermédiaire retrouvé essentiellement dans les astrocytes, ce qui va retarder son expression au cours du développement cérébral (Vallés *et al.*, 1996). L'éthanol altère également l'expression de gènes responsables de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe entraînant des déficits dans l'apprentissage spatial (Zink *et al.*, 2011). L'éthanol diminue également l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de certaines vitamines comme l'acide rétinoïque (vitamine A), la niacine (vitamine B3), la vitamine D et la vitamine B9 impliquées dans l'inflammation, la différenciation cellulaire et la maturation des crêtes neurales (Feltes *et al.*, 2014).

### 3. Effet d'une alcoolisation prénatale sur la mise en place du réseau vasculaire cérébral

Le développement du réseau vasculaire au sein du SNC se déroule exclusivement par angiogenèse (Greenberg and Jin, 2005). Or, il a été récemment mis en évidence au sein du laboratoire, que ce processus était perturbé par une alcoolisation prénatale. En effet, on observe chez les enfant SAF, une perte de l'organisation radiale des microvaisseaux, une diminution de la densité du réseau, des anomalies dans la plasticité vasculaire ainsi qu'une mort cellulaire importante (Jégou *et al.*, 2012). Ces effets semblent dépendants d'une diminution de la sensibilité des cellules endothéliales au VEGF (Radek *et al.*, 2008). Il a de plus été démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool entraînait un blocage du processus autophagique, phénomène indispensable à la survie cellulaire, dans les microvaisseaux cérébraux (Girault *et al.*, 2017). Ces anomalies du réseau vasculaire cérébral observées chez les enfants SAF seraient en partie responsables des atteintes cérébrales et neurologiques rencontrées chez ces mêmes enfants. Par exemple, il a été démontré qu'une alcoolisation *in utero* perturbait à long terme la distribution de Glut-1 (*glucose transporter-1*), un transporteur du glucose exprimé essentiellement dans les érythrocytes et les cellules endothéliales pouvant entraîner un déficit en apport de glucose pendant le neurodéveloppement (Vorbrot *et al.*, 2001).



**Figure 44: Perturbation de l'orientation radiale des microvaisseaux cérébraux après une alcoolisation périnatale chez l'Homme et chez la Souris.**

A : Organisation radiale des microvaisseaux chez un fœtus humain contrôle âgé de 31 semaines de gestation. B : Perte de cette organisation radiale des microvaisseaux chez un fœtus humain SAF âgé de 31 semaines de gestation. C : Organisation radiale des microvaisseaux chez la souris traitée *in utero* avec du NaCl. D : Perte de cette organisation radiale des microvaisseaux chez la souris traitée *in utero* avec de l'éthanol 3g/kg. D'après Jégou *et al.*, 2012.

#### 4. Effet d'une alcoolisation prénatale sur la migration neuronale

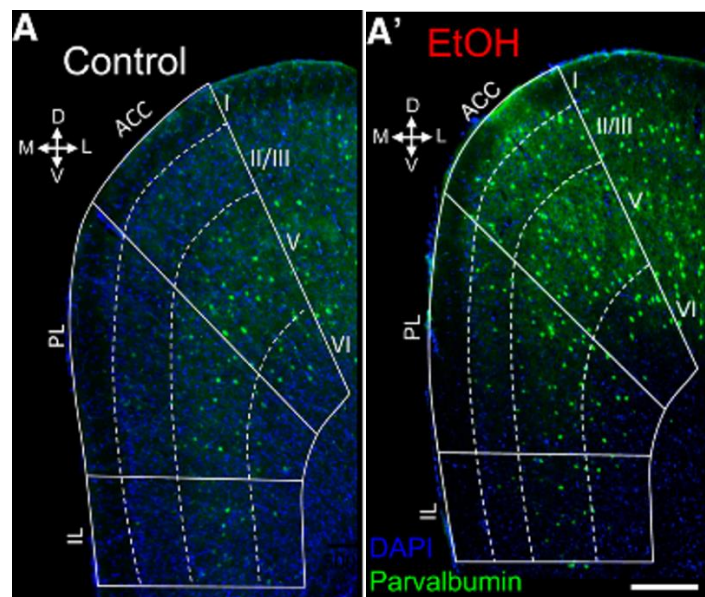
L'un des dommages majeurs engendré par une alcoolisation *in utero* est une réduction du poids de l'encéphale et de l'épaisseur du cortex cérébral ou microcéphalie. De nombreuses études suggèrent qu'une exposition prénatale à l'alcool entraîne une réorganisation massive du cortex cérébral dans lequel on retrouve de nombreux neurones ectopiques suggérant une perturbation dans la migration de ces neurones.

Il a été démontré qu'une alcoolisation *in utero* entraînait une diminution du nombre de fibres de glie radiaire ainsi qu'une différenciation précoce du réseau de glie radiaire en astrocytes, bien avant la fin de l'étape de migration (Gressens *et al.*, 1992). Or il a été également décrit que la glie radiaire sert de support physique à la migration neuronale et notamment à la migration des neurones glutamatergiques (Lui *et al.*, 2011). Il a été démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool entraînait un retard dans la migration des neuroblastes (Aronne *et al.*, 2011). De plus, il est maintenant bien établi qu'au cours du neurodéveloppement, le réseau vasculaire sert de support à la migration des neurones GABAergiques (Won *et al.*, 2013a) et des oligodendrocytes (Tsai *et al.*, 2016). Or, il a été décrit précédemment un effet néfaste d'une alcoolisation *in utero* sur la mise en place du réseau vasculaire cérébral (Jégou *et al.*, 2012). Il semblerait donc qu'en plus d'agir directement sur les récepteurs du glutamate et du GABA, l'alcool peut également agir indirectement sur la migration des cellules les synthétisant.

Une migration neuronale optimale dépend de nombreux facteurs comme : des signaux chémoattractifs (comme BDNF et NT4) ou chémorépulseurs (comme Slit1, EfnA 5 et Séma). Ces signaux passent par les voies Erk MAPK, PI3 Kinase/Akt et la voie de la cycline dépendante de la kinase 5 (Cantley, 2002; Chae *et al.*, 1997; Johnson and Lapadat, 2002; Nikolic *et al.*, 1998; Ohshima *et al.*, 1999; Roymans and Slegers, 2001). Le phénomène de migration est également dépendant de la bonne fonction des molécules d'adhésion intracellulaire pour le guidage du cône de croissance (Beggs *et al.*, 1997), d'une bonne communication avec les molécules de la MEC (Porcionatto, 2006), de l'activation de protéases pour la dégradation de la MEC (Christiansen *et al.*, 2000) et d'un fonctionnement correct des voies de signalisation Wnt et Notch (Christiansen *et al.*, 2000). L'effet délétère de l'alcool sur la migration neuronale est causé par de multiples facteurs, comme par exemple des défauts des voies de signalisation qui régulent les interactions entre les neuroblastes et les cellules de la glie radiaire, l'adhésion

neuronale (Luo and Miller, 1999) ou encore la fonction de myélinisation des cellules gliales (Ozer *et al.*, 2000). Par exemple, une exposition prénatale à l'alcool inhibe la protéine AAH (*aspartyl-asparaginyl- $\alpha$ -hydroxylase*), protéine impliquée dans la mobilité cellulaire (de la Monte *et al.*, 2009). De plus, l'alcool perturbe l'assemblage et le désassemblage du cytosquelette indispensable à la migration cellulaire en jouant sur le réseau d'actine/tubuline. Par exemple, le taux de  $T\alpha 1$ , un isotype de l' $\alpha$ -tubuline dans le cortex cérébral qui va constituer les microtubules neuritiques, est fortement diminué par une exposition prénatale à l'alcool (Miller, 1993).

Plus récemment, il a été mis en évidence qu'une alcoolisation prénatale accélère et promeut de manière anormale la migration des neurones GABAergique au cours du neurodéveloppement (Cuzon *et al.*, 2008). Des études de *patch-clamp* ont démontrées qu'un traitement *in utero* à l'alcool entraîne une stimulation de la transmission GABAergique spontanée et évoquée, dérégulant la balance excitation/inhibition. (Skorput *et al.*, 2015). Cette étude a montré également de nombreux neurones ectopiques chez ces animaux, suggérant des dysfonctions du système GABAergique persistantes à long terme au niveau physique et fonctionnel.



**Figure 45: Une alcoolisation *in utero* promeut la migration des interneurones issus des EGM.**

Dénombrement du nombre de cellules exprimant la parvalbumine dans les différentes zones corticales chez des souris jeunes adultes contrôles (A) et exposés *in utero* à l'éthanol (A'). Les lignes blanches indiquent les couches corticales I, II, III, IV, V et VI, ACC : anterior cingulate cortex, PL : prelimbic cortex, IL : infralimbic cortex. D'après Skorput *et al.*, 2015.

---

## OBJECTIFS DE LA THESE

---





Chez l'Homme, le cortex est principalement constitué de deux populations neuronales : les neurones glutamatergiques qui sont excitateurs et les neurones GABAergiques, inhibiteurs. Alors que la migration radiale des neurones glutamatergiques pendant le neurodéveloppement est bien décrite dans la littérature, les mécanismes impliqués dans la migration des neurones GABAergiques restent mal connus. Il a été démontré que ces neurones migrent tangentiellement depuis les éminences ganglionnaires latérales et médianes à travers le néocortex pour atteindre leur lieu définitif (Wu *et al.*, 2011). Il a été également décrit dans la littérature que les microvaisseaux cérébraux sont indispensables à la migration des interneurons, de par leur rôle de support physique et par la sécrétion de molécules chémoattractives (Won *et al.*, 2013a). En effet, il est connu que l'angiogenèse précède de 24 heures la neurogenèse dans le cortex et que le profil développemental du système nerveux est superposable à celui du système vasculaire (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). La première partie de ma thèse a donc consisté en l'étude de cette migration tangentielle vasculo-dépendante des neurones GABAergiques, des mécanismes et molécules impliqués et de l'effet trophique du glutamate sur cette migration.

Parallèlement, des études menées au laboratoire ont démontré qu'une exposition prénatale du cerveau à l'alcool induisait une altération de l'angiogenèse corticale et une perturbation du système VEGF (Jégou *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que les microvaisseaux corticaux immatures exprimaient des récepteurs NMDA, nécessaires à la différenciation des neurones GABAergiques (Lecointre *et al.*, 2014). L'alcool, en se fixant sur une de ses cibles, le récepteur NMDA, va donc désorganiser le réseau vasculaire et donc potentiellement impacter dans un deuxième temps la migration des neurones GABAergiques. La deuxième partie de ma thèse a donc consisté en l'étude de l'effet d'un traitement prénatal à l'éthanol sur la migration des neurones GABAergiques et leur intégration fonctionnelle dans le néocortex.

Ces travaux de thèse s'appuient sur deux publications dont les objectifs étaient :

1) Caractériser le rôle du système vasculaire dans la migration des neurones GABAergiques ainsi que celui de deux molécules sécrétées par les cellules endothéliales : les métalloprotéinases de la matrice (ou MMPs) et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Cette caractérisation a été faite chez des souriceaux âgés de 2 jours (P2), période de migration

des neurones GABAergiques dans le cortex superficiel. Cette étude a été faite chez différentes lignées de souris, les souris NMRI, les souris Gad67-GFP, qui expriment spécifiquement la GFP dans les neurones GABAergiques issus des éminences ganglionnaires, et chez les souris invalidés pour le gène du t-PA.

2) Evaluer l'impact à différents termes d'un traitement *in utero* ou *ex vivo* sur la survie des neurones GABAergiques, leur migration et leur intégration dans le cortex. Pour cela, différentes expériences ont été réalisées à plusieurs âges correspondant à différentes grandes phases du développement cortical murin. Les études de survie ont été réalisées à E15, période d'intense prolifération des progéniteurs GABAergiques, les études sur la migration ont été réalisées à P2 et enfin les études sur l'intégration ont été réalisées à P15, période où les neurones GABAergiques sont en phase de maturation dans le cortex (Southwell *et al.*, 2012).

# RESULTATS



# Glutamate controls migration of GABA interneurons in the pial migratory route *via* endothelial proteases and NMDA receptors

Cécile Léger, Nicolas Dupré, Caroline Aligny, Magalie Bénard, Alexis Lebon, Vincent Henry, Michelle Hauchecorne, Ludovic Galas, Thierry Frebourg, Peter Carmeliet, Philippe Leroux, Denis Vivien, Stéphane Marret, Bruno J. Gonzalez

**Soumis dans Cerebral Cortex**

Il est décrit dans la littérature un rôle trophique du glutamate au cours du développement cérébral. L'utilisation d'antagonistes du récepteur NMDA, un récepteur au glutamate, tel que la kétamine, en période de maturation du SNC a été démontré comme délétère et, notamment, affecte la mise en place de la population GABAergique corticale (Aligny *et al.*, 2014). Par ailleurs, des travaux du laboratoire ont démontré que les cellules endothéliales de nouveaux-nés expriment le récepteur NMDA et l'utilisation de glutamate *in vitro* augmente l'activité des MMPs endothéliales (Legros *et al.*, 2009).

Au cours du neurodéveloppement, les interneurones GABAergiques corticaux issus des éminences ganglionnaires du télencéphale ventral vont migrer tangentiellement pour coloniser le cortex. Les mécanismes moléculaires ainsi que les acteurs de cette migration tangentielle restent mal connus. Il a été mis en évidence que le réseau vasculaire cérébral joue un rôle important pendant la migration tangentielle en servant de support physique et en guidant chimiquement les interneurones en migration (Won *et al.*, 2013a). De plus, il a été démontré que le profil développemental du réseau microvasculaire endothélial est similaire et concomitant à celui du réseau neuronal et que sa mise en place précède de 24 heures celle des neuroblastes (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005 ; Vasudevan and Bhide, 2008). Ainsi, le réseau vasculaire effectuerait son rôle de support notamment en contribuant au remodelage dynamique de la matrice extracellulaire en sécrétant des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont des enzymes de dégradation activées par le clivage de leur prodomaine par la plasmine, elle-même issue du clivage du plasminogène par le t-PA endothélial.

**Le but de cette étude était de rechercher, dans un modèle de tranches de néocortex de souris à P2, un effet du glutamate sur les activités du t-PA et des MMPs endothéliales, dans le but de démontrer un rôle possible du récepteur NMDA vasculaire dans la migration des interneurons GABAergiques corticaux.**

Dans cet article, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1- Le glutamate régule-t-il la libération de t-PA endothélial et dans quelle région corticale ?
- 2- Le glutamate régule-t-il l'activation des MMP-2 et 9 et par quels mécanismes ?
- 3- Le glutamate a-t-il un effet sur la migration des interneurons GABAergiques ?
- 4- Le blocage de l'activité gélatinase des MMP-2 et 9 au cours du développement cérébral affecte-t-il la mise en place des interneurons GABAergiques au sein du cortex ?
- 5- Le blocage de l'activité t-PA au cours du développement cérébral affecte-t-il la mise en place des interneurons GABAergiques au sein du cortex ?

## Glutamate Controls Vascular Migration of GABA Interneurons in the Pial Migratory Route *via* Endothelial Proteases and NMDA Receptors

Cécile Léger<sup>1</sup>, Nicolas Dupré<sup>1\*</sup>, Caroline Aligny<sup>1\*</sup>, Magalie Bénard<sup>4</sup>, Alexis Lebon<sup>4</sup>, Vincent Henry<sup>1</sup>, Michelle Hauchecorne<sup>1</sup>, Ludovic Galas<sup>4</sup>, Thierry Frebourg<sup>1</sup>, Philippe Leroux<sup>1</sup>, Denis Vivien<sup>2,3</sup>, Stéphane Marret<sup>1</sup>, and Bruno J. Gonzalez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, F 76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

<sup>2</sup>Inserm, Université Caen-Normandie, Inserm UMR-S U1237 “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders” (PhIND), GIP Cyceron, Caen, France.

<sup>3</sup>Caen University Hospital, CHU Caen, Department of Clinical Research, Caen, France

<sup>4</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, Regional Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Rouen, France.

*\*These authors equally contributed to this work.*

**Running title:** Vasculo-dependent migration of GABA interneurons is NMDA-R dependent

Address correspondence to Bruno J. Gonzalez, Inserm U1245 – Team 4 “Genetics and

Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders,” Institute of Research for Innovation in

Biomedicine, Faculty of Medicine, Normandy University, Rouen, France. Phone: +33 235 14

83 39. E-mail: [bruno.gonzales@univ-rouen.fr](mailto:bruno.gonzales@univ-rouen.fr)



## Abstract

During cortex development, fine interactions between pyramidal cells and migrating GABA neurons are required to orchestrate correct positioning of interneurons in the mature cortex, but cellular and molecular mechanisms are not yet clearly understood. Functional and age-specific expression of NMDA receptors by neonate endothelial cells suggests a vascular contribution to the trophic role of glutamate during cortical development. Associating functional and loss-of-function approaches, we found that glutamate stimulated activity of the endothelial proteases MMP-9 and t-PA along the pial migratory route and radial microvessels of the cortical superficial layers. Activation of endothelial MMP-9 was NMDAR-dependent and abrogated in t-PA<sup>-/-</sup> mice. Time-lapse recordings of Gad67-GFP mice revealed that glutamate stimulated tangential and outside-in migration of GABA interneurons along vessels through a NMDAR-dependent mechanism. t-PA invalidation and/or *in vivo* neonatal administration of a MMP inhibitor impaired maturation and positioning of GABA interneurons in the superficial cortical layers. This study indicates that glutamate controls the vasculo-dependent migration of GABA interneurons arriving through the pial migratory route by regulating the activity of endothelial proteases. This role of glutamate requires NMDA receptors and is t-PA-dependent. These data reinforce the debate regarding safety of molecules with NMDA antagonist properties administered to preterm and term neonates.

**Key words:** endothelial cells, GABA interneuron migration, MMP-9, NMDA receptors, t-PA

In the developing cortex, excitatory and inhibitory neurons are generated in different germinative areas, and a fine interaction between pyramidal neurons and migrating GABA interneurons is required to orchestrate correct positioning of neurons in the mature cortex (Lodato *et al.* 2011). Recently, it has been shown that excitatory cells release factors such as neuregulin 3 that are involved in the laminar positioning of GABA interneurons (Bartolini *et al.* 2017). However, cell partners and molecular mechanisms involved in the control of immature GABA migration and laminar positioning are not clearly elucidated. During cortical development, interneurons migrate tangentially while closely interacting with the vasculature following the pial and periventricular migratory routes (Won *et al.* 2013; Luhmann *et al.* 2015; Tan *et al.* 2016). However, age and mechanistic specificities exist between these two migratory routes. Interneuron precursors arising from the medial ganglionic eminence (MGE) and caudal ganglionic eminence (CGE), which are generated during different developmental periods (E9.5-E15.5 and E12.5-E18.5, respectively), will preferentially populate the deep and superficial cortical layers, respectively (Miyoshi and Fishell, 2011). MGE-derived interneurons invade the cortical layers in an inside-out manner, whereas CGE-derived interneurons that target superficial cortical layers enter the cortical plate in an outside-in direction (Miyoshi and Fishell 2011). These specificities strongly suggest that the mechanisms involved in the migration of MGE-derived and CGE-derived interneurons are different.

At the cellular and molecular levels, there is increasing evidence that in the developing cortex, endothelial cells are not phenotypically or regionally similar (Tan *et al.* 2016; Porte *et al.* 2017). For example, in the mouse, the transcriptomic and proteomic expression profiles of cortical microvessels revealed age-dependent specificities that will drastically change during the first 2 weeks postnatally because of strong remodeling of the extracellular matrix, cell adhesion, and junction protein expression (Porte *et al.* 2017). At a given developmental stage, endothelial cells of the periventricular vascular network have phenotypic identities distinct from those of

the pial migratory route, suggesting distinct contributions to the developing brain (Vasudevan and Bhide 2008; Tan *et al.* 2016; Tsai *et al.* 2017). Interestingly, it has been shown that there are region-specific and age-specific changes in the expression of both NMDA receptor subunits and excitatory amino acid transporters by neonatal endothelial cells (Legros *et al.* 2009; Lecointre *et al.* 2014). Furthermore, *in vitro* studies showed that NMDA is able to promote secretion of two endothelial proteases, *i.e.*, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue-plasminogen activator (t-PA) (Legros *et al.* 2009). Interestingly, these two proteases are involved in the control of cell migration in physiological and/or pathological conditions (Siconolfi *et al.* 2001; Barkho *et al.* 2008). This preferential expression pattern of NMDA receptors by endothelial cells during perinatal life coincides with late migration of GABA interneurons arising from the pial migratory route (Inada *et al.* 2011). Similarly, in humans, late migration of GABAergic neurons with at least 20% of interneurons still migrating in the developing cortex at term have been shown (Xu *et al.* 2011). These data suggest that endothelial cells constitute a cell partner contributing to the effects of excitatory neurons during the control of interneuron migration arising from the pial migratory routes. Consistent with this hypothesis, recent studies showed that exposure of mouse neonate cortices to molecules with NMDA antagonist properties such as ketamine, alcohol, or MK801 resulted in autophagy induction in endothelial cells, followed by massive apoptotic death of migrating tangential GABA interneurons present in the superficial cortical layers (Desfeux *et al.* 2010; Aligny *et al.* 2014; Roux *et al.* 2015; Girault *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017).

At the clinical level, the brains of preterm and term human neonates can be frequently exposed to molecules with NMDA antagonist properties during early life for the purposes of neuroprotection or anesthesia (Bhutta 2007; Volpe 2009; Salmeen *et al.* 2014). In addition, the innocuousness of NMDA antagonists in the developing brain is not consensual and is suspected as a functional link between NMDAR hypofunction during early life and impaired positioning

of GABA interneurons that could lead to adult diseases (Hardingham and Do 2016; Kaushal *et al.* 2016; Nakazawa *et al.* 2017). In the present study, we reported that glutamate, by interacting with NMDA receptors, contributes to the endothelial-dependent fate of GABA interneurons that migrate along the pial migratory route to radially enter the cortex in an outside-in direction. These data strongly support that endothelial cells constitute a cell partner for pyramidal cells during the control of migrating interneurons arising from the pial migratory route.

## Materials and Methods

### Wild-type and transgenic mice

NMRI (Naval Medical Research Institute) mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). FVB-Tg(GadGFP)45704Swn transgenic mice (#003718) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). In this mouse strain, GABAergic interneurons arising from the GEs express enhanced green fluorescent protein under the control of the mouse Gad1 gene promoter (Oliva *et al.* 2000). t-PA knockout (t-PA<sup>-/-</sup>) mice in the C57Bl6/129 background (t-PA<sup>-/-</sup> in a ratio of 87.5:12.5%) were developed and provided by the Center for Molecular and Vascular Biology at the University of Leuven in Belgium (Carmeliet *et al.* 1994). Double transgenic Gad67GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice were developed by Inserm U1245. Animals were kept in a temperature-controlled room (21 ± 1°C) with a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM) and free access to food and water. Animal care and manipulation complied with recommendations issued by the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC, license no. 21CAE035) and were supervised by an authorized investigator (B.J.G., authorization no. 7687 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

## Chemicals

Glutamate, Coomassie blue, Hoechst 33258, isolectin-B4-TRITC/FITC, phosphate-buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and Triton X-100 were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). MK801 was obtained from Tocris (R&D, Lille, France). GM6001 was provided by Millipore SAS (Molsheim, France). SDS-PAGE Tris-glycine gel (containing 0.1% gelatin as a gelatinase substrate), renaturing buffer, developing buffer, DQ-gelatin-FITC, and DQ-casein-FITC were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). The gelatinase inhibitor SB-3CT was from Biomol (Lonza Sales Ltd, Basel, Switzerland). Paraformaldehyde (PFA) was obtained from Labonord (Templemars, France). Characteristics of the primary antibodies against CD31, collagen IV, doublecortin (DCX), GABA, GFAP, gluN1, MMP9, somatostatin (SST), and  $\beta$ -actin are summarized in Supplementary Table 1. The secondary antibodies Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A-21206), Alexa Fluor 488 goat anti-rat (A-11006), and Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A-11058) used for immunohistochemistry were from Invitrogen.

## Preparation and treatment of cerebral slices from neonate mice

Cortex brain slices were obtained from mice on postnatal day 2 (P2). Previous studies demonstrated that this stage presented developmental and lesional characteristics similar to those described for human neonates (Mesplès *et al.* 2005; Marret *et al.* 1995). Mice were euthanized by decapitation and brains were rapidly dissected to isolate the hemispheres. The neocortex was immediately placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) the following: NaCl, 125; KCl, 3; CaCl<sub>2</sub>, 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 26; and D-glucose, 10 (pH 7.4). Transverse slices (250  $\mu$ m) were cut at 4°C using a vibratome (VT1000S; Leica, Reuil-Malmaison, France), transferred into 24-well Costar plates (Cambridge, MA) containing aCSF, and incubated during a recovery period of 30 min at 37°C in a humidified

incubator with a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Then, slices were washed with fresh aCSF and treated for 3 h at 37°C with glutamate (25, 50, 100 μM), MK801 (20 μM), SB-3CT (10 μM), and PAI-1 (5 nM) alone or in combination.

### **Immunohistochemistry**

Brain slices previously fixed with 4% PFA in PBS were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100) (Supplementary Table 1). Then, the slices were rinsed three times with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing an adequate secondary antibody. Cell nuclei were visualized by incubating slices for 5 min with 1 μg/ml Hoechst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope. Control for nonspecific binding of the secondary antibody was performed by omitting the primary antibodies.

### **SDS-PAGE gelatin and casein zymography**

Gelatin zymograms revealed matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 activities. Casein zymograms were used to reveal t-PA activity in P2 cortical extracts. Cultured brain slices were incubated for 3 h in different treatments. Cortices microdissected from slices were washed in fresh aCSF and homogenized in 50 μL of lysis buffer (50 μM HEPES; pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM glycerophosphate; 100 mM sodium fluoride; 1% Triton X-100). After centrifugation of the homogenates (20,000g × 15 min), the supernatants were collected and protein concentrations were determined by the Bradford assay. Proteins were loaded as 15 and 30 μg/well for gelatin and casein zymography, respectively, and separated by electrophoresis. For gelatin zymography, the gels were incubated in renaturing buffer (Triton X-100, 12.5 ml; H<sub>2</sub>O, 487.5 ml) for 30 min at room temperature and in developing buffer

(glycine, 3.75 mM; EDTA, 1.45 mM) for another 30 min at room temperature. After transfer in fresh developing buffer, gels were incubated for 5 days at 37°C, stained in 0.5% Coomassie blue for 1 hour, and rinsed for 1 hour in distilled water. Light stripes on a blue background indicated gelatin digestion of the gel by gelatinases. For casein zymography, gels were incubated in renaturing buffer at 4°C overnight and rinsed in water for 30 min at 4°C. Then, gels were transferred in developing buffer for 3 h and 30 min at 37°C and stained with 0.5% Coomassie blue for 1 h. Finally, they were de-stained in 40% methanol and 10% acetic acid for 30 min at room temperature. Light stripes on a blue background indicated casein digestion of the gel by t-PA. Digital images of the gels were acquired and digestion stripes were quantified using Explora Nova Mercator Software (La Rochelle, France).

### ***In situ* gelatinase and casein zymography**

*In situ* MMP and casein zymography were performed for 250- $\mu$ m brain slices from wild-type (WT) or t-PA<sup>-/-</sup> mice previously stained by isolectin-B4-TRITC to visualize the pial migratory route. Slices were incubated for 30 min in aCSF containing isolectin-B4-TRITC (1/50) at 37°C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. After two washes for 10 min with aCSF, slices were incubated for 3 h with the quenched gelatinase substrate DQ-gelatin-FITC (1/50) or DQ-casein-FITC (1/125) in the presence of glutamate (100  $\mu$ M), MK801 (20  $\mu$ M), and/or SB-3CT (10  $\mu$ M) alone or in combination. Quantification of FITC fluorescence, indicative of cell-specific digestion of the substrate, was performed by time-lapse recordings using a fluorescent videomicroscope system (DMI 6000B; Leica, Reuil-Malmaison, France) coupled to the Explora Nova Mercator Software. Microphotographs were acquired at 488 nm and 540 nm every 15 min for 3 h to follow the kinetics of DQ-gelatin-FITC and DQ-casein-FITC degradations and to visualize cortical microvessels from the pial migratory route, respectively. A background level was defined in a negative region of the slice.

### **Western blot**

Microdissected cortices from WT and transgenic mice were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer. After centrifugation, supernatants were collected and protein concentrations were determined by the Bradford assay. The pellet was denatured at 100°C for 5 min in 50 µL of Tris/HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue, and 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), and then it was electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel. After separation, the proteins were electrically transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). The membrane was incubated with blocking solution (5% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h and incubated overnight with primary antibodies against somatostatin and actin (Supplementary Table 1). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence ECL Plus immunoblotting detection system (ECL; Bio-Rad Laboratories, Marne la Coquette, France). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories), and  $\beta$ -actin was used as a loading control. Commercial markers (Seeblock pre-stained standard; Invitrogen) were used as molecular weight standards.

### **Quantification of somatostatin-positive GABAergic interneurons in t-PA<sup>-/-</sup> mice**

For measurements of somatostatin-immunoreactive cell density in P15 t-PA<sup>-/-</sup> mice, images were acquired and saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope. Images were subsequently opened in Mercator software and regions of interest (ROIs) were drawn. Then, a counting frame was defined within the ROI and a threshold was set to differentiate FITC-positive cells from the background. Using a segmentation process, a computer calculated the



number and cumulated area of objects within the ROI, thus yielding cell number and cell density, respectively.

### **Quantification of primary neurite density in double transgenic Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice**

Quantification of primary neurite densities of GABA interneurons populating the cortical superficial layers was performed at P15 on both Gad67-GFP/t-PA<sup>WT</sup> and Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice. A reference focal plane corresponding to the Gad67-GFP cell body was first defined with a confocal laser scanning microscope (Noran Instruments, Middleton, WI) using INTERVISION software (Noran Instruments). Then, Z-series of four images were acquired with a 2- $\mu$ m step on both sides of the reference plane and saved in TIFF format. Next, acquired images were deconvolved and compiled for three-dimensional (3D) reconstruction using AutoQuant X<sub>3</sub> deconvolution software (Media Cybernetics, Rockville, MD) to quantify the number of primary neurites per cell body.

### **Quantification of spine morphology and spine density in double transgenic Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice**

A fine network of secondary and tertiary dendrites was acquired from Gad67-GFP/t-PA<sup>WT</sup> and double transgenic Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning imaging system (Leica Microsystems AG). Z-stack series of images were later deconvolved using AutoQuant X<sub>3</sub> software and loaded into IMARIS imaging software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D reconstruction. The Filament Tracer function was used to assign and classify spines, thus yielding spine density and spine categories (stubby, filipodia-shaped, or mushroom-shaped). For a given slice, two ROIs were defined, two to three dendrites were quantified per ROI, and the total number of quantified neuritis was fixed at 40 per group.

### **Quantification of tangential and radial migration**

Brain slices from P2 neonates were previously stained by isolectin-B4-TRITC to localize the vascular network of the pial migratory route. To label cortical cells, slices were incubated for 5 min in 10  $\mu$ M Cell Tracker Green (CTG; Invitrogen) added to the culture medium. The chemically defined culture medium was composed of DMEM/Ham's F12 with 1% N2 supplement and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich). Slices were subsequently washed with culture medium, placed onto a polyester membrane insert from a six-well plate, and incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After labeling, slices were transferred to an incubator attached to the stand of a confocal microscope (TCS LSI; Leica Microsystems). The temperature of the chamber was kept at  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  using a temperature controller (Tempcontrol 37-2 digital 2-channel; PeCon, Ulm, Germany), and the slices were supplied with a constant gas flow (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; CO<sub>2</sub> controller; PeCon). To visualize cell migration in the tissue slices, the preparation was illuminated with a 488-nm wavelength light by means of a laser diode through a confocal laser scanning microscope equipped with a  $\times 2$  dry objective (working distance, 39 mm; diameter, 58 mm; Leica Microsystems). Fluorescence emission was detected from 500 to 530 nm. To finely resolve the movement of interneurons, images were acquired with an additional optical zoom factor of 1.5 to 2.0. Images were collected every 30 min for up to 6 h. Cell tracking was performed using Metamorph (Roper Scientific, Evry, France) and ImageJ (NIH) upgraded with the "manual tracking" plug-in allowing access to the total distance covered and maximal speed parameters.

### **Quantification of locomotor activity of t-PA<sup>-/-</sup> mice**

Locomotor activity of P15 WT and t-PA<sup>-/-</sup> mice was assessed using a Versamax 4.2 apparatus (Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA) and the behavioral analysis platform of the Institute of Research and Innovation in Biomedicine (IRIB; Normandy University). Animals

were isolated for 30 min in individual cages before being placed in individual 20-cm × 20-cm × 30-cm compartments to limit anxiety in a dark, sound-attenuated, and temperature-regulated ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) room. The test takes advantage of a rodent's natural tendency to explore a new environment. Video-tracking was performed during a 30-min period and analyzed using ANY-maze software (Stoelting, Wood Dale, IL, USA).

### ***In vivo* exposure of Gad67-GFP mice to GM6001**

The MMP inhibitor GM6001 (10 mg/kg) was administered daily by subcutaneous injection to pregnant Gad67-GFP mice from birth to P7. The dose of GM6001 administered was based on previous comparative studies that showed that a 10-mg/kg GM6001 subcutaneous injection significantly decreased cortical MMP activity (Sifringer *et al.* 2007). The control group was treated with 1% DMSO in PBS. No modification of body weight of pregnant mice was seen in the control and GM6001-treated groups; however, the body weight of pups from the GM6001 group was significantly reduced. After birth, pups were raised until P15 to quantify the density of cortical Gad67-GFP interneurons.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the biostatistic Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Tests used for each experiment, the number of independent experiments, and p values are summarized in Supplementary Table 2.

## Results

### **Immunohistochemical characterization of the pial migratory route in neonate mice**

Several research groups reported that a significant number of GABA interneurons are still migrating in the superficial cortical layers at birth and during the early postnatal life of both mouse (Inada *et al.* 2011) and human (Xu *et al.* 2011) neonates. However, most previous studies referring to the pial migratory route were performed during embryonic stages (Marín 2013; Won *et al.* 2013). Based on these statements, we performed immunohistochemical characterization of the pial migratory route in P2 neonate mice (Figure 1). CD31 immunolabeling revealed a thin network of microvessels lining the developing superficial cortical layers (Figure 1A, B; arrowheads) and radial perforating microvessels (Figure 1A, B; arrows). Co-labeling experiments using CD31 and GFAP antibodies revealed a single row of astrocytes with radial-oriented short processes entering the superficial cortical layers (Figure 1C-E; arrows). Doublecortin (DCX) immunohistochemistry also showed a single row of tangentially oriented cells lining the inner face of the pial migratory route (Figure 1F-H; arrows). A similar distribution pattern was observed using a GABA antibody (Figure 1I-K; arrows). These data indicate that GABA interneurons are still migrating along the pial migratory route in mouse neonates.

### **NMDA receptors impact MMP-9 activity in the pial migratory route**

Recent studies showed transcriptomic and proteomic specificities of cortical microvessels in neonate mice (Porte *et al.* 2017). In particular, the expression of NMDA receptors is exacerbated in neonatal endothelial cells when compared to adults (Legros *et al.* 2009). However, the distribution pattern of NMDA receptors in the developing cortex and the possible interactions with the pial migratory route are poorly understood. GluN1 immunohistochemistry experiments performed on P2 cortices showed intense immunolabeling in radial glia with

numerous terminal processes ending at the level of the pial migratory route (Figure 2A; arrows). Interestingly, GluN1 immunoreactivity was detected in endothelial cells from the pial migratory route as well as in radial microvessels (Figure 2B-D; arrowheads). Although MMP-9 is well known to contribute to the pathophysiology of several diseases involving dysfunction of the neurovascular unit during stroke (Zhao *et al.* 2006) or dysregulation of cell migration with cancers (Joseph *et al.* 2015), the contribution of MMP-9 to the control of vasculo-dependent neuronal migration has never been investigated. Immunohistochemistry showed strong MMP-9 labeling at the level of the pial migratory route (Figure 2E-G). Interestingly, MMP-9 immunolabeling was preferentially localized in the inner face of the pial migratory route (Figure 2E-G; arrows). Gel zymography experiments performed with P2 cultured cortical extracts showed that glutamate induces a concentration-dependent increase of MMP-9 activity ( $p < 0.05$ ; Figure 2H). The glutamate-induced increase of MMP-9 activity was abolished by the NMDA receptor antagonist MK801 (20  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.01$ ; Figure 2I) and by MMP-9 inhibitor SB-3CT (10  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 2J).

Because gel zymography performed on P2 cortical extracts provided data regarding MMP-9 activity but gave no information regarding histological localization, we also performed real-time *in situ* zymography for cultured P2 cortical slices using DQ-gelatin-FITC (Figure 3A-G). Co-labeling of cortical microvessels with isolectin-B4-TRITC revealed that gelatinase activity was predominantly vascular and detected in the pial migratory route (Figure 3A-C). Time-lapse acquisition also showed gelatinase activity in radial microvessels restricted to the superficial cortical layers (Figure 3F, G; arrows). Quantification of the gelatinase activity showed that glutamate (100  $\mu\text{M}$ ) induces significant ( $p < 0.0001$ ) and time-dependent increases of DQ-gelatin-FITC proteolysis (Figure 3H). This effect was abrogated by MK801 (20  $\mu\text{M}$ ; Figure 3H) as well as by SB-3CT (an MMP inhibitor) (10  $\mu\text{M}$ ; Figure 3I). These data indicate that in

P2 cortical slices, glutamate is able to stimulate MMP-9 activity in vessels from the pial migratory route through an NMDA receptor-dependent mechanism.

### **Glutamate controls t-PA activity in the pial migratory route**

Previous studies have reported that t-PA is able to promote MMP-9 activation in a pathological context (Chaturvedi and Kaczmarek 2014). However, other research groups mentioned delayed neuronal migration in t-PA<sup>-/-</sup> mice (Seeds *et al.* 1999). Considering this literature, it was tempting to speculate the contribution of t-PA to the control of MMP-9 activity in the pial migratory route. Immunohistochemistry experiments revealed intense t-PA labeling in both the pial migratory route and the radial microvessels present in the superficial cortical layers (Figure 4A; arrows). In addition, gel zymography experiments indicated that 6-h incubation of cultured P2 cortical slices with glutamate (100  $\mu$ M) induces a significant increase in t-PA activity ( $p < 0.01$ ; Figure 4B). This effect was blocked by MK801 (20  $\mu$ M;  $p < 0.05$ ; Figure 4B) and PAI-1 (a t-PA inhibitor) (5 nM;  $p < 0.05$ ; Figure 4C). Real-time *in situ* zymography performed on P2 cortical slices using DQ-casein-FITC showed that protease activity was localized in the pial migratory route (arrowheads) as well as in radial microvessels (Figure 4D-F; arrows), and its quantification indicated that glutamate (100  $\mu$ M) induced a time-dependent and significant increase of the DQ-casein-FITC proteolysis ( $p < 0.0001$ ; Figure 4G). This effect of glutamate was abrogated by MK801 ( $p < 0.0001$ ; Figure 4G). In addition, gel and *in situ* zymography revealed that treatment of P2 cortical slices from t-PA<sup>-/-</sup> mice with glutamate (100  $\mu$ M) failed to stimulate MMP-9 activity (Figure 4H, I). These data indicate that glutamate is able to stimulate t-PA activity in the pial migratory route through an NMDA receptor-dependent mechanism and that glutamate-induced MMP-9 activation is t-PA-dependent.

## **Glutamate controls vascular-dependent migration of GABA interneurons in the pial migratory route**

Because t-PA and MMP-9 are involved in the remodeling of the extracellular matrix following ischemic stroke (Turner and Sharp 2016), and because the present study revealed NMDA-dependent effects of glutamate on the endothelial activity of both proteases, we hypothesized that glutamate could regulate the vascular-dependent migration of GABA interneurons in the pial migratory route. In P2 cortical slices, CD31 immunolabeling was used to visualize both tangential vessels from the pial migratory route and the perforating radial vessels (Figure 5A). Hoechst labeling clearly showed numerous nuclei preferentially associated with the radial vessels originating from the pial migratory route (Figure 5A; arrows). To further characterize cell types associated with cortical microvessels, we performed immunohistochemistry experiments targeting GFP in P2 cortical slices from Gad67-GFP mice. At this stage, GFP is poorly expressed and the GFP signal should be enhanced by immunohistochemistry (Figure 5B-D). GFP and CD31 fluorescent signals (Figure 5D) and 3D Imaris reconstruction (Figure 5E) showed a preferential interaction between Gad67-GFP-positive cells and cortical microvessels. These data indicate that in P2 cortices, the cells closely interacting with the pial migratory route are late migrating GABA interneurons.

To investigate the effects of glutamate on the migration of GABAergic cells in the pial migratory route, we performed time-lapse microscopy using a confocal laser scanning microscope (Figure 6). Time-lapse acquisitions revealed numerous cells migrating in an outside-in direction in close interaction with microvessels (Figure 6A-D; arrows). Some cells close to microvessels covered up to 40  $\mu\text{m}$  of distances during the first 6 h of recording (Figure 6E). The addition of glutamate (50  $\mu\text{M}$ ) to the culture medium significantly increased the maximal speed of both tangential and radial migrating cells ( $p < 0.01$ ; Figure 6F). In contrast, incubation of the slices with MK801 (20  $\mu\text{M}$ ) reduced cell migration ( $p < 0.001$ ; Figure 6F).

These data indicate that glutamate stimulates the vascular-dependent migration of GABA interneurons in the pial migratory route through an NMDA receptor-dependent mechanism.

### **t-PA invalidation and *in vivo* MMP inhibition impair the integration of GABA interneurons migrating via the pial migratory route**

To research developmental consequences of the impairment of t-PA and MMP activities during perinatal life, we performed histological and behavioral studies of different mouse strains such as t-PA<sup>-/-</sup>, Gad67-GFP, and double transgenic Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice (Figure 7). Because a major phase of elimination/maturation of the GABAergic neurons has been described during the first 2 weeks postnatally (Southwell *et al.* 2012) with gender-dependent specificities (McCarthy *et al.* 2002), we conducted the experiments at P15 for males, females, and the whole population of pups. Western blot experiments revealed a decrease of SST levels in cortical extracts from P15 t-PA<sup>-/-</sup> mice ( $p < 0.05$  for males; Figure 7A). These results were associated with a significant decrease in both the density of SST neurons populating superficial cortical layers II-IV ( $p < 0.01$  for females;  $p < 0.001$  for females and males; Figure 7B) and the number of primary neurites per cell ( $p < 0.05$  for females and males; Figure 7C). Quantification of the locomotor activity showed a marked increase in the total distance covered by male and female t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15 ( $p < 0.05$  for males;  $p < 0.05$  for females;  $p < 0.01$  for females and males; Figure 7D). To investigate the effects of t-PA invalidation on spine densities and morphologies, we developed Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice. Because the morphometric indicators previously quantified were systematically more altered in males (Figure 7A-D), we focused on this gender. Confocal microscopy acquisition in superficial layers II-IV of P15 Gad67-GFP/t-PA<sup>wt</sup> revealed numerous GABAergic neurons with dendritic spines (Figure 7E). The 3D image analysis with the Imaris *Filament tracer* application allowed discrimination of three subtypes of spines (mushrooms, filipodia, and stubbies; Figure 7F). Quantification showed no significant



differences in spine density between Gad67-GFP/t-PA<sup>WT</sup> and Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice (Figure 7G). In contrast, the distribution of spine subtypes was significantly impaired (Figure 7H). In particular, the proportion of filipodia was increased in P15 Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice ( $p < 0.05$ ; Figure 7H-J). Because previous reports indicated that *in vivo* administration of the MMP inhibitor GM6001 was able to impact vascular remodeling in mouse neonates (Pham *et al.* 2012), we investigated the effects of a daily injection of GM6001 (10 mg/kg) during the first postnatal week in Gad67-GFP mice (Figure 7K). As observed in t-PA<sup>-/-</sup> mice, data revealed a marked reduction in the density of Gad67-GFP neurons in the superficial cortical layers of GM6001-exposed animals at P15 ( $p < 0.01$  for males; not significant for females;  $p < 0.001$  for females and males; Figure 7K). These data indicate that impairment of vascular protease activities (t-PA and MMP) affects the positioning and maturation of GABAergic interneurons migrating through the pial migratory route and induces increased motor activity.

## Discussion

Data suggest that exposure of the developing brain to NMDA antagonists during perinatal life is deleterious for the survival of immature GABA interneurons (Aligny *et al.* 2014; Roux *et al.* 2015). In humans, as well as in rodents, numerous GABAergic interneurons are still migrating along the pial migratory route during late gestation and even after birth (Inada *et al.* 2011; Xu *et al.* 2011). This process has been shown to be vasculo-dependent (Won *et al.* 2013). Moreover, *in vitro* studies revealed age-specific expression of functional NMDA receptors by endothelial cells during perinatal life (Legros *et al.* 2009; Henry *et al.* 2013). During neurogenesis, cortical interneurons derived from the caudal ganglionic eminences, which consistently contribute approximately 75% of their population to the superficial layers, are generated after excitatory pyramidal neurons (Miyoshi and Fishell 2011). Based on these statements, we hypothesized

that glutamate would contribute to the control of the vasculo-dependent migration of immature GABA interneurons by modulating the endothelial activity of the pial migratory route.

Using WT and transgenic (Gad67-GFP and Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup>) mice, the present study indicated the following: endothelial cells from the pial migratory route expressed MMP-9, t-PA, and the NMDA receptor subunit GluN1; glutamate is a potent stimulator of endothelial MMP-9 and t-PA activities in the pial migratory route and its effects are NMDA-receptor dependent; glutamate stimulates the migration of immature GABA interneurons along the pial migratory route and radial cortical vessels in the outside-in direction through NMDA-dependent and t-PA-dependent mechanisms; and t-PA invalidation and/or *in vivo* neonatal administration of an MMP inhibitor impaired the positioning of GABA interneurons in the superficial cortical layers and the locomotor activity of mice.

### **Glutamate regulates endothelial MMP-9 and t-PA activities in microvessels from the pial migratory route**

Although the vasculo-dependent migration of GABAergic interneurons along the pial migratory route has been clearly shown (Won *et al.* 2013), cellular interactions and molecular mechanisms are poorly understood. It has been shown that deletion of VEGF from endothelial cells resulted in impaired angiogenesis and marked alteration of the GABAergic cortical lamination reinforcing the contribution of microvessels to GABAergic neuronal migration (Li *et al.* 2013). However, previous studies indicated that migration of GABAergic neurons requires a close relationship with excitatory pyramidal cells (Ciceri *et al.* 2013). For example, recent data revealed that neuregulin 3 expressed by pyramidal excitatory neurons acts as a chemoattractive factor for GABAergic interneurons (Bartolini *et al.* 2017). Nevertheless, very few data are available regarding functional interactions between these three cell types during migration of GABA interneurons along the pial migratory route. Using transcriptomic,

proteomic, and pharmacological approaches, we previously showed that endothelial cells from neonate mice present specific phenotypic characteristics and, in particular, they express high levels of functional NMDA receptors (Legros *et al.* 2009; Henry *et al.* 2013; Porte *et al.* 2017). In line with this notion, glutamate has been shown in pathological conditions such as stroke to exacerbate the release and recycling activity of the endothelial proteases MMP-9 (Michaluk and Kaczmarek 2007) and t-PA (Cassé *et al.* 2012; Gaberel *et al.* 2013), suggesting that excitatory neurons would also be able to regulate endothelial activity in physiological and developmental contexts. Consistent with this hypothesis, the present study showed that both MMP-9 and t-PA immunoreactivities were detected in microvessels from the pial migratory route, whereas gel and *in situ* zymography revealed that glutamate induced a dose-dependent and MK801-dependent increase of endothelial MMP-9 and t-PA activities. In addition, the effects of glutamate on MMP-9 activity in the pial migratory route were abrogated in t-PA<sup>-/-</sup> mice. These data indicate that glutamate stimulates MMP-9 activity in the pial migratory route through NMDA receptor-dependent and t-PA-dependent mechanisms.

### **Glutamate stimulates the vasculo-dependent migration of GABA interneurons from the pial migratory route *via* an NMDA-dependent mechanism**

In the mature brain, neurotransmitters are mainly released in synapses for communication between neurons (Ruediger and Bolz 2007). However, during nervous system development, a trophic role of neurotransmitters implies neuronal release before their axons establish contacts with their target cells. Even if there is increasing evidence of such physiological roles, these extrasynaptic trophic roles are less understood (Ruediger and Bolz 2007). Because MMP-9 is involved in proteolysis of the extracellular matrix (Zechariah *et al.* 2010), our data prompted us to investigate glutamate effects on the vasculo-dependent migration of GABA interneurons. In addition, because interneurons from Gad67-GFP mice preferentially populate superficial

cortical layers I-IV, we used this strain to track GABA interneurons (Oliva *et al.* 2000). Using GFP immunohistochemistry performed from birth to P2, our data clearly showed close interaction of these cells with cortical microvessels. Video-tracking experiments indicated that glutamate was able to stimulate both tangential and radial migration in the outside-in direction, whereas MK801 induced an opposite effect. Consistent with these data, recent studies showed that neuronal projections from pyramidal cells are able to release factors such as neuregulin 3 that are involved in the control of GABA interneuron positioning (Bartolini *et al.* 2017; Lodato *et al.* 2011), and several lines of evidence indicated that glutamate released by excitatory cells in the developing brain can act as a guidance cue for migrating cells (Nguyen *et al.* 2001). However, it is unclear how glutamate controls the rate of migrating precursors before synapses are being formed (Ruediger and Bolz 2007). The present study indicates that glutamate impacts endothelial protease activity *via* NMDA receptors and stimulates the vasculo-dependent migration of GABA interneurons. These results also open new avenues of research and raise new questioning regarding whether the positioning of GABA interneurons is impaired when the protease activity of endothelial cells is altered.

### **t-PA invalidation and *in vivo* MMP-9 inhibition alter GABA interneuron positioning in the cortical superficial layers**

During embryonic life, MGE-derived and CGE-derived interneurons migrate tangentially and then switch their mode of migration from tangential to radial as they invade the cortical plate (Miyoshi and Fishell 2011). Interneurons from the MGE and CGE are not generated during the same periods (E9.5-E15.5 and E12.5-E18.5, respectively) (Miyoshi and Fishell 2011). Although MGE-derived interneurons exhibit inside-out layering and will preferentially populate deep cortical layers V and VI, those derived from the CGE consistently contribute (~75% of their population) to the superficial layers and migrate in an outside-in direction

(Miyoshi and Fishell 2011). From P1 and up to the first 2 weeks postnatally, important sorting of GABA interneurons occurs, leading to the final layer-specific positioning (Miyoshi and Fishell 2011; Southwell *et al.* 2012). For these developmental reasons, we quantified several morphometric indicators (cell density, neurite number, spine morphologies) at P15. The results showed that in the superficial cortical layers, the density of GABA (SST subtype) and/or Gad67-GFP interneurons was markedly reduced in two different models, transgenic (t-PA<sup>-/-</sup> mice; Carmeliet *et al.* 1994) and pharmacologic (*in vivo* administration of the MMP inhibitor GM6001; Pham *et al.* 2012). Moreover, this effect was associated with impaired distribution of dendritic spines with an increased proportion of filipodia. Consistent with this morphometric analysis that supports impaired positioning/maturation of GABA interneurons, the locomotor activity of P15 t-PA<sup>-/-</sup> mice was markedly exacerbated. Considering that glutamate increases t-PA and MMP-9 activities in vessels from the pial migratory route in an NMDA-dependent manner, that glutamate increases the outside-in migration of GABA interneurons along vessels in an NMDA-dependent manner, and that invalidation of t-PA or *in vivo* administration of an MMP inhibitor impaired the positioning of GABA interneurons in the superficial cortical layers, our present results and analysis of the literature support that glutamate regulates the vasculo-dependent migration of interneurons originating from the CGE and populating the superficial cortical layers by controlling endothelial protease activities during the perinatal period.

The present study clarified the molecular mechanisms involved in the control of the vasculo-dependent migration of GABA interneurons arising from the pial migratory route. It demonstrated that glutamate regulates the activity of endothelial cells and, in particular, the activity of two endothelial proteases, *i.e.*, MMP-9 and t-PA, *via* an NMDA-dependent mechanism. It revealed that glutamate promotes the vascular GABAergic neuronal migration

through NMDA receptor-dependent and t-PA-dependent mechanisms. These mechanisms reinforced the contribution of pyramidal cells to the control of late migrating GABA interneurons in the pial migratory route by positioning functional interactions with endothelial cells (Figure 8). Clinically, they reinforced the debate regarding the safety of molecules with NMDA antagonist properties such as anesthetics that are frequently administered to preterm and/or term neonates in neonatology departments.

## Supplementary Material

Supplementary data are available at *Cerebral Cortex* online.

## Funding

This work was supported by the Normandy University (ERI28, UMR1245), the *Institut National de la Santé et Recherche Médicale* (INSERM; ERI28, UMR1245), the Conseil Régional de Normandie, the LARC-Neuroscience network, and the Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN). CL is a recipient of a fellowship from the Région Normandie.

## Notes

CA, CL, ND, MH, and VH performed experiments and provided technical support. AL, LG, and MB contributed to the acquisition and analysis of videomicroscopy data. DV, PC, and TF contributed resources. BJG, PL, and SM, conceived the project. BJG managed the study.

## References

- Aligny C, Roux C, Dourmap N, Ramdani Y, Do-Rego JC, Jégou S, Leroux P, Leroux-Nicollet I, Marret S, Gonzalez BJ. 2014. Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. *Cell Death Dis.* 5:e1311
- Barkho BZ, Munoz AE, Li X, Li L, Cunningham LA, Zhao X. 2008. Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells.* 26:3139-49.
- Bartolini G, Sánchez-Alcañiz JA, Osório C, Valiente M, García-Frigola C, Marín O. 2017. Neuregulin 3 mediates cortical plate invasion and laminar allocation of GABAergic interneurons. *Cell Rep.* 18:1157-1170.
- Bhutta AT. 2007. Ketamine: a controversial drug for neonates. *Semin Perinatol.* 31:303-8.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 368:419-24.
- Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F. 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci.* 32:5186-99.
- Chaturvedi M, Kaczmarek L. 2014. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol.* 2014 49:563-73.
- Ciceri G, Dehorter N, Sols I, Huang ZJ, Maravall M, Marín O. 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat Neurosci.* 16:1199-210.
- Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudénbach V, Gonzalez BJ. 2010. Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. *Cereb Cortex.* 20:1092-108.

- Gaberel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen KU, Touze E, Agin V, Emery E, Ali C, Vivien D. 2013. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology*. 67:267-71.
- Girault V, Gilard V, Marguet F, Lesueur C, Hauchecorne M, Ramdani Y, Laquerrière A, Marret S, Jégou S, Gonzalez BJ, Brasse-Lagnel C, Bekri S. 2017. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis*. 8:e2610.
- Hardingham GE, Do KQ. 2016. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 17:125-34.
- Henry VJ, Lecointre M, Laudénbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, Berezowski V, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ, Leroux P. 2013. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiol Dis*. 50:201-8.
- Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J. 2011. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PLoS One*. 6:e27048.
- Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. 2001. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 49:735-41.
- Joseph JV, van Roosmalen IA, Busschers E, Tomar T, Conroy S, Eggens-Meijer E, Peñaranda Fajardo N, Pore MM, Balasubramanyan V, Wagemakers M, Copray S, den Dunnen WF, Kruyt FA. 2015. Serum-induced differentiation of glioblastoma neurospheres leads to enhanced migration/invasion capacity that is associated with increased MMP9. *PLoS One*. 10:e0145393.
- Kaushal S, Tamer Z, Opoku F, Forcelli PA. 2016. Anticonvulsant drug-induced cell death in the developing white matter of the rodent brain. *Epilepsia*. 57:727-34.



- Lecointre M, Hauchecorne M, Chaussivert A, Marret S, Leroux P, Jegou S, Leroux-Nicollet I, Gonzalez BJ, Henry VJ. 2014. The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34:764-7.
- Legros H, Launay S, Roussel BD, Marcou-Labarre A, Calbo S, Catteau J, Leroux P, Boyer O, Ali C, Marret S, Vivien D, Laudenbach V. 2009. Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:1146-58.
- Li S, Haigh K, Haigh JJ, Vasudevan A. 2013. Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. *J Neurosci.* 33:14809-15.
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P. 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron.* 69:763-79.
- Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. 2015. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci.* 9:4.
- Marín O. 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci.* 38:2019-29.
- McCarthy MM, Auger AP, Perrot-Sinal TS. 2002. Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends Neurosci.* 25:307-12.
- Mesplès B, Plaisant F, Fontaine RH, Gressens P. 2005. Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity. *Acta Paediatr.* 94:185-90.
- Michaluk P, Kaczmarek L. 2007. Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ.* 14:1255-8.
- Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. 2001. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 7:249-53.

- Miyoshi G, Fishell G. 2011. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex*. 21:845-52.
- Nakazawa K, Jeevakumar V, Nakao K. 2017. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. *NPJ Schizophr*. 2017 3:7.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res*. 305:187-202.
- Oliva AA Jr, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW. 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci*. 20:3354-68.
- Pham LD, Hayakawa K, Seo JH, Nguyen MN, Som AT, Lee BJ, Guo S, Kim KW, Lo EH, Arai K. 2012. Crosstalk between oligodendrocytes and cerebral endothelium contributes to vascular remodeling after white matter injury. *Glia*. 60:875-81.
- Porte B, Hardouin J, Zerdoumi Y, Derambure C, Hauchecorne M, Dupre N, Obry A, Lequerre T, Bekri S, Gonzalez B, Flaman JM, Marret S, Cosette P, Leroux P. 2017. Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 37:495-513.
- Roux C, Aligny C, Lesueur C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y, Genty D, Driouich A, Laquerrière A, Marret S, Brasse-Lagnel C, Gonzalez BJ, Bekri S. 2015. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. *Exp Neurol*. 267:177-93.
- Ruediger T, Bolz J. 2007. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv Exp Med Biol*. 621:104-15.

- Salmeen KE, Jelin AC, Thiet MP. 2014. Perinatal neuroprotection. *F1000Prime Rep.* 6:6.
- Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. 1999. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:14118-23.
- Siconolfi LB, Seeds NW. 2001. Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. *J Neurosci.* 21:4348-55.
- Sifringer M, Stefovská V, Zentner I, Hansen B, Stepulak A, Knaute C, Marzahn J, Ikonomidou C. 2007. The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 25:526-35.
- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A. 2012. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature.* 491:109-13.
- Tan X, Liu WA, Zhang XJ, Shi W, Ren SQ, Li Z, Brown KN, Shi SH. 2016. Vascular Influence on Ventral Telencephalic Progenitors and Neocortical Interneuron Production. *Dev Cell.* 36:624-38.
- 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.
- Turner RJ, Sharp FR. 2016. Implications of MMP9 for blood brain barrier disruption and hemorrhagic transformation following ischemic stroke. *Front Cell Neurosci.* 4;10:56.
- Vasudevan A, Bhide PG. 2008. Angiogenesis in the embryonic CNS: a new twist on an old tale. *Cell Adh Migr.* 2:167-9.
- Volpe JJ. 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* 8:110-24.

- Wang Q, Shen FY, Zou R, Zheng JJ, Yu X, Wang YW. 2017. Ketamine-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristic of physiological apoptosis and can be regulated by neuronal activity. *Mol Brain*. 10:24.
- Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhali A, Szabó G, Vasudevan A. 2013. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun*. 4:2149.
- Xu G, Broadbelt KG, Haynes RL, Folkerth RD, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC. 2011. Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. *J Neuropathol Exp Neurol*. 70:841-58.
- Zechariah A, ElAli A, Hermann DM. 2010. Combination of tissue-plasminogen activator with erythropoietin induces blood-brain barrier permeability, extracellular matrix disaggregation, and DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 41:1008-12.
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. 2006. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med*. 12:441-5.

## Figure Legends

**Figure 1.** Immunohistochemical characterization of the pial migratory route (PMR) in mouse neonates. Low-magnification (A) and high-magnification (B) photographs visualizing cortical microvessels in transversal cortical slices labeled with CD31 antibodies at P2. Arrow heads indicate a thin network of vessels at the level of the pial migratory route. Arrows indicate cortical radial microvessels. **C-E:** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels from the pial migratory route (arrow heads; C) and GFAP immunoreactive astrocytes (arrows; D). Overlay of both signals (E) indicates that astrocytes are lining the inner face of the pial migratory route. **F-H:** Double immunolabeling experiments showing microvessels from the pial migratory route (arrow head; F) and doublecortin-positive cells (arrows; G). Overlay (H) indicates that doublecortin immunoreactive cells are lining the inner face of the pial migratory route. **I-K:** Double immunolabeling experiments showing microvessels from the pial migratory route (arrow head; I) and GABA immunoreactive cells (arrows; J). The overlay (K) indicates that GABAergic cells are lining the inner face of the pial migratory route.

**Figure 2.** GluN1 immunoreactivity in microvessels from the pial migratory route (PMR) and glutamate-dependent regulation of MMP-9 activity. **A-D:** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels and GluN1 immunoreactivity in the neocortex of P2 mice. Immunohistochemistry reveals numerous GluN1-positive cortical radial fibers (A; arrows) and GluN1-positive endothelial cells in the pial migratory route (B-D; arrow heads). **E-G:** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels (E) and MMP-9 immunoreactivity (F) in the pial migratory route. The overlay (G) indicates that MMP-9 immunoreactivity mainly co-localizes with endothelial cells present in the inner part of the migratory route (arrows). **H:** Quantification by gel zymography of the effects of 6-h exposure

of P2 cortical slices to graded concentrations (25-100  $\mu\text{M}$ ) of glutamate on MMP-9 activity. **I:** Quantification by gel zymography of the effect of the NMDA antagonist MK801 (20  $\mu\text{M}$ ) on the glutamate-induced increase of MMP-9 activity. **J:** Quantification by gel zymography of the effect of the MMP-9 inhibitor SB-3CT (10  $\mu\text{M}$ ) on the glutamate-induced increase of MMP-9 activity. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs control and ### $p < 0.01$ ; #### $p < 0.001$ ; ##### $p < 0.0001$  vs glutamate using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 3.** *In situ* characterization of the effects of glutamate on MMP activity in the pial migratory route (PMR). **A-C:** *In situ* zymography performed for P2 cortical slices visualizing the MMP gelatinase activity in control conditions after 60-min incubation with the quenched fluorogenic substrate DQ-gelatin-FITC. Note that the gelatinase activity (A) overlaps with microvessels present in the pial migratory route labeled with isolectin-TRITC (B, C). **D-G:** Microphotographs acquired by videomicroscopy showing a time-dependent increase of the gelatinase activity in cultured slices incubated with glutamate (100  $\mu\text{M}$ ) from 0 to 90 min. Note that in addition to the PMR (arrow heads), a fluorescent signal also progressively appeared in radial cortical vessels (arrows; F, G). **H:** Time-lapse quantification by videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting from DQ-gelatin-FITC cleavage after treatment of brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu\text{M}$ ), and the NMDA antagonist MK801 (20  $\mu\text{M}$ ) alone or co-incubated (H). **I:** Quantification by videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting from DQ-gelatin-FITC cleavage after treatment of brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu\text{M}$ ) and the MMP2/9 inhibitor SB-3CT (10  $\mu\text{M}$ ) alone or co-incubated. §§§§ $p < 0.0001$  significant time and treatment interactions using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs control at the same time point and ##### $p < 0.0001$  vs glutamate at the same time point.

**Figure 4.** Visualization and quantification of the effects of glutamate on t-PA activity in the pial migratory route (PMR). **A:** Triple labeling visualizing t-PA, collagen IV, and microvessels in the pial migratory route. Note the presence of strong vascular t-PA immunoreactivity in both tangential and radial cortical vessels (arrows). **B:** Quantification by gel zymography of the effects of aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M), and the NMDA antagonist MK801 (20  $\mu$ M) alone or co-incubated on t-PA activity after 3-h treatment of P2 cortical slices. **C:** Quantification by gel zymography of the effects of aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M), and the t-PA inhibitor PAI-1 (5  $\mu$ g/ml) alone or co-incubated on t-PA activity after 3-h treatment of P2 cortical slices. **D-F:** Microphotographs acquired by *in situ* zymography and visualizing cortical microvessels (D) and the fluorescent signal resulting from the cleavage of the quenched casein-FITC substrate (E) in cultured P2 cortical slices. Overlay reveals a strong protease activity associated with the pial migratory route (arrowheads) and radial cortical microvessels (arrows, F). **G:** Quantification by time-lapse videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting in casein-FITC cleavage after incubation of P2 brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M), and MK801 (20  $\mu$ M) alone or co-incubated. **H:** Quantification by gel zymography of the effects of glutamate (100  $\mu$ M) on MMP-9 activity in P2 cortical extracts from wild-type (WT) and t-PA<sup>-/-</sup> mice. **I:** Quantification by *in situ* zymography of the effects of glutamate (100  $\mu$ M) on the cleavage of the quenched casein-FITC substrate in WT and t-PA<sup>-/-</sup> mice at the level of the pial migratory route in P2 cortical slices. §§§§p<0.0001 significant time and treatment interactions using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001 vs control and #p<0.05; ##p<0.01; ####p<0.0001 vs glutamate.

**Figure 5.** Visualization of microvessel-associated migrating Gad67-GFP interneurons. **A:** Low-magnification microphotograph visualizing vessels immunolabeled with CD31 antibodies in the pial migratory route (PMR; arrowheads) and perforating radial microvessels (arrows)

arising from the PMR in P2 cortical slices. Note that Hoechst labeling reveals preferential positioning of nuclei along microvessels. **B-D**: GFP (B) and CD31 (C) immunolabeling performed in P2 cortical slices from Gad67-GFP mice. The overlay (D) indicates that cells preferentially interacting with microvessels are GABAergic interneurons. **E**: 3D Imaris modeling showing the preferential association of migrating GABA interneurons along microvessels.

**Figure 6.** Effects of glutamate and MK801 on the vessel-associated migration of GABA interneurons. **A-D**: Microphotographs acquired from the same cultured slice at different times of video-tracking (0 min, A; 60 min, B; and 150 min, C). Arrows indicate cells migrating along microvessels in the outside-in direction. Arrowheads indicate immobile large cells. **D**: Stacked graph visualizing the position of several cells during 6-h video-tracking. **E**: Quantification of the distance covered by four cells identified in D. **F**: Effects of glutamate (50  $\mu$ M) and MK801 (20  $\mu$ M) on the maximal speed of cells migrating tangentially and radially along microvessels from the PMR. \*\* $p < 0.01$  vs control and ### $p < 0.001$  vs glutamate using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 7.** Effects of t-PA invalidation and *in vivo* MMP inhibition on cortical positioning and spine maturation of GABA interneurons migrating through the PMR. **A**: Western blot quantification of somatostatin (sst) expression in the somatosensory cortex of wild-type and t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15. **B**: Quantification of the density of sst interneurons in the somatosensory cortex of wild-type and t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15. **C**: Quantification of the density of primary neurites of sst interneurons in the superficial layers of the somatosensory cortex of wild-type and t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15. **D**: Locomotor activity of wild-type and t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15. **E**: Visualization of dendritic spines in the superficial layers of the somatosensory cortex of Gad67-GFP mice at



P15. **F:** Dendritic spines analysis with the *Filament tracer* tool after 3D Imaris reconstitution of Gad67-GFP neurites. Three spine subtypes were analyzed: filipodia (Fili), mushrooms (Mush), and stubbies (Stub). **G-J:** Quantification (G, H) and visualization (I, J) of the density and the distribution of dendritic spines in Gad67-GFP neurites from wild-type (Gad67-GFP/t-PA<sup>WT</sup>) and Gad67-GFP/t-PA<sup>-/-</sup> mice at P15. **K:** Effect of *in vivo* treatment with the MMP inhibitor GM6001 (10 mg/kg) on the density of Gad67-GFP interneurons in the superficial layers of the somatosensory cortex at P15. \*p < 0.05; p < 0.01; \*p < 0.001 vs control using the unpaired t test.

**Figure 8.** Synthetic scheme illustrating the main findings of the study. Endothelial cells from the pial migratory route (PMR) and radial microvessels express the GluN1 subunit of NMDAR. Exposure of cultured slices to glutamate induced an increase in MMP-9 and t-PA activities at the endothelial level through an NMDAR-dependent mechanism. Glutamate stimulates the tangential and radial outside-in migration of GABAergic interneuron precursors specifically along microvessels through an NMDA-dependent mechanism. Invalidation of t-PA prevents the stimulatory effects of glutamate on MMP-9 activation, impairs the positioning and the spine morphology of GABA interneurons in the superficial layers, and exacerbates the locomotor activity of young mice. During cortical development, pyramidal excitatory neurons release chemoattractive factors such as neuregulin for GABA interneurons (Bartolini *et al.* 2017); therefore, these findings support that glutamate contributes to the control of GABA interneuron migration by regulating the protease activity of endothelial cells from the pial migratory route through an NMDAR-dependent mechanism.

**Supplementary Table 1** Origin and characteristics of the primary antibodies used for the immunohistochemical and Western blot studies.

Antibodies	Trade reference	Purified species	Supplier	Dilution	Solution of incubation
PECAM/CD31	IHC: cat 550274	Rat	BD-Pharmigen	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GFAP	IHC: Ab7260	Rabbit	Sigma	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Doublecortin DCX	IHC: Ab18723	Rabbit	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GABA	IHC: A2052	Rabbit	Sigma-Aldrich	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GluN1	IHC: SC1467	Goat	Santa Cruz	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
MMP-9	IHC: PAB12714	Rabbit	Abnova	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Collagen IV ColIV	IHC: Ab86042	Mouse	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Somatostatin SST	IHC: SC13099 WB: SC13099	Rabbit	Santa Cruz	1/400 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% in TBST)
t-PA	IHC	Rabbit	Generous gift from R. Lijnen	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
$\beta$ -Actin	WB: A5441	Mouse	Sigma- Aldrich	1/5000	Milk (5% in TBST)

**Supplementary Table 2** Statistical analysis

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001
Gel zymography Dose effect of glutamate on MMP9 activity (Fig. 2H)	One way ANOVA Dunnett post-test	n=3	ANOVA F 4.733 p=0.0350* Dunnett's p=0.0162*
Gel zymography Effect of MK801 on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 2I)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 15.23 p=0.0011** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0114* Glut vs MK801 p=0.0012## Glut vs Glut + MK p=0.0028##
Gel zymography Effect of SB3CT on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 2J)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 30.72 p<0.0001**** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0014** Glut vs SB3CT p<0.0001#### Glut vs Glut + SB3CT p=0.0009###
<i>In situ</i> zymography Effect of glutamate and MK801 on MMPs activity on P2 slices (Fig. 3H)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5	ANOVA Interaction F 2.793 p<0.0001**** Treatment F 48.68 p<0.0001**** Time F 137.8 p<0.0001****  Tukey's For t=180 min Ctrl vs GLUT p<0.0001**** Glut vs Glut+MK801 p<0.0001####
<i>In situ</i> zymography Effect of glutamate and SB3CT on MMPs activity on P2 slices (Fig. 3I)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5	ANOVA Interaction F 1.538 p=0.0339* Treatment F 30.25 p<0.0001**** Time F 57.17 p<0.0001****  Tukey's For t=180 min Ctrl vs Glut p<0.0001**** Glut vs Glut+SB3CT p<0.0001####
Gel zymography Effect of MK801 on glutamate-induced tPA activity (Fig. 4B)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 7.638 p=0.0014** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0079** Glut vs MK801 p=0.0011## Glut vs Glut + MK801 p=0.0495#

<p>Gel zymography Effect of PAI-1 on glutamate-induced tPA activity (Fig. 4C)</p>	<p>One way ANOVA Tukey post- test</p>	<p>n=3</p>	<p>ANOVA F 5.610 p=0.0059** Tukey's Glut vs PAI p=0.0043### Glut vs Glut + MK p=0.0365#</p>
<p><i>In situ</i> zymography Effect of glutamate on DQcasein activity (Fig. 4G)</p>	<p>Two way ANOVA Tukey post- test</p>	<p>n=5</p>	<p>ANOVA Interaction F 3.329 p&lt;0.0001**** Treatment F 33.70 p&lt;0.0001**** Time F 286.2 p&lt;0.0001****  Tukey's For t=180 min Ctrl vs Glut P&lt;0.0001**** Glut vs Glu + MK801 P&lt;0.0001#####</p>
<p>Gel zymography Effect of glutamate on MMP9 activity in tPA-/- mice (Fig. 4H)</p>	<p>Unpaired t test</p>	<p>n=3</p>	<p>WT p=0.0014** tPA-/- p=0.2720, ns</p>
<p><i>In situ</i> zymography Effect of glutamate on MMPs activity in tPA-/- (Fig. 4I)</p>	<p>Two way ANOVA Tukey post- test</p>	<p>n=4</p>	<p>ANOVA Interaction F 0.6479 p=0.9364, ns Treatment F 3.818 p&lt;0.0001**** Time F 32.09 p&lt;0.0001****  Tukey's For t=180 min Ctrl WT vs Glut WT p=0.0008*** Ctrl tPA-/- vs Glu tPA-/- p=0.9898, ns</p>
<p>Time lapse videomicroscopy Migration speed (Fig. 6F)</p>	<p>One way ANOVA Tukey post- test</p>	<p>n=3 at least 20 cells</p>	<p>Radial ANOVA F 33.5 p=0.0006*** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0052** Glut vs MK p=0.0005###  Tangential ANOVA F 12.2 p=0.0077** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.024* Glut vs MK p=0.008##</p>

Western blot somatostatin in tPA <sup>-/-</sup> (Fig. 7A)	Unpaired t test	Males n=3 Females n=3 Males + females n=6	WT vs tPA <sup>-/-</sup> males p=0.0219* WT vs tPA <sup>-/-</sup> females p=0.055, ns WT vs tPA <sup>-/-</sup> females + males p=0.0753, ns
Density of somatostatin cells in tPA <sup>-/-</sup> mice (Fig. 7B)	Unpaired t test	Males n=8 Females n=8 Males + females n=16	WT vs tPA <sup>-/-</sup> males p=0.0755, ns WT vs tPA <sup>-/-</sup> females p=0.0021** WT vs tPA <sup>-/-</sup> females + males p=0.001***
Primary dendrite density in tPA <sup>-/-</sup> mice (Fig. 7C)	Unpaired t test	Males n=3 Females n=3 Males + females n=6	WT vs tPA <sup>-/-</sup> males p=0.2302, ns WT vs tPA <sup>-/-</sup> females p=0.2573, ns WT vs tPA <sup>-/-</sup> females + males p=0.0402*
Quantification of motor activity in tPA <sup>-/-</sup> mice (Fig. 7D)	Unpaired t test	Males n=8 Females n=8 Males + females n=16	WT vs tPA <sup>-/-</sup> males p=0.0211* WT vs tPA <sup>-/-</sup> females p=0.027* WT vs tPA <sup>-/-</sup> females + males p=0.0032**
Spine density in Gad67GFP/tPA <sup>-/-</sup> mice (Fig. 7G)	Unpaired t test	n =20 fibers from 3 animals	WT vs tPA <sup>-/-</sup> males p=0.4106, ns
Spine distribution in Gad67GFP/tPA <sup>-/-</sup> (Fig. 7H)	Chi square test	n =20 fibers analyzed from 3 animals	Chi-square, df 6.329, 2 p=0.422*
Effect of GM6001 on the density of Gad67GFP cells (Fig. 7K)	Unpaired t test	Males n=4 Females n=4 Males + females n=8	Ctrl vs GM6001 males p=0.004** Ctrl vs GM6001 females p=0.1420, ns Ctrl vs males +females p=0.0006***

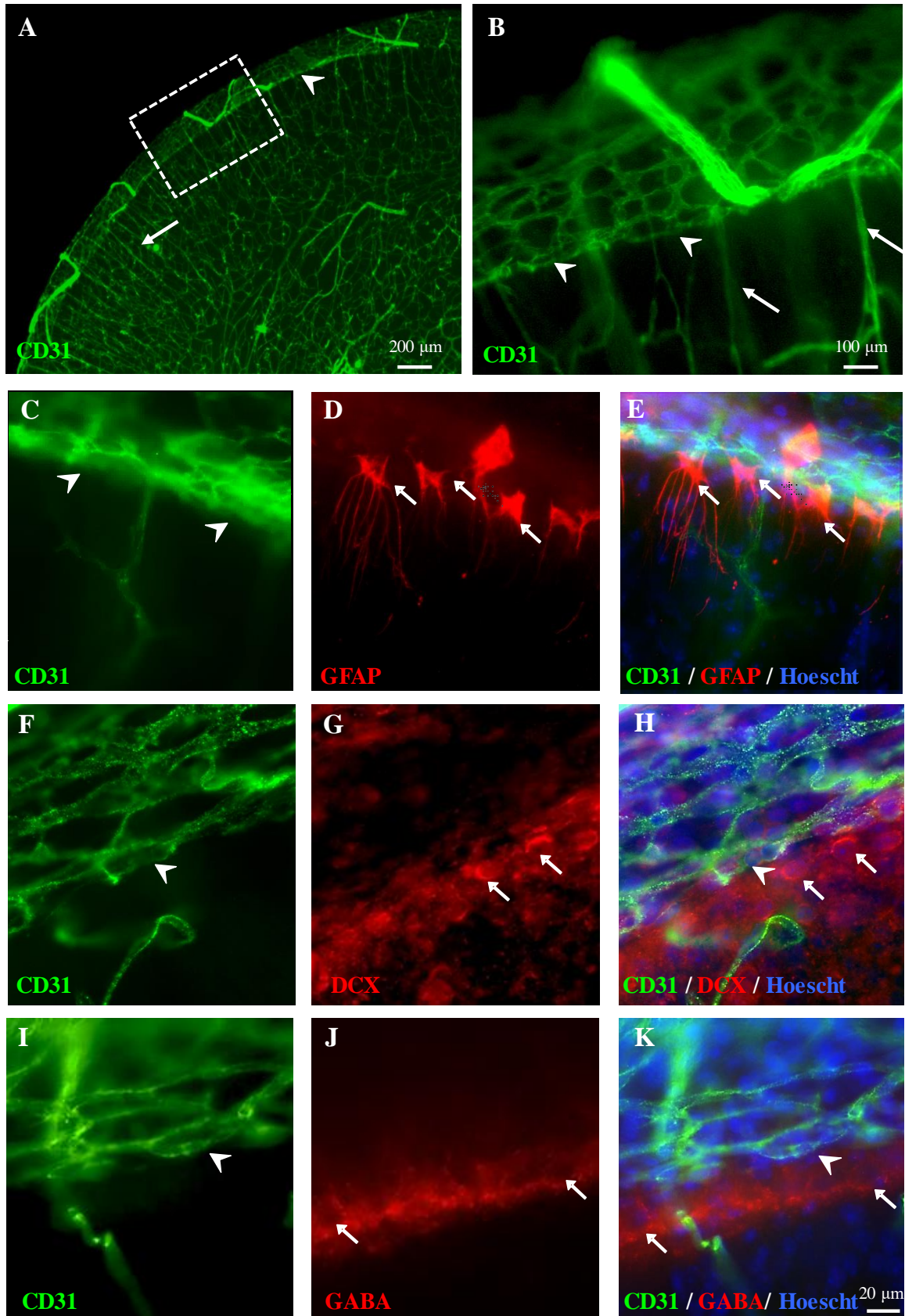


Figure 1

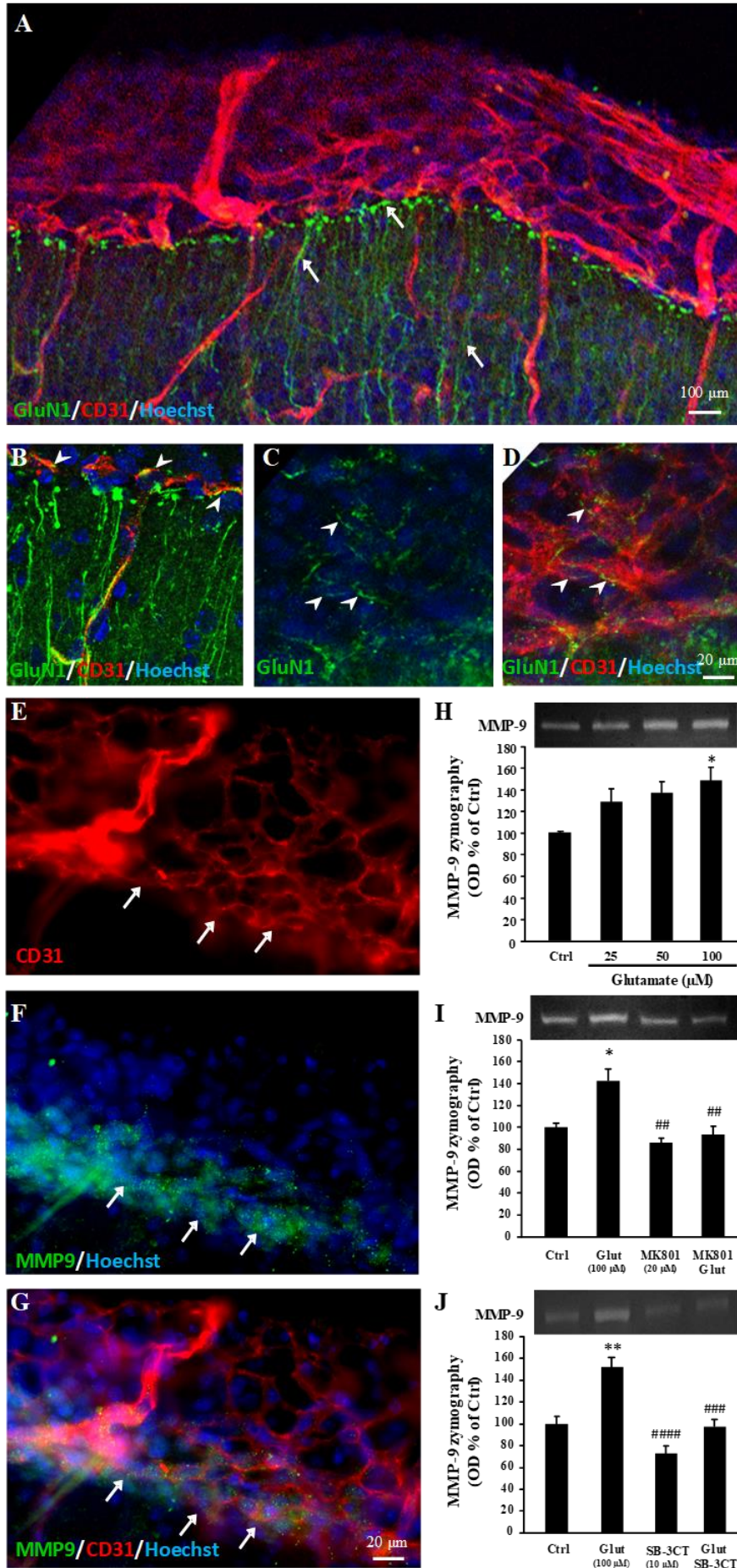


Figure 2

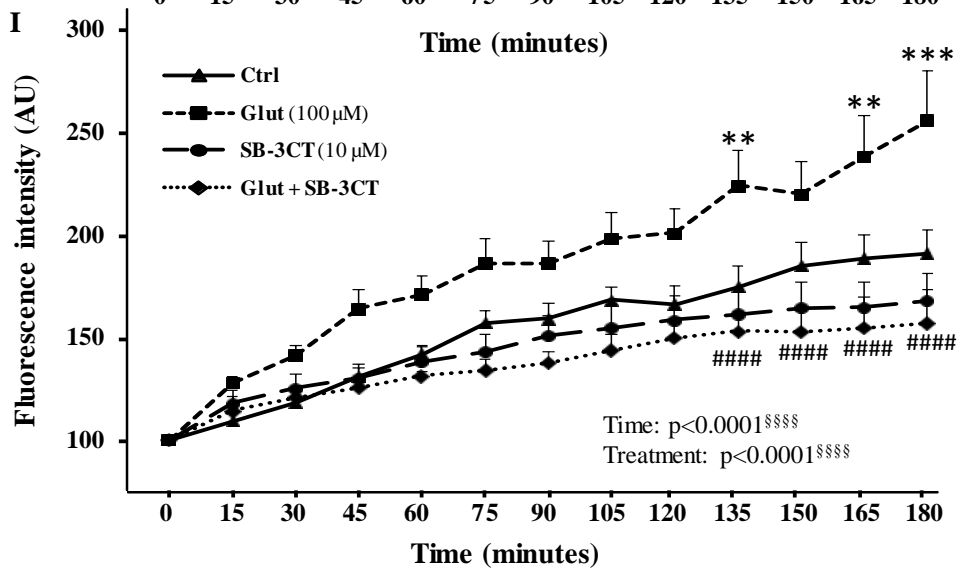
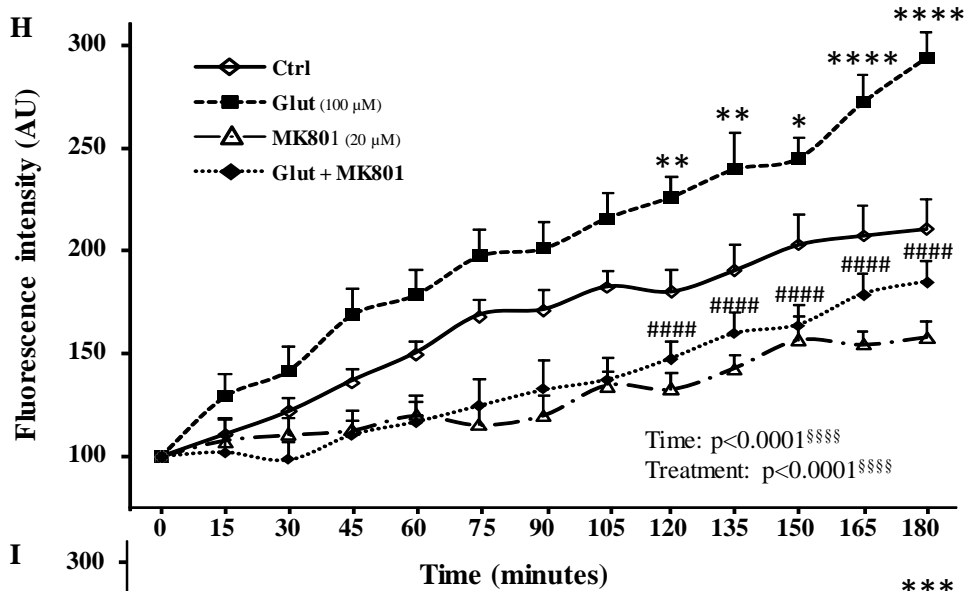
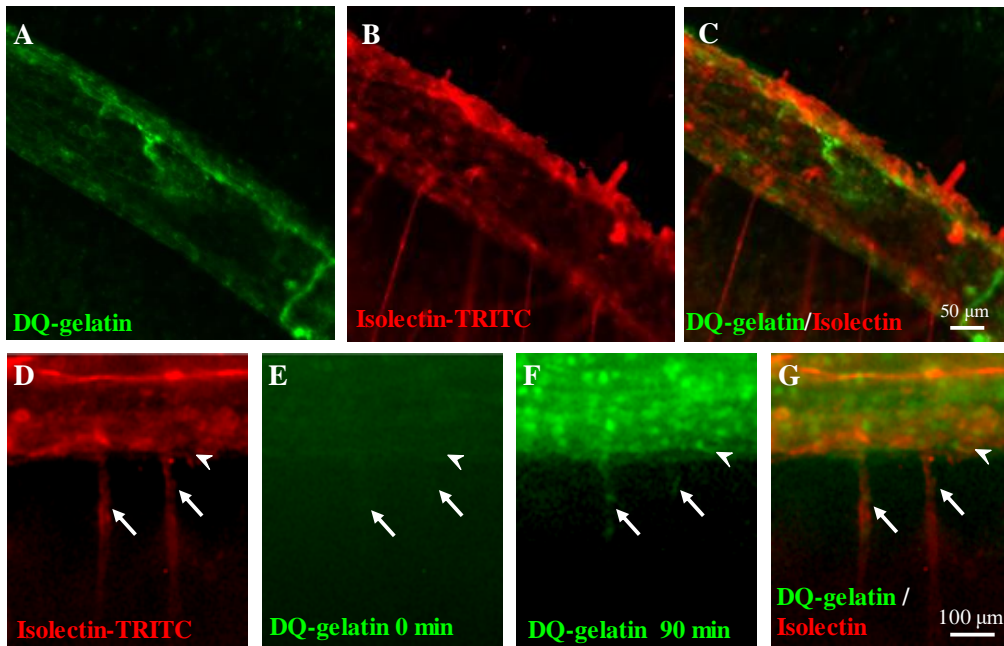


Figure 3



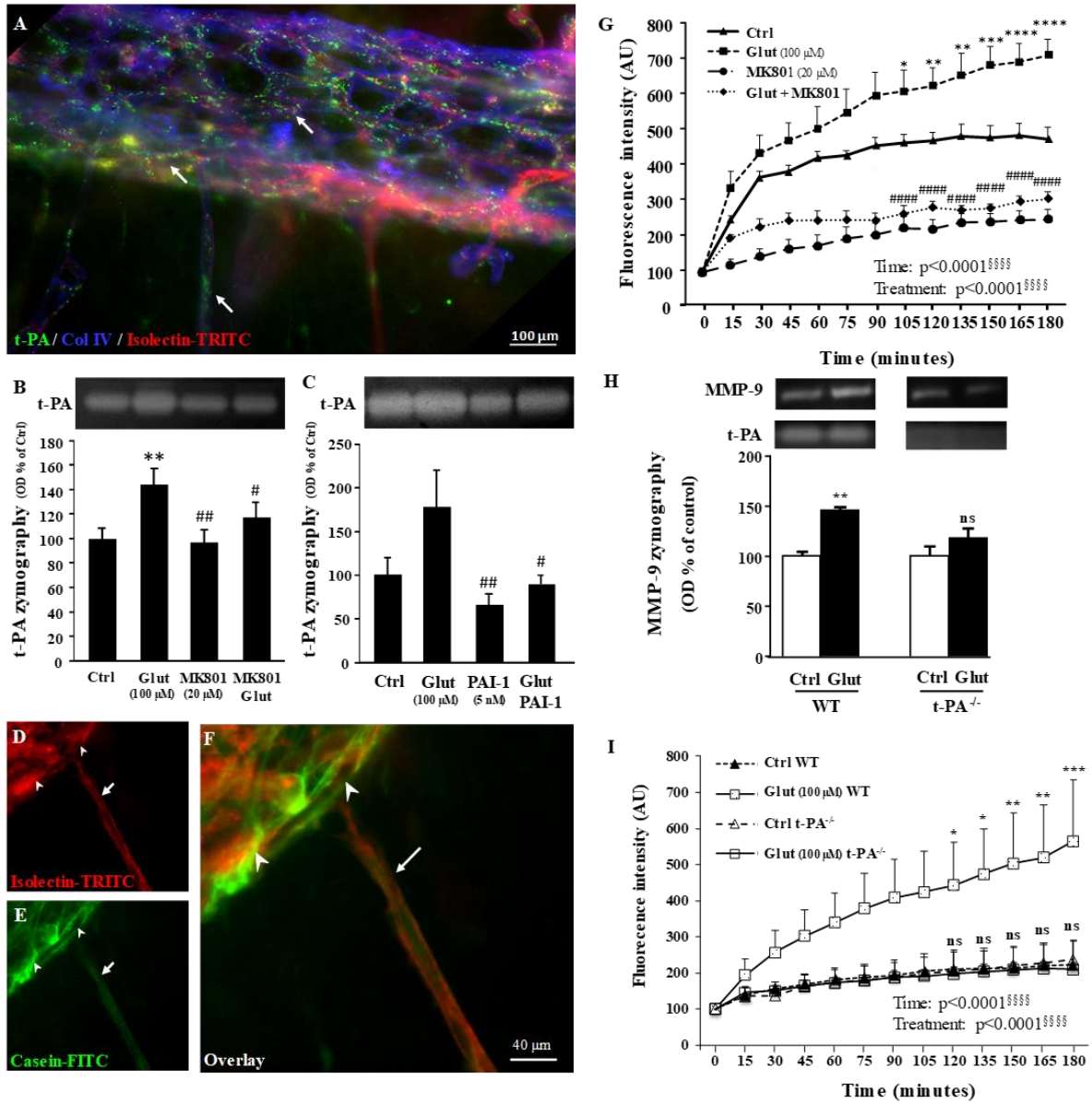


Figure 4

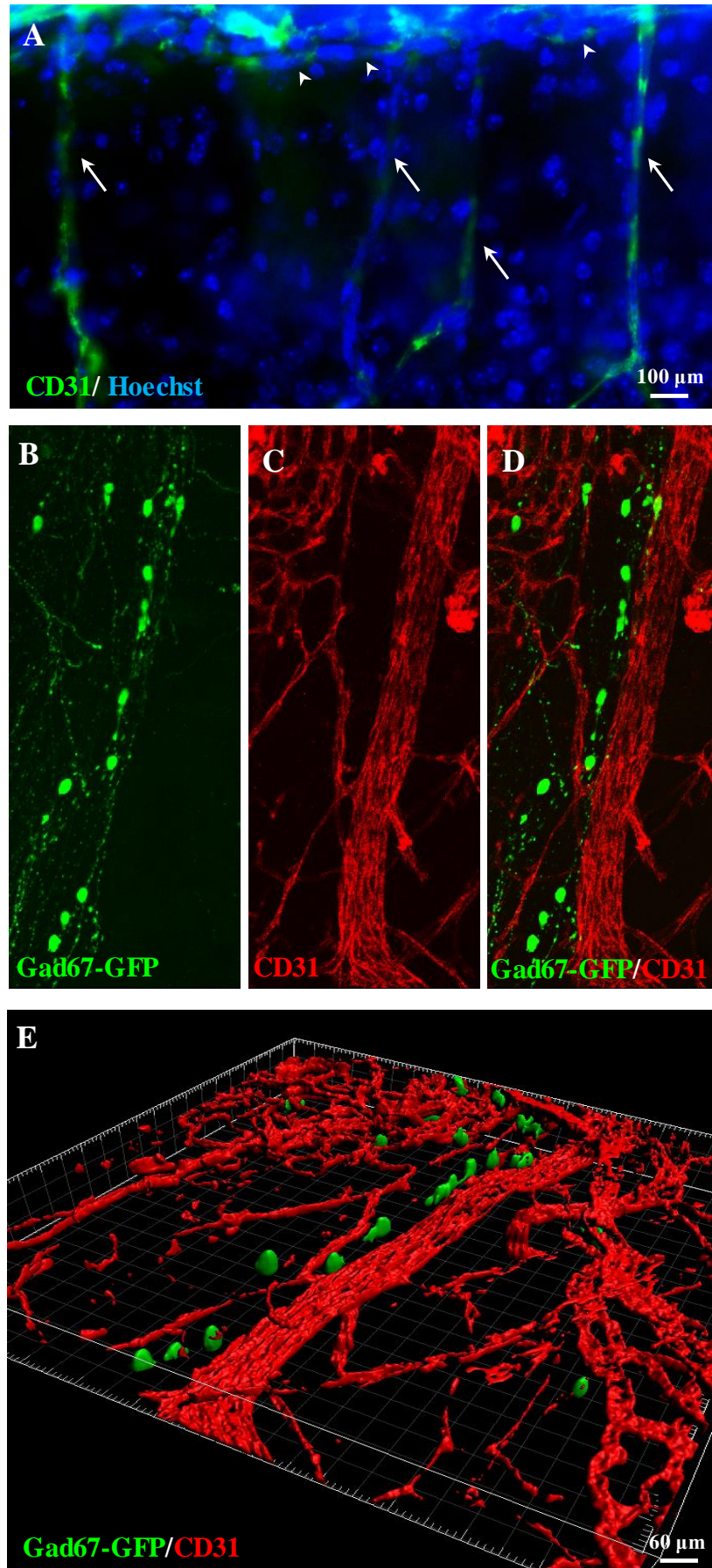


Figure 5

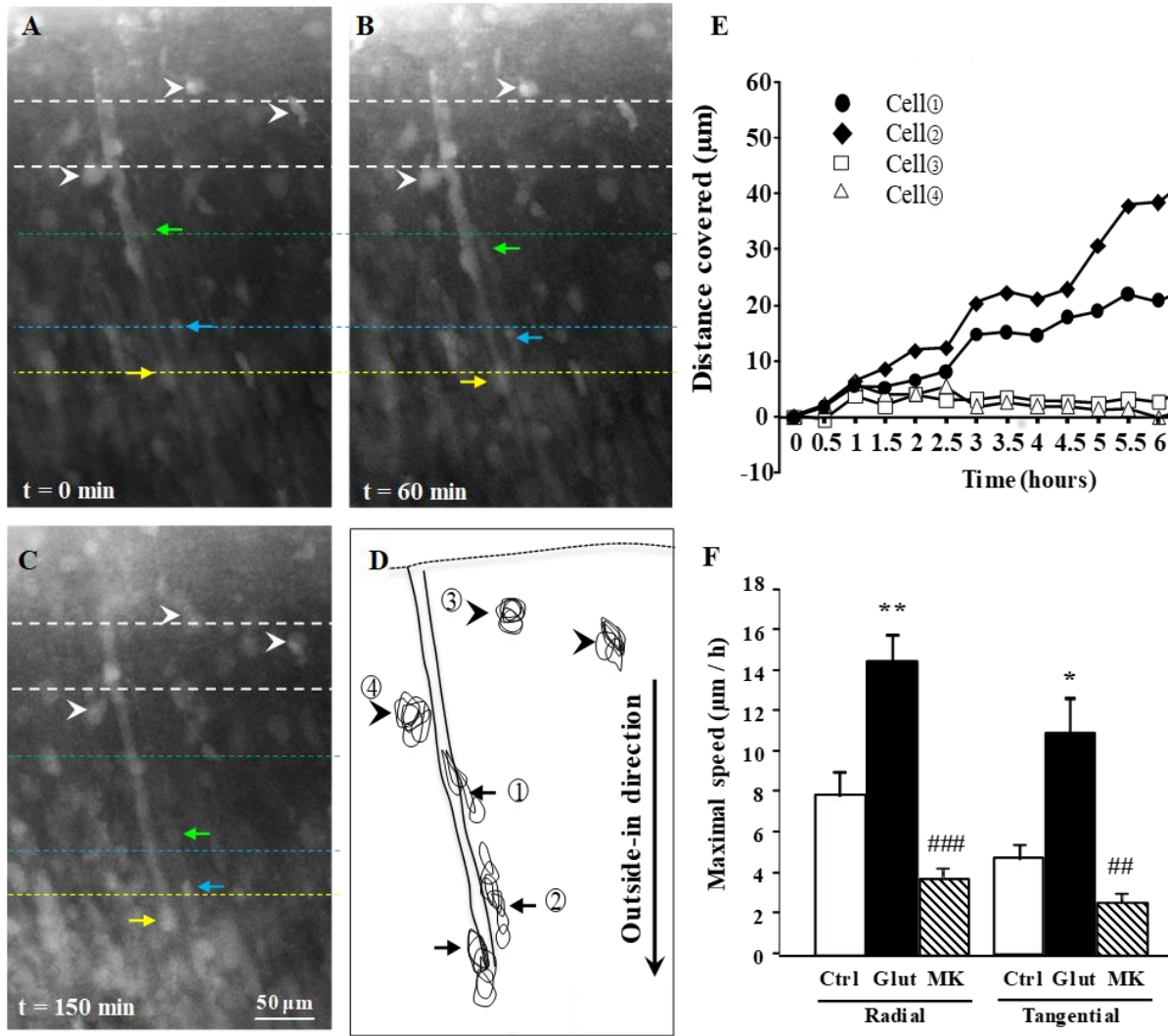


Figure 6

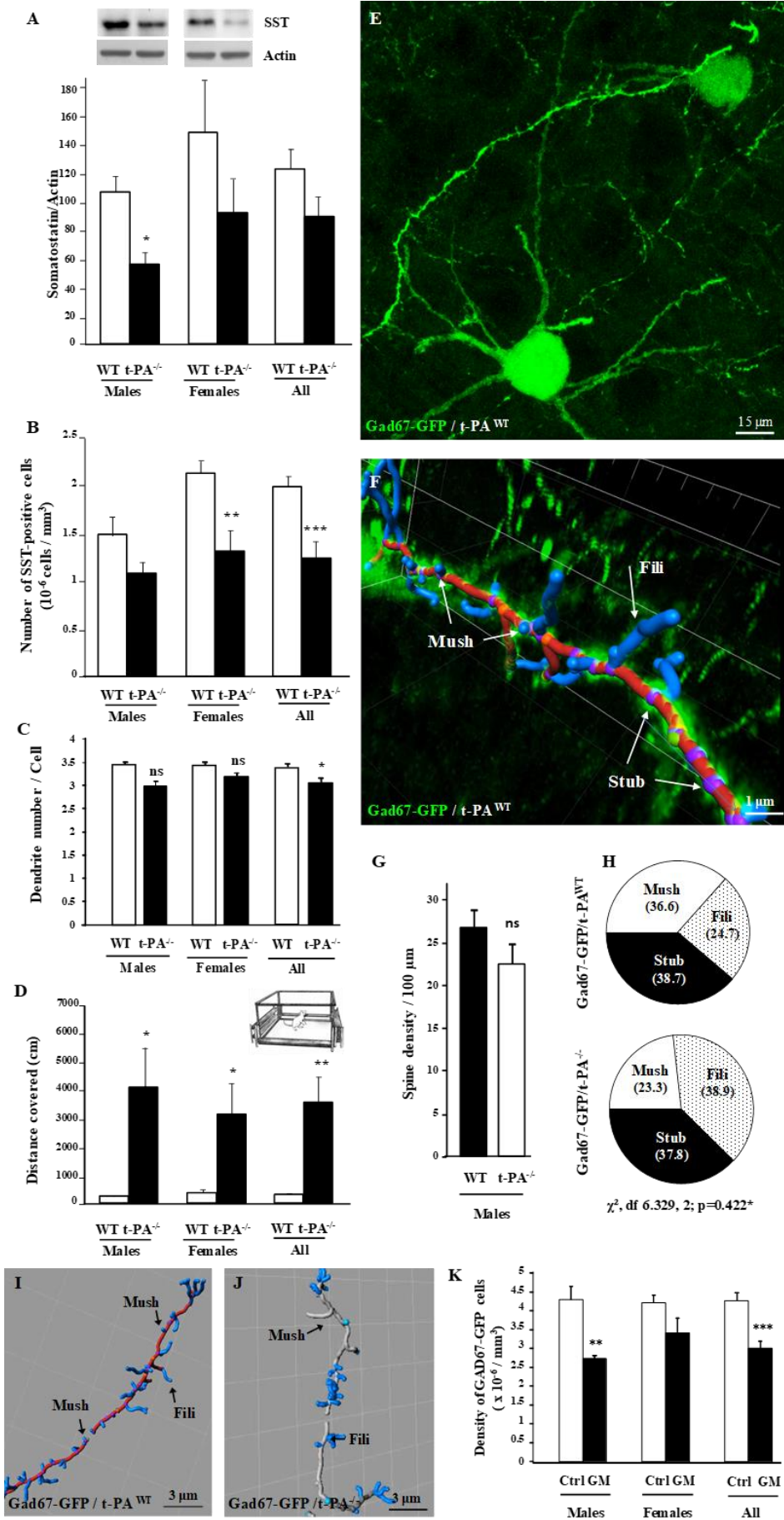
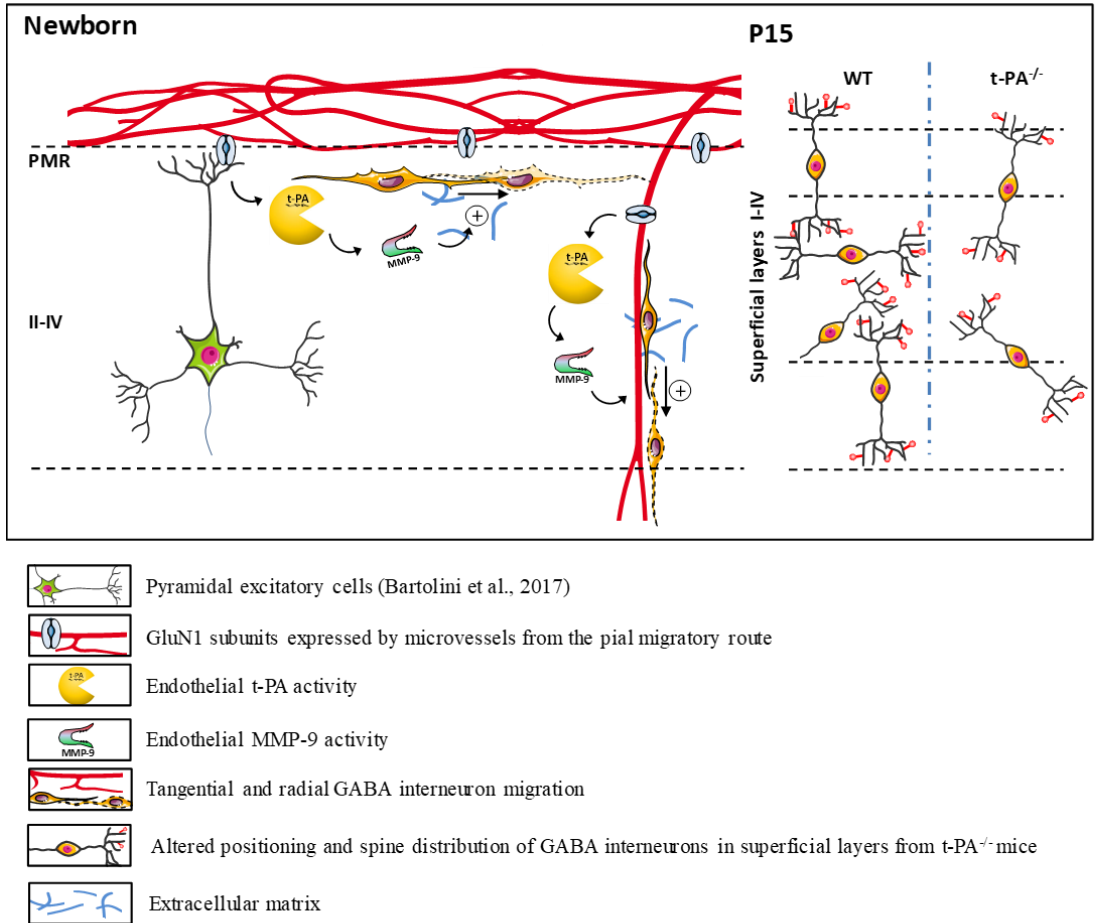


Figure 7



**Figure 8**

***In utero* alcohol exposure alters the protease activity of microvessels from the pial migratory route and impairs the cortical positioning of GABA interneurons**

Cécile Léger, Nicolas Dupré, Michelle Hauchecorne, Caroline Aligny, Denis Vivien, Philippe Leroux, Stéphane Marret, Bruno J. Gonzalez.

**En préparation**

Des études menées au laboratoire ont démontré qu'une exposition prénatale du cerveau à l'alcool induisait une altération de l'angiogenèse corticale (Jégou *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que les microvaisseaux corticaux immatures exprimaient des récepteurs NMDA fonctionnels (Legros *et al.*, 2009), nécessaires à l'intégration des neurones GABAergiques et que le glutamate stimulait la migration piale des interneurons GABA (Léger *et al.*, soumis). Comme décrit précédemment, il est maintenant connu que les vaisseaux sont indispensables à la migration tangentielle des neurones GABAergiques en assurant un rôle de support et de guidance (Won *et al.*, 2013a). Compte-tenu des propriétés inhibitrices de l'éthanol sur le récepteur NMDA, nous émettons l'hypothèse qu'une exposition prénatale à l'éthanol pourrait avoir un effet sur l'intégration corticale des neurones GABAergiques *via* une altération de l'activité des cellules endothéliales.

**Le but de cette étude était de rechercher, dans des modèles d'alcoolisation chronique *in utero* et aiguë sur tranche de néocortex de souris à P2, un effet de l'alcool sur les activités du t-PA et des MMPs endothéliales, dans le but de démontrer un impact possible sur la migration et la mise en place des interneurons GABAergiques corticaux.**

Dans cet article, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1- L'alcool impacte-t-il l'activité du t-PA endothélial stimulée par le glutamate?
- 2- L'alcool impacte-t-il l'activation des MMPs endothéliales stimulées par le glutamate?
- 3- L'alcool a-t-il un effet sur la mise en place des interneurones GABAergiques ?
- 4- Existe-t-il une différence d'effets entre les traitements chroniques et aiguës à l'alcool ?

# ***In utero* alcohol exposure alters the protease activity of cortical microvessels from the pial migratory route and the positioning of GABA interneurons**

Cécile Léger, Nicolas Dupré, François Janin, Michelle Hauchecorne, Maëlle Fabre, Sylvie Jégou, Thierry Frebourg, Carine Cleren, Philippe Leroux, Stéphane Marret and Bruno J. Gonzalez

Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, F 76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

Address correspondence to Bruno J. Gonzalez, Inserm U1245 – Team 4 “Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders,” Institute of Research for Innovation in Biomedicine, Faculty of Medicine, Normandy University, Rouen, France. Phone: +33 235 14 83 39. E-mail: [bruno.gonzales@univ-rouen.fr](mailto:bruno.gonzales@univ-rouen.fr)



## Abstract

*In utero* alcohol exposure can lead to severe neurodevelopmental impairments leading to long-term deficits. Because neurodevelopmental defects are obvious, the vast majority of studies focused on nervous cells. However, recent reports demonstrated marked effects of alcohol on brain angiogenesis in FASD infants suggesting a vascular contribution in the neurodevelopmental defects. Because the last decade revealed a close and required interaction between cortical microvessels and migrating GABA interneurons along the pial migratory route, we hypothesized that *in utero* alcohol exposure would impair the endothelial activity by altering the activity of two proteases involved in cell migration. Using cell cultures and organotypic slices from wild-type mice, results showed that an acute alcohol treatment inhibited both the glutamate-induced calcium mobilization in endothelial cells and the activity of MMP-9 and tPA. *In situ* zymography experiments indicated that these effects of alcohol were endothelial and closely interacted with microvessels from the pial migratory route. The inhibitory effect of alcohol on MMP-9 was abrogated in tPA knockout mice supporting a glutamate/tPA/MMP9 pathway. *In vivo*, and contrasting to acute treatments, a chronic *in utero* alcohol exposure exacerbated the effects of glutamate on both endothelial calcium mobilization and endothelial protease activities along the pial migratory route. These unexpected effects of alcohol were associated to the overexpression of NMDA receptor subunits. At a neuronal level, a morphometric analysis performed in Gad67GFP mice revealed that *in utero* alcohol exposure increased the density of interneurons populating the superficial cortical layers. In conclusion, the present study provides the first mechanistic and functional evidence that alcohol induces an endothelial dysfunction in the pial migratory route. In particular, they indicate that a chronic *in utero* alcohol exposure exacerbates the endothelial MMP-9 and tPA activities and disturbs the positioning of Gad67GFP interneurons arising from this route. Altogether, they provide the first mechanistic arguments in favor of a vascular contribution in the neurodevelopmental defects induced by *in utero* alcohol exposure.

**Key words:** Fetal alcohol spectrum disorders, endothelial cells, GABA interneuron migration, MMP-9, tPA

## Introduction

*In utero* alcohol exposure can lead to severe neurodevelopmental impairments leading to long-term deficits. It represents the main cause of acquired mental retardation for neonates (Bakoyiannis *et al.*, 2014). In particular, fetal alcohol syndrome (FAS), which is characterized by intrauterine growth retardation, typical cranio-facial dysmorphism, central nervous system malformations and neurobehavioral as well as cognitive deficits, is the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) (Jones and Smith, 1973; Riley *et al.*, 2011). Because neurodevelopmental defects and behavioral troubles induced by fetal alcohol exposure are obvious (Halliday *et al.*, 2017; Kable and Mukherjee, 2017), it is not surprising to note that, in the brain, the vast majority of molecular and cellular studies targeted the nervous cells *i.e.* neurons (Korpi *et al.*, 2015) oligodendrocytes and astrocytes (Wilhelm and Guizzetti, 2015). However, some research groups recently reported a drastic effect of *in utero* alcohol exposure on angiogenesis in the fetal brain and this effect was demonstrated in both animal models and human neonates (Girault *et al.*, 2017; Jégou *et al.*, 2012; Lecuyer *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Nevertheless, up to now, no links have been established in the literature between alcohol-induced vascular impairments and the well-established neurodevelopmental defects.

From the last ten years, major findings showed that some nervous cell types including GABAergic interneurons require brain microvessels to migrate from their birthplace, the ganglionic eminences, to their final cortical destination (Won *et al.*, 2013). In particular, interneuron precursors arising from the medial ganglionic eminence (MGE) and caudal ganglionic eminence (CGE), which are generated during different developmental periods (E9.5-E15.5 and E12.5-E18.5, respectively), will differently populate the developing cortex (Miyoshi and Fishell, 2011). MGE-derived interneurons invade the deep cortical layers in an inside-out manner, whereas CGE-derived interneurons that target superficial cortical layers enter the cortical plate in an outside-in direction with a close interaction with vessels from the

pial migratory route (Marín and Rubenstein, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). These specificities strongly support a direct contribution of endothelial cells in the control of the migration of GABAergic interneuron precursors.

Many studies already reported the major role of matrix metalloproteinase during cell migration in both physiological and pathological conditions including cancer cell invasion (Liu *et al.*, 2017; Ould-Yahoui *et al.*, 2013). Regarding the central nervous system, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) has been shown to be involved in the control of neuronal migration by regulating the pericellular environment (Ayoub *et al.*, 2005; Vaillant *et al.*, 2003) and *in vitro* studies showed that NMDA is able to promote the secretion of this endothelial protease by neonatal cortical endothelial cells (Legros *et al.*, 2009). Interestingly, the preferential expression pattern of NMDA receptors by endothelial cells during perinatal life coincides with the migration of GABA interneurons arising from the pial migratory route (Anderson *et al.*, 2001; Legros *et al.*, 2009). Furthermore, it is well established that ethanol possesses NMDA-receptor antagonist properties (Zhao *et al.*, 2015).

Considering that *i) in utero* alcohol exposure is able to impair cortical angiogenesis in FASD infants, *ii) immature* GABA interneurons use microvessels as migration guides along the pial migratory route, and that *iii) neonatal* cortical endothelial cells express NMDA receptors and are able to release MMP-9 by a glutamate-dependent mechanism, we hypothesized that alcohol exposure during pregnancy would be able to impair the endothelial protease activity along the pial migratory route and would modify the migration pattern of GABAergic interneurons arising from this route and populating the superficial cortical layers.

## Materials and Methods

**Wild-type and transgenic animals** NMRI (Naval Medical Research Institute) mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). FVB-Tg(GadGFP)45704Swn transgenic mice (# 003718) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). In this mouse strain developed by Oliva and co-workers, GABAergic interneurons arising from the GEs express enhanced green fluorescent protein under the control of the mouse *Gad1* gene promoter. tPA knockout (tPA<sup>-/-</sup>) mice in C57Bl6/129 background (tPA<sup>-/-</sup> in 87.5/12.5% ratio) were developed and provided by the Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Belgium (Carmeliet *et al.*, 1993). For all these mouse strains, animals were kept in a temperature-controlled room ( $21 \pm 1$  °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. Animal care and manipulation complied with recommendations issued by the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC, license n°. 21CAE035) and under the supervision of authorized investigators (B.J.G., authorization n°. 7687 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

**Chemicals** Glutamate, coomassie blue, isolectin-B4-TRITC/FITC, phosphate buffer saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), Triton X-100 and  $\beta$ -actin primary antibody were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). SDS-PAGE Tris-glycine gel (containing 0.1% gelatin as gelatinases substrate), renaturing buffer, developing buffer, DQ-gelatin-FITC, DQ-casein-FITC were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Paraformaldehyde (PFA) was obtained from Labonord (Templemars, France). The GFP primary antibody was from Abcam (Cambridge, UK). The somatostatin primary antibody was from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). The cleaved caspase-3 primary antibody was from Cell Signaling (Massachusetts, USA). The secondary antibodies Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (A-21206) used for

immunohistochemistry were from Invitrogen. The Apo-ONE homogeneous caspase 3/7 kit was obtained from Promega (Fitchburg, WI, USA).

***In utero ethanol exposure*** Ethanol absolute (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was diluted in sodium chloride 0.09% (NaCl). Pregnant mice received a unique subcutaneously (s.c.) injection per day of 3g/kg ethanol or NaCl 0.09% from gestational day 15 (GD15) to GD20 at 11 am. 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. Treatments were performed in wild type and Gad67GFP mice.

***Preparation and treatment of cultured cerebral slices from mice embryos and neonates***

Cortex brain slices were obtained from embryonic day E15 or postnatal day 2 (P2) mice. Previous studies demonstrated that at this stage numerous immature GABAergic interneurons are still migrating along the pial migratory route (Inada *et al.* 2011). Mice were sacrificed by decapitation and brains rapidly dissected in order to isolate the hemispheres. The neocortex was immediately placed into ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) : NaCl, 125 ; KCL, 3 ; CaCl<sub>2</sub>, 2 ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 ; NaHCO<sub>3</sub>, 26 ; D-glucose, 10 ; pH 7.4. Transverse slices (250 µm) were cut at 4°C by using a vibratome VT1000S Leica (Reuil-Malmaison, France), then transferred into 24-well Costar plates (Cambridge, MA) containing aCSF and incubated for a 30 min recovery period at 37°C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Then, the slices were washed with fresh aCSF and treated 3h at 37°C with glutamate (100 µM) and ethanol (50 mM) alone or in combination.

**Measurement of caspase-3 activity** For caspase-3 activity measurements, E15 brain slices from NMRI mice were microdissected, homogenized in 500  $\mu$ L of hypotonic lysis buffer and 20  $\mu$ g of proteins were incubated at 30°C with 100  $\mu$ L of caspase-3 buffer containing 1  $\mu$ L of the caspase-3 substrate Z-DEVD-R110 provided with the Apo-ONE homogeneous caspase-3/7 kit (Promega). For each condition, the ipsilateral side of the slice was used as control. Fluorescence intensity was quantified every 5 minutes for 2 hours at excitation on emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively, using a chameleon plate reader (Mustionkatu, Turku, Finland).

**Immunohistochemistry** Brain slices previously fixed with 4% PFA in PBS were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100; Supplementary Table 1). Then, the slices were rinsed twice with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing the adequate secondary antibody. Cell nuclei were visualized by incubating slices for 5 min with 1 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope. Control for nonspecific binding of the secondary antibody was done by omitting the primary antibodies.

**SDS-PAGE gelatin zymography** Gelatin zymograms revealed matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and -9) activities in P2 microdissected cortices. Cultured brain slices were incubated for 3 h in different treatments. Cortices microdissected from slices were washed in fresh aCSF and homogenized in 50  $\mu$ L of lysis buffer (50  $\mu$ M Hepes; pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM glycerophosphate; 100 mM sodium fluoride; 1% Triton X100). After centrifugation of the homogenates (20,000g x 15 min), the supernatants were collected and protein concentrations determined by Bradford assay. Proteins were loaded (30  $\mu$ g/well) and separated by electrophoresis. Then, the gels were incubated in renaturing buffer for 30 min at room

temperature, and in developing buffer for another 30 min at room temperature. After transfer in fresh developing buffer, gels were incubated for 5 days at 37°C, stained in 0.5% Coomassie blue for 1 hour and rinsed for 1 hour in distilled water. Light stripes on blue background indicate gelatin digestion in the gel by the gelatinases. Digital images of the gels were acquired and digestion stripes were quantified by using Explora Nova Mercator Software (La Rochelle, France). Experiments were performed in cultured slices from wild type and tPA<sup>-/-</sup> mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol exposure model.

***In situ gelatinase zymography*** *In situ* MMP zymography was performed on 250 µm brain slices previously stained by isolectin-B4-TRITC in order to visualize the pial migratory route. Practically, slices were incubated 30 min in aCSF containing isolectin-B4-TRITC (1/50) at 37°C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. After 2 washes for 10 min with aCSF, slices were incubated for 3 h with the quenched gelatinase substrate DQ-Gelatin-FITC (1/50) in presence of glutamate (100 µM), and alcohol 50 mM alone or in combination. Quantification of FITC fluorescence, indicative of a cell-specific gelatinase activity in the slice, was performed by time-lapse recordings using a fluorescent videomicroscope system DMI 6000B Leica (Reuil-Malmaison, France) coupled to the Explora Nova Mercator Software. Microphotographs were acquired at 488 nm and 540 nm every 15 min, for 3 h in order to follow the kinetics DQ-Gelatin-FITC degradation and to visualize cortical microvessels from the pial migratory route, respectively. A background level was defined in a negative region of the slice. Experiments were performed in cultured slices from wild type and tPA<sup>-/-</sup> mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol exposure model.

***SDS-PAGE casein zymography*** Casein zymograms were used to reveal tPA activity in P2 cortical extracts. Cultured brain slices were incubated for 3 h in different treatments. Cortices were microdissected, washed in fresh aCSF and homogenized in 50  $\mu$ L of lysis buffer. After centrifugation of the homogenates (20,000g x 15 min), the supernatants were collected and protein concentrations were determined by Bradford assay. Proteins were loaded (15  $\mu$ g/well) and separated by electrophoresis. Then, the gels were incubated in a renaturing buffer (Triton X-100, 12.5 ml; H<sub>2</sub>O, 487.5 ml) at 4°C overnight, and rinsed in water for 30 min at 4°C. Afterwards, gels were transferred in developing buffer (glycine, 3.75 mM; EDTA, 1.45 mM) for 3h30 at 37°C, and stained in 0.5% Coomassie blue for 1 hour and finally destained in 40% methanol and 10% acetic acid for 30 min at room temperature. Light stripes on blue background indicate casein digestion in the gel by tPA. Digital images of the gels were acquired and digestion stripes were quantified by using Explora Nova Mercator Software (La Rochelle, France). Experiments were performed in cultured slices from wild type and tPA<sup>-/-</sup> mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol exposure model.

***In situ casein zymography*** *In situ* casein zymography was performed on 250  $\mu$ m brain slices previously stained by isolectin-B4-TRITC in order to localize the vascular network of the pial migratory route. After 2 washes for 10 min with aCSF, slices were incubated for 3 h with DQ-casein-FITC (1/125), in presence of glutamate (100  $\mu$ M) and alcohol (50 mM) alone or in association. Quantification of FITC fluorescence, indicative of a cell-specific digestion of the substrate was performed by videomicroscopy using a fluorescent videomicroscope system DMI 6000B Leica (Reuil-Malmaison, France) as described for *in situ* gelatinase zymography. Experiments were performed in cultured slices from wild type mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol exposure model.

***Cultures of P2 cortical endothelial cells***



C57BL/6 mouse primary brain microvascular endothelial cells isolated from brain tissue of P2 pups were purchased from Cell Biologics (Chicago, IL, USA). Cells were cultured at 37 °C, in a humidified environment, in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. They were fed every 2 days with a complete mouse endothelial cell culture medium, on 60 mm diameter dishes or 12-well slides. Two days after confluence was reached, the cells were incubated for 24 h with serum-free medium. The cells were then treated with ethanol 50 mM or aCSF during 30 min before calcimetry experiments.

***Measurement of intracellular calcium levels*** Endothelial cell cultures or organotypic brain slices obtained from P2 mice were incubated for 15 min in aCSF containing 10 μM fura-2 AM and 0.03% pluronic F-127. The endothelial cultures or slices were then washed twice for 5 minutes in aCSF at 37°C and the slices were transferred to a 35-mm dish containing 1 mL of a aCSF and immobilized using a nylon mesh. The temperature of the aCSF was kept constant at 37°C and the cultured cells or slices were rinsed with aCSF. One volume of glutamate 400 μM alone or in presence of 100 mM ethanol was perfused into an equal volume of aCSF bathing the slice to reach a final 200 μM and 50 mM concentration, respectively. The fluorescent signals associated with calcium-free and calcium-bound Fura-2 were measured by alternatively exciting the slices at 340 and 380 nm using Leica DM Fluorescent microscope equipped with a rapid shutter wheel. The emitted fluorescence was collected at 510 nm and the ratio of the two signals calculated using metamorph software (Roper Scientific, Evry, France). Data were exported to the biostatistics software Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA), which was used to compute the maximal fluorescence intensity and the area under the curve. Experiments were performed in cultured slices from wild type mice for acute treatments and from a chronic *in vivo* alcohol exposure model.

**Western blot** Micro-dissected cortices from Gad67-GFP mice were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer. After centrifugation, supernatants were collected, and protein concentrations were determined by Bradford assay. The pellet was denatured at 100°C for 5 min in 50 µL of Tris/HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue and 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) then electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel. After separation, the proteins were electrically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). The membrane was incubated with blocking solution (1% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h and incubated overnight with primary antibodies raised against somatostatin, GluN1, GluN2A, GluN2B, cleaved-caspase3, GFP, Dlx1 and actin (Supplementary Table 1). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence ECL Plus immunoblotting detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories, Marne la coquette, France) and  $\beta$ -actin was used as a loading control. Commercial markers (Seebie prestained standard, Invitrogen) were used as molecular weight standards.

**Quantification of GFP-positive interneurons in Gad67-GFP mice** For measurement of GFP positive cell density in P15 Gad67-GFP mice, images were acquired and saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope. Images were subsequently opened in Mercator software and regions of interest (ROIs) were drawn. Afterwards, a counting frame was defined within the ROI and a threshold was set in order to differentiate FITC-positive cells from the background. By a segmentation process, the computer calculated the number and the cumulated area of objects within the ROI, yielding cell number and cell density, respectively.

***Quantification of spine morphology and spine density in transgenic Gad67-GFP mice*** The fine network of secondary and tertiary dendrites was acquired in Gad67-GFP mice using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning imaging system (Leica Microsystems AG). Z-stack series of images were later deconvolved using AutoQuant X<sub>3</sub> software and loaded into IMARIS imaging software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D reconstruction. The Filament Tracer function was used to assign and classify spines, yielding spine density and spine categories (stubby, filopodia or mushroom-shaped). For a given slice, 2 ROIs were defined, 2 to 3 dendrites were quantified per ROI and the total number of quantified neuritis was fixed at 20 per group.

***Statistical Analysis*** Statistical analyses were performed using the biostatistic Prism software. Tests used for each experiments, the number of independent experiments and p values were summarized in the Supplementary Table 2.

## Results

### ***Alcohol alters the endothelial MMP-9 activity in cultured cortical slices from P2 neonates***

Considering the demonstration of a vasculo-dependent migration of GABA interneurons along the pial migratory route (Marín and Rubenstein, 2001; Won *et al.*, 2013) and the recent data regarding the deleterious effects of *in utero* alcohol exposure on cortical angiogenesis (Jégou *et al.*, 2012; Lecuyer *et al.*, 2017), we hypothesized an effect of alcohol on the endothelial cell activity (Figure 1). Gel zymography experiments performed at P2, when GABA interneurons are still migrating along the pial migratory route (Anderson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2011), revealed that treatment of cortical slices with glutamate (100  $\mu$ M) induced a robust increase of the MMP-9 activity ( $p < 0.001$ ; Figure 1A). Co-incubation of the slices with alcohol (50 mM) significantly prevented the effect of glutamate on the MMP-9 activity ( $p < 0.01$ ; Figure 1A). Cell

imaging experiments by *in situ* zymographies performed in cultured cortical slices showed that fluorescence resulting from the cleavage of DQ-gelatin-FITC, a quenched MMP substrate, was mainly endothelial and localized at the level of tangential vessels from the pial migratory route (Figure 1B,C; arrows) and along radial microvessels in the cortical superficial layers (Figure 1B,C; arrowheads). As observed in SDS-Page gel experiments, incubation of cultured slices with glutamate (100  $\mu$ M) significantly increased the endothelial-associated MMP-like activity (Figure 1D) and this effect was markedly blocked by ethanol (50 mM; Figure 1D).

***Alcohol alters the endothelial tPA activity in cultured cortical slices from neonates*** Because the activation of endothelial MMP-9 has been shown to be regulated by the endothelial protease tPA (Jin *et al.*, 2010; Omouendze *et al.*, 2013; Figure 2A), we investigated the effect of alcohol on tPA activity. Gel zymographies from P2 cortical slices showed that glutamate (100  $\mu$ M) increased the tPA activity (Figure 2B). As performed for MMP-9, *in situ* zymography experiments were conducted in cultured cortical slices using the tPA substrate DQ-casein-FITC in order to visualize the tPA-like activity (Figure 2C-E). Co-labeling of cortical microvessels with isolectin-TRITC demonstrated that the fluorescent signal resulting from the proteolytic activity was mainly endothelial and co-localized with vessels from the pial migratory (Figure 2C-E; arrowheads) route and apical radial microvessels (Figure 2C-E; arrows). Kinetics of the DQ-casein-FITC proteolysis in microvessels showed that alcohol (50 mM) significantly inhibited the glutamate-induced tPA-like activity (Figure 2F). In cultured slices from tPA knock-out animals (tPA<sup>-/-</sup>), both glutamate (100  $\mu$ M) and alcohol (50 mM) failed to regulate the endothelial MMP-9 activity demonstrating a tPA-dependent MMP9 activation.

***Glutamate and alcohol directly regulate the activity of neonatal endothelial cells*** Whereas cultured slices present the advantage of semi-preserved cell-cell interactions, this model cannot discriminate between direct or indirect effects. Because it has been recently showed that neonatal endothelial cells express functional NMDA receptors (Legros *et al.*, 2009), we researched by calcimetry a direct effect of alcohol on cultured endothelial cells from P2 cortical microvessels (Figure 3). Immunohistochemistry experiments confirmed the expression of the GluN1 subunit on both isolated microvessels and cultured neonatal endothelial cells (Figure 3A,B). Four days after seeding, endothelial cells were confluent and calcimetry experiments were conducted after loading the cells with the ratiometric probe FURA2 (Figure 3C). Perfusion of cultured cells with glutamate (200  $\mu\text{M}$ ) induced an increase of intracellular calcium levels ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; Figure 3D,E). The percentage of answering cells was  $45\% \pm 5\%$ . The co-perfusion of alcohol (50 mM) significantly reduced the glutamate-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mobilization (Figure 3E).

***Paradoxical effect of chronic in utero alcohol exposure on endothelial MMP-9 activity*** In order to confirm *in vivo* the *in vitro* effects of acute ethanol treatments on cultured slices and endothelial cells, we investigated the effect of glutamate on both  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and endothelial protease activity in neonates previously exposed *in utero* to alcohol (Figure 4). Unexpectedly, the quantification of calcium mobilization in the superficial cortical layers revealed that the effect of glutamate (100  $\mu\text{M}$ ) on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was markedly exacerbated in slices from neonates previously exposed *in utero* to alcohol (Figure 4A,B). Interestingly, this functional effect of alcohol was associated with a major overexpression of the cortical GluN1 subunit of the NMDA receptor (Figure 4C) while a similar tendency was found for the GluN2A and GluN2B subunits (Figure 4D,E). Regarding the endothelial protease activities, the treatment of P2 cortical slices from neonates previously exposed *in utero* to alcohol with

glutamate (100  $\mu$ M) resulted in an exacerbated MMP-9 like activity in microvessels from the pial migratory route (Figure 4F,G).

***In utero alcohol exposure impairs the density of cortical GABA interneurons*** Because GABAergic interneurons migrating along the pial migratory route preferentially populate the cortical superficial layers (Miyoshi and Fishell, 2011), we investigated the effect of *in vivo* and *in utero* alcohol exposure on the positioning of Gad67GFP interneurons. Indeed, data from Oliva and co-workers previously showed that these interneurons were preferentially localized in cortical layers II-IV (Oliva *et al.*, 2000). At P15, a developmental stage where the positioning of Gad67GFP neurons is achieved (Southwell *et al.*, 2012), morphometric analysis indicated that *in utero* alcohol exposure significantly increased ( $18.4\% \pm 3.9$ ;  $p < 0.05$ ) the density of Gad67GFP interneurons within the superficial layers (Figure 5A-C). This effect was observed in both females and males (Figure 5C). Western blot experiments comforted the histological data and revealed an even more pronounced effect of *in utero* alcohol exposure on eGFP protein levels ( $150\% \pm 48$ ;  $p < 0.01$ ) suggesting that alcohol impaired not only the density of interneurons but also the expression rate of the Gad67GFP (Figure 1D). Western blot experiments were also conducted to target two markers of GABA interneurons, Dlx1 and somatostatin (SSt; Figure 5E,F). When compared to the control group, *in utero* alcohol exposure significantly increased Dlx1 levels in extracts from microdissected cortices (Figure 5E). The effect was retrieved in both males and females even if significance was only reached for males. In contrast, no significant effect was found regarding SSt even if, contrasting to Dlx1, SSt levels tended to decrease (Figure 5F). Because spine morphology would be indicative of ongoing neuronal differentiation (Bourne and Harris, 2008; Dailey and Smith, 1996), we investigated the effects of *in utero* alcohol exposure on this criteria (Figure 5G,H). Visualization and quantification of different spine subtypes showed that *in utero* alcohol exposure did not modify

the distribution of filipodia, stubbies and mushrooms (Figure 5G). In contrast, *in utero* alcohol exposure significantly increased the spine density (Figure 5H).

## Discussion

It is clearly established that *in utero* alcohol exposure is deleterious for the brain development (Riley *et al.*, 2011). In particular, fetal alcohol exposure induces brain structure impairments which result in behavioral and cognitive troubles (Bakoyiannis *et al.*, 2014). For example, it has been described abnormalities and impaired migration patterns in various structures such as basal ganglia, frontal cortex or cerebellum and major reduction or complete absence of the corpus callosum (Riley *et al.*, 2011). Consequently, most studies from the literature trying to decipher mechanisms involved in the deleterious effects of alcohol during neurodevelopment focused on nervous cells and reported that alcohol altered neural tube formation (Haghighi Poodeh *et al.*, 2014), neurogenesis (Rubert *et al.*, 2006), neuronal migration (Aronne *et al.*, 2011; Shenoda, 2017), apoptosis (Ikonomidou *et al.*, 2000), astroglialogenesis (Vemuri and Chetty, 2005) or myelination by oligodendrocytes (Ozer *et al.*, 2000; Pons-Vázquez *et al.*, 2011). Nevertheless, in the last decade, major findings revealed specific endothelial/nervous cell interactions required for the correct migration and the positioning of two nervous cell types i.e. the GABAergic interneurons (Marín and Rubenstein, 2001) and the oligodendrocytes (Tsai *et al.*, 2016). Taken together, these data prompt us to hypothesize that endothelial cells would play an active role in neurodevelopmental defects induced by alcohol. Indeed, the effects of *in utero* alcohol exposure on brain angiogenesis and on the activity of endothelial cells have been poorly investigated.

We recently showed that *in utero* alcohol exposure altered the cortical vessel organization in the superficial cortical layers in both animal models and human (Jégou *et al.*, 2012; Lecuyer *et al.*, 2017). Because during development, vessels from the pial migratory route guide the

migration of GABA interneurons that will populate the superficial cortical layers, we investigated the effects of alcohol on the activity of neonatal endothelial cells and on the positioning of GABA interneurons in the superficial cortical layers. Highlights indicated that *i) ex vivo*, an acute alcohol treatment inhibits the activation of two endothelial proteases (MMP-9 and tPA), *ii) the effect of alcohol on endothelial proteases is localized associated to microvessels from the pial migratory route*, *iii) ethanol is able to directly interact with neonatal endothelial cells*, *iv) in vivo*, chronic *in utero* alcohol exposure induces overexpression of NMDA receptor subunits and exacerbates the effect of glutamate on endothelial protease activities in the pial migratory route and, *v) in utero* alcohol exposure increased the density of Gad67-GFP interneurons populating the superficial cortical layers.

### ***Effects of acute alcohol exposure on intracellular calcium mobilization in neonatal endothelial cells***

While alcohol toxicity during neurodevelopment clearly results from direct and indirect actions such as interactions with lipid membranes (Yalcin *et al.*, 2017) or metabolite-induced effects such as acetaldehyde (Matsushita and Higuchi, 2017), it has also been shown that ethanol can directly modify neurotransmission by interacting with receptors. For example, ethanol possesses antagonist and agonist properties for NMDA (Zhao *et al.*, 2015) and GABAA (Chandler *et al.*, 2017) receptors, respectively. Interestingly, recent studies demonstrated that, contrasting to adult, neonatal endothelial cells express functional NMDA receptors suggesting an effect of alcohol on the endothelial cell activity (Legros *et al.*, 2009). These data prompt us to investigate the effect of ethanol in intracellular calcium mobilization in both neonatal cultured endothelial cells and in the superficial cortical layers of cultured slices. In cultured slices, glutamate increased calcium mobilization quantified by microfluorimetry at the level of the pial migratory route. However, because in organotypic slices the histological organization



is preserved and glutamate receptors are expressed by different cell types including neurons, we performed similar experiment in cultured neonatal endothelial cells prepared from isolated cortical microvessels (Legros *et al.*, 2009). First, immunohistochemistry validated the expression of the GluN1 subunit in both isolated microvessels and cultured endothelial cells. Second, glutamate significantly increased intracellular calcium mobilization. When it was co-administered, alcohol significantly inhibited the effect of glutamate in both cultured slices and cultured endothelial cells. Taken together, these data constitute the first demonstration of a functional glutamate/alcohol interaction in cultured neonatal endothelial cells along the pial migratory route. Additional pharmacological experiments would be planned to further characterize the contribution of the NMDA receptor on the inhibitory effect of alcohol on the glutamate-induced effects in microvessels.

#### ***Effects of acute alcohol exposure on the activity of endothelial proteases***

Because it was shown a required interaction between endothelial cells and immature interneurons for a correct migration along the pial migratory route (Won *et al.*, 2013), we investigated the effect of glutamate and/or ethanol on the activation of two endothelial proteases, MMP-9 and tPA. Indeed, previous studies reported the major contribution of these two proteases in the control of physiological and pathological cell migration by degrading the extracellular matrix (Liu *et al.*, 2017; Ould-Yahoui *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2016). Gel zymographies showed that glutamate significantly increased the activity of MMP-9 and tPA in microdissected cortex extracts from mouse neonates. In addition, the present data revealed that, when it was co-incubated, ethanol significantly reduced the effect of glutamate on the activity of the two endothelial proteases. *In situ* zymography experiments performed in cultured slices revealed that both MMP-9 and tPA-like activities closely overlapped with microvessels from the pial migratory route and in radial vessels within the superficial cortical layers. Interestingly,

the effect of glutamate and alcohol on the MMP-9 activity was abrogated in tPA knockout mice reinforcing the demonstration of a functional link between these two proteases (Jin *et al.*, 2010; Omouendze *et al.*, 2013). Altogether, these data constitute the first demonstration that along the pial migratory route an acute alcohol treatment is able to inhibit the activity of two endothelial proteases which are known to be involved in the control of cell migration.

### ***Distinct effects of acute and chronic in vivo alcohol exposure on the endothelial activity***

In order to validate *in vivo* the effects of alcohol on endothelial proteases characterized in cultured slices, we performed similar experiments in offspring from pregnant mice previously exposed to alcohol during their last gestational week. Surprisingly, when compared to acute alcohol treatments, the effects of *in utero* alcohol exposure on calcium mobilization and endothelial protease activities were drastically different. Indeed, whereas acute alcohol treatments inhibited the effects of glutamate on calcium mobilization and on MMP-9 and tPA activities, a chronic *in utero* alcohol exposure exacerbated the effects of glutamate. Such differential effects of alcohol were recently reported on neuronal cells (Baculis *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015). In particular, it was shown that, contrasting to acute exposure, chronic ethanol exposure enhances the excitability of cortex neurons (Nimitvilai *et al.*, 2017) and that a 7-day ethanol exposure of human embryonic stem cell-derived cortical neurons highly up-regulated the expression of several genes including four NMDA receptor subunit genes (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B and GRIN2D, Xiang *et al.*, 2015). Consistent with these data, our results revealed that chronic alcohol exposure significantly increased the protein levels of GluN1, GluN2A and GluN2B. Altogether, these data constitutes the first demonstration of alcohol-induced functional vascular impairments in the pial migratory route leading to an exacerbation of the endothelial protease activities. They strongly support a vascular

contribution in the deleterious effects of alcohol on neuronal migration during brain development.

***Chronic in utero alcohol exposure impairs the density of GABA interneurons in the superficial cortical layers***

In order to determine whether the effects of *in utero* alcohol exposure on endothelial protease dysfunction along the pial migratory route would be associated to neuronal migration impairments, we performed *in utero* alcohol treatments in Gad67GFP mouse. Indeed, these GFP-expressing interneurons will preferentially populate the superficial cortical layers (Oliva *et al.*, 2000). Moreover, the cell migration and the positioning of these Gad67GFP neurons are achieved after the first two postnatal weeks (Southwell *et al.*, 2012). Finally, it has been shown that most neurons populating the superficial cortical layers migrate along the pial migratory route (Miyoshi and Fishell, 2011). Interestingly, a morphometric analysis targeting Gad67GFP interneurons revealed that both cell bodies as well as dendritic spine densities were significantly increased when compared to the control group. These results would appear in discrepancy with previous data from the literature which showed that alcohol is neurotoxic and induced neuronal death (Ikonomidou *et al.*, 2000). In our hands, the treatment of cultured slices with ethanol (50 mM) tended to increase both caspase-3 cleavage and caspase-3 activity (Supplementary Figure 1). However, when targeting the GABAergic neurons, a previous study from Skorput and co-workers revealed that *in utero* alcohol exposure increased the cortical density of Nkx2/ Tomato-fluorescent interneurons originating from the medial ganglionic eminences (Skorput *et al.*, 2015). Taken together, these data suggest that the increased density of Gad67GFP neurons in the superficial cortical layers would result from the alcohol-induced exacerbation of the endothelial protease MMP-9 and tPA activities. This effect would favor the vasculo-dependant

migration of GABA interneurons along the pial migratory route by promoting the extracellular matrix degradation.

In conclusion, it is well established that alcohol consumption during pregnancy can induced fetal alcohol spectrum disorders associated to structural and cellular neurodevelopmental defects. For these reasons, most studies focused on nervous cells in order to decipher the mechanisms leading to these troubles. We recently demonstrated that *in utero* alcohol exposure impairs the brain vasculature in both mouse and human fetuses. The present study provides the first mechanistic and functional evidence that alcohol induces an endothelial dysfunction resulting in an exacerbated activity of two endothelial proteases (MMP-9 and tPA) in the pial migratory route during cortex development. Because these results are associated with an increased density of Gad67GFP interneurons populating the superficial cortical layers, they provide the first arguments in favor of a vascular contribution in the neurodevelopmental defects induced by *in utero* alcohol exposure.

## **Funding**

This work was supported by the Rouen University, the Normandy University, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM; UMR1245), the Conseil Régional de Normandie, the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche en Alcoologie, the Fondation Motrice and the Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN). CL is a recipient of a fellowship from the Région Normandie.

## References

- Anderson, S.A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*. 128, 353-363.
- Aronne, M.P., Guadagnoli, T., Fontanet, P., Evrard, S.G., and Brusco, A. (2011). Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Exp. Neurol.* 229, 364–371.
- Ayoub, A.E., Cai, T.-Q., Kaplan, R.A., and Luo, J. (2005). Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 481, 403–415.
- Baculis, B.C., Diaz, M.R., and Valenzuela, C.F. (2015). Third trimester-equivalent ethanol exposure increases anxiety-like behavior and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 137, 78–85.
- Bakoyiannis, I., Gkioka, E., Pergialiotis, V., Mastroleon, I., Prodromidou, A., Vlachos, G.D., and Perrea, D. (2014). Fetal alcohol spectrum disorders and cognitive functions of young children. *Rev. Neurosci.* 25, 631–639.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47–67.
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D., Mulligan, R.C. (1993) Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest.* 92, 2746-55.
- Chandler, C.M., Overton, J.S., Rüedi-Bettschen, D., and Platt, D.M. (2017). GABAA receptor subtype mechanisms and the abuse-related effects of ethanol: genetic and pharmacological evidence. *Handb. Exp. Pharmacol.*
- Dailey, M.E., and Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16, 2983–2994.
- Girault, V., Gilard, V., Marguet, F., Lesueur, C., Hauchecorne, M., Ramdani, Y., Laquerrière, A., Marret, S., Jégou, S., Gonzalez, B.J. (2017). Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis.* 8, e2610.
- Haghighi Poodeh, S., Alhonen, L., Salonurmi, T., and Savolainen, M.J. (2014). Ethanol-induced impairment of polyamine homeostasis – A potential cause of neural tube defect and intrauterine growth restriction in fetal alcohol syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 173–178.
- Halliday, J.L., Muggli, E., Lewis, S., Elliott, E.J., Amor, D.J., O’Leary, C., Donath, S., Forster, D., Nagle, C., Craig, J.M. (2017). Alcohol consumption in a general antenatal population and child neurodevelopment at 2 years. *J. Epidemiol. Community Health* 71, 990–998.

- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
- Inada, H., Watanabe, M., Uchida, T., Ishibashi, H., Wake, H., Nemoto, T., Yanagawa, Y., Fukuda, A., and Nabekura, J. (2011). GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PloS One* 6, e27048.
- Jégou, S., El Ghazi, F., de Lendeu, P.K., Marret, S., Laudenbach, V., Uguen, A., Marcorelles, P., Roy, V., Laquerrière, A., and Gonzalez, B.J. (2012). Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann. Neurol.* 72, 952–960.
- Jin, R., Yang, G., and Li, G. (2010). Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol. Dis.* 38, 376–385.
- Jones, K.L., and Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet Lond. Engl.* 302, 999–1001.
- Kable, J.A., and Mukherjee, R.A.S. (2017). Neurodevelopmental disorder associated with prenatal exposure to alcohol (ND-PAE): a proposed diagnostic method of capturing the neurocognitive phenotype of FASD. *Eur. J. Med. Genet.* 60, 49–54.
- Korpi, E.R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D.J., Hyytiä, P., and Dawe, G.S. (2015). Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004.
- Lecuyer, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., and Gonzalez, B.J. (2017). PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 44.
- Legros, H., Launay, S., Roussel, B.D., Marcou-Labarre, A., Calbo, S., Catteau, J., Leroux, P., Boyer, O., Ali, C., Marret, S. (2009). Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1146–1158.
- Liu Z, Li N, Diaz LA, Shipley M, Senior RM, Werb Z. (2005) Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease. *J Clin Invest.* 115, 879-887.
- Liu, Q.H., Wang, Y., Yong, H.M., Hou, P.-F., Pan, J., Bai, J., and Zheng, J.N. (2017). XRCC1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis through suppressing MMP-2 and MMP-9. *Oncotarget* 8, 109382–109392.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 780–790.
- Matsushita, S., and Higuchi, S. (2017). Review: use of asian samples in genetic research of alcohol use disorders: genetic variation of alcohol metabolizing enzymes and the effects of acetaldehyde. *Am. J. Addict.* 26, 469–476.

- Miyoshi, G., and Fishell, G. (2011). GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 21, 845–852.
- Nimitvilai, S., Lopez, M.F., Mulholland, P.J., and Woodward, J.J. (2017). Ethanol dependence abolishes monoamine and GIRK (Kir3) channel inhibition of orbitofrontal cortex excitability. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1800–1812.
- Oliva, A.A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., and Swann, J.W. (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3354–3368.
- Omouendze, P.L., Henry, V.J., Porte, B., Dupré, N., Carmeliet, P., Gonzalez, B.J., Marret, S., and Leroux, P. (2013). Hypoxia-ischemia or excitotoxin-induced tissue plasminogen activator-dependent gelatinase activation in mice neonate brain microvessels. *PloS One* 8, e71263.
- Ould-Yahoui, A., Sbai, O., Baranger, K., Bernard, A., Gueye, Y., Charrat, E., Clément, B., Gignes, D., Dive, V., Girard, S.D. (2013). Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant.* 22, 993–1010.
- Ozer, E., Sarioglu, S., and Güre, A. (2000). Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropathol.* 19, 21–25.
- Pons-Vázquez, S., Gallego-Pinazo, R., Galbis-Estrada, C., Zanon-Moreno, V., Garcia-Medina, J.J., Vila-Bou, V., Sanz-Solana, P., and Pinazo-Durán, M.D. (2011). Combined pre- and postnatal ethanol exposure in rats disturbs the myelination of optic axons. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 46, 514–522.
- Riley, E.P., Infante, M.A., and Warren, K.R. (2011). Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol. Rev.* 21, 73–80.
- Rubert, G., Miñana, R., Pascual, M., and 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, 483–496.
- Shenoda, B.B. (2017). An overview of the mechanisms of abnormal GABAergic interneuronal cortical migration associated with prenatal ethanol exposure. *Neurochem. Res.* 42, 1279–1287.
- Skorput, A.G.J., Gupta, V.P., Yeh, P.W.L., and Yeh, H.H. (2015). Persistent interneuronopathy in the prefrontal cortex of young adult offspring exposed to ethanol in utero. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 10977–10988.
- Southwell, D.G., Paredes, M.F., Galvao, R.P., Jones, D.L., Froemke, R.C., Sebe, J.Y., Alfaro-Cervello, C., Tang, Y., Garcia-Verdugo, J.M., Rubenstein, J.L. (2012). Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491, 109–113.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5803–5813.

- Tsai, H.-H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A.-C., Kuo, C.J., Chan, J.R., Daneman, R. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379–384.
- Vaillant, C., Meissirel, C., Mutin, M., Belin, M.-F., Lund, L.R., and Thomasset, N. (2003). MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 395–408.
- Vemuri, M.C., and Chetty, C.S. (2005). Alcohol impairs astroglialogenesis by stem cells in rodent neurospheres. *Neurochem. Int.* 47, 129–135.
- Wang, G., Zhong, S., Zhang, S., Ma, Z., Chen, J., Lu, W., Cheng, X., Chuai, M., Lee, K.K.H., Lu, D. (2016). Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J. Appl. Toxicol. JAT* 36, 692–701.
- Wilhelm, C.J., and Guizzetti, M. (2015). Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 65.
- Won, C., Lin, Z., Kumar T, P., Li, S., Ding, L., Elkhal, A., Szabó, G., and Vasudevan, A. (2013). Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat. Commun.* 4, 2149.
- Xiang, Y., Kim, K.-Y., Gelernter, J., Park, I.-H., and Zhang, H. (2015). Ethanol upregulates NMDA receptor subunit gene expression in human embryonic stem cell-derived cortical neurons. *PloS One* 10, e0134907.
- Xu, G., Broadbelt, K.G., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Belliveau, R.A., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., and Kinney, H.C. (2011). Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 841–858.
- Yalcin, E.B., McLean, T., Tong, M., and de la Monte, S.M. (2017). Progressive white matter atrophy with altered lipid profiles is partially reversed by short-term abstinence in an experimental model of alcohol-related neurodegeneration. *Alcohol Fayettev. N* 65, 51–62.
- Yeh, C.-M., Lin, C.-W., Yang, J.-S., Yang, W.-E., Su, S.-C., and Yang, S.-F. (2016). Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. *Oncotarget* 7, 21952–21967.
- Zhao, Y., Ren, H., Dwyer, D.S., and Peoples, R.W. (2015). Different sites of alcohol action in the NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunits. *Neuropharmacology* 97, 240–250.



## Figure legends

### Figure 1. Effect of acute ethanol treatment on the MMP-9 activity in P2 cortical slices.

**A:** Quantification by gel zymography of MMP-9 activity in extracts from microdissected cortices exposed for three hours to aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M; Glut) and ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. **B,C:** Visualization of DQ-gelatin-FITC activity by *in situ* zymography performed in cultured cortical slices at P2 (B). The labeling of endothelial cells with isolectin-TRITC indicates that the gelatinase activity is closely associated to cortical microvessels from the pial migratory route (C). **D:** Time-lapse quantification of DQ-gelatin-FITC proteolysis in P2 cortical slices exposed for 3 hours to aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M; Glut) and ethanol (50 mM; Eth) alone or co-incubated. For gel zymography experiments,  $^{**}p < 0.01$  vs control and  $^{\#}p < 0.01$  vs Glut using one way ANOVA followed by a Tukey post-test. For *in situ* zymography experiments,  $^{**}p < 0.01$  vs control and  $^{\#}p < 0.01$  Glut+ Ethanol vs glutamate.

### Figure 2. Effect of acute glutamate and ethanol treatments on the tPA and MMP-9 endothelial activities in P2 cortical slices from wild type and tPA knock-out mice. A:

Graphical illustration of the tPA-dependent mechanism leading to MMP-9 activation and animal strains used for *in situ* transposition on cultured cortical slices. **B:** Quantification by gel zymography of the effect of glutamate (100  $\mu$ M; Glut) on MMP-9 activity in wild type (WT) and tPA<sup>-/-</sup> mice. tPA zymography blots were used as a negative control. **C-E:** Visualization of DQ-casein-FITC activity (C) by *in situ* zymography performed in cultured cortical slice at P2. Co-labeling with isolectin-TRITC (D) indicates that the tPA-like activity is closely associated to the pial vasculature (arrowheads) and radial microvessels from the superficial cortical layers (arrows; E). **F,G:** Time-lapse quantification of DQ-casein-FITC proteolysis in P2 cortical slices from WT (F) and tPA<sup>-/-</sup> (G) mice exposed for 3 hours to aCSF (Ctrl), glutamate (100  $\mu$ M; Glut) and ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. For, gel zymography experiments  $^{***}p < 0.001$

vs WT control using a t test. For *in situ* zymography experiments, ### $p < 0.001$  Glut+ Ethanol vs glutamate using two way ANOVA followed by a Bonferroni post-test.

**Figure 3. Effect of acute alcohol treatment on intracellular calcium mobilization in cultured endothelial cells from neonatal cortical microvessels.** **A:** Triple fluorescent labeling visualizing GluN1 subunit immunoreactivity (green puncta) in an isolated cortical microvessel from P2 neonates. Endothelial cells are labelled with CD31 antibodies. Nuclei are visualized with Hoechst. **B:** Triple fluorescent labeling visualizing GluN1 subunit immunoreactivity (green puncta) in cultured endothelial cells obtained from P2 cortical microvessels. Endothelial cells are labelled with CD31 antibodies. Nuclei are visualized with Hoechst. **C:** Visualization of cultured endothelial cells obtained from P2 cortical microvessels and loaded with the ratiometric probe Fura-2. **D:** Visualization of the 340-380 ratio change representatives of intracellular calcium mobilization after exposure to glutamate (200  $\mu$ M; Glut) and ethanol (50 mM; Eth) alone or associated. \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs control and #### $p < 0.0001$  vs glutamate using one way ANOVA followed by a Tukey post-test.

**Figure 4. Effect of chronic alcohol exposure on glutamate-induced calcium mobilization and MMP-9 endothelial activity.** **A:** Typical calcium mobilization curves quantified in the superficial cortical layers after treatment of P2 cortical slices from control and chronic *in utero* alcohol-exposed neonates with glutamate (100  $\mu$ M). Pregnant mice received a daily injection of alcohol (3 g/Kg) from GD15 to GD20. **B:** Statistical analysis of the glutamate-induced calcium mobilization in the superficial cortical layers of P2 slices from control and chronic *in utero* alcohol-exposed neonates. Note that *in utero* alcohol exposure exacerbates the glutamate-induced calcium mobilization. **C-E:** Quantification by Western blot of the effect of *in utero* alcohol exposure from ED15 to ED20 on the cortical expression of GluN1 (C), GluN2A (D)

and GluN2B (E) subunits in microdissected cortices from P2 neonates. **F-G:** Quantification by *in situ* zymography of the effect of glutamate (100  $\mu$ M) on the endothelial MMP9-like activity in microvessels from the pial migratory route of control and chronic *in utero* alcohol-exposed neonates. For calcimetry experiments, \*\* $p < 0.01$  vs control using the Mann-Whitney test. For Western blot experiments, \*\* $p < 0.01$  vs control using the unpaired t test. For *in situ* zymography experiments, ### $p < 0.001$  glutamate + ethanol vs glutamate using two way ANOVA followed by a Bonferroni post-test.

**Figure 5. Effect of *in utero* alcohol exposure on the density and the spine morphology of Gad67-GFP GABAergic interneurons. A,B:** Visualization of the positioning of Gad67-GFP-positive neurons in the superficial layers of the developing cortex from P15 neonates. Pregnant mice were treated with NaCl (9‰; Ctrl; A) or alcohol (3g/Kg; B) from GD15 to GD20. **C:** Quantification of the density of Gad67-GFP neurons in the cortical layers II-IV of P15 neonates exposed or not to alcohol during their fetal life. **D-F:** Quantification by Western blot of GFP (D), Dlx-1 (E) and SSt (F) protein levels in microdissected cortices from P15 neonates exposed or not to alcohol during pregnancy. **G,H:** Distribution of spine subtypes (G) and quantification of spine density (H) in superficial cortical layers from P15 neonates exposed or not to alcohol during pregnancy. Morphometric analysis was performed by confocal acquisition and 3D Imaris reconstruction. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control using unpaired t test.

**Supplementary Figure 1. Effect of acute ethanol treatment on caspase-3 activation in ganglionic eminences from E15 cultured slices. A-C:** Immunohistochemistry visualizing the basal cleaved caspase-3 immunolabeling observed in E15 brain slices in control conditions after 3 hours of culture in aCSF (A). The dotted square indicates the ganglionic eminence region visualized at higher magnification (B,C). Immunoreactivity was cytoplasmic (arrows) or

associated with fragmented cells (arrowhead). **D:** Time-course quantification by Western blot of the caspase-3 cleavage in microdissected ganglionic eminences exposed to aCSF in absence or presence of ethanol (50 mM). Ketamine (100  $\mu$ M) was used as a positive control. **E:** Time-course quantification of the caspase-3-like activity in microdissected ganglionic eminences exposed to aCSF in absence or presence of ethanol (50 mM). Ketamine (100  $\mu$ M) was used as a positive control. For each experiment (Western blot and caspase activity) the contra hemi-slice was used as control of the treated hemi-slice. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control hemi-slice using paired t test.



**Supplementary Table 1** Origin and characteristics of the primary antibodies used for the immunohistochemical and Western blot studies performed in mouse tissues.

<b>Antibodies</b>	<b>Trade reference</b>	<b>Purified species</b>	<b>Supplier</b>	<b>Dilution</b>	<b>Solution of incubation</b>
Cleaved caspase-3	IHC, WB: 9661L	Rabbit	Cell Signaling	IHC: 1/400 WB: 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X100 in PBS WB: Milk (5% TBST)
Dlx1	WB: ab111202	Rabbit	Abcam	1/1000	Milk (5% TBST)
GFP	WB: Ab6673	Goat	Abcam	1/1000	Milk (5% TBST)
GluN1	IHC, WB: sc1467	Goat	Santa Cruz	IHC: 1/400 WB: 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X100 in PBS WB: Milk (5% TBST)
GluN2A	WB: sc31540	Goat	Santa Cruz	WB: 1/1000	Milk (5% TBST)
GluN2B	WB: sc1468	Goat	Santa Cruz	WB: 1/1000	Milk (5% TBST)
Somatostatin	WB: SC13099	Rabbit	Santa Cruz	1/1000	BSA (5% TBST)
$\beta$ -Actin	WB: A5441	Mouse	Sigma-Aldrich	1/5000	Milk (5% TBST)

**Supplementary Table 2** Statistical analysis

<b>Experiments</b>	<b>Test</b>	<b>n independents experiments</b>	<b>p value</b> *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001
Gel zymography Effect of EtOH on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 1A)	One way ANOVA Tukey post-test	n=8	ANOVA F 15.1 p<0.0001*** Tukey post-test Ctrl vs Glut p=0.0011** Glut vs Glut+EtOH p=0.0022##
<i>In situ</i> zymography Effect of glutamate and EtOH on MMPs activity on P2 slices (Fig. 1D)	Two way ANOVA Bonferroni post-test	n=13 (Ctrl and Glut) n=4 (EtOH) n=5 (Glut + EtOH)	ANOVA Interaction F 0.5707 p=0.9792, ns Treatment F 22.26 p<0.0001**** Time F 8.782 p<0.0001**** Bonferroni post-test For t=180 min Glut vs Ctrl p<0.01** Glut + EtOH vs Glut p<0.01##
Gel zymography Effect of glutamate on MMP9 activity in Wild Type mice (Fig. 2B, left panel)	Unpaired t test	n= 3	Ctrl vs Glut, p = 0.0006****
Gel zymography Effect of glutamate on MMP9 activity in KO t-PA mice (Fig. 2B, right panel)	Unpaired t test	n= 3	Ctrl vs Glut, p = 0.5114, ns
<i>In situ</i> zymography Effect of glutamate and EtOH on casein activity on WT mice (Fig. 2F)	Two way ANOVA Bonferroni post-test	n=7 (Ctrl) n=8 (Glut) n=5 (EtOH, EtOH + Glut)	ANOVA Interaction F 0.6615 p=0.9325, ns Treatment F 52.62 p<0.0001**** Time F 8.300 p<0.0001****  Bonferroni post-test For t=180 min Glut vs Glut + EtOH p<0.001###

<p><i>In situ</i> zymography Effect of glutamate and EtOH on MMP activity on KO tPA mice (Fig. 2G)</p>	<p>Two way ANOVA Bonferroni post-test</p>	<p>n=5 (Ctrl, EtOH) n=6 (Glut, EtOH + Glut)</p>	<p>ANOVA Interaction F 0.1418 p=1.000, ns Treatment F 2.055 p=0.1069, ns Time F 4.668 p&lt;0.0001****  Bonferroni post-test No statistical differences</p>
<p>Calciometry on endothelial cells (Fig.3E)</p>	<p>One way ANOVA Tukey post-test</p>	<p>n=3 mean value of 30 cells (10 cells per experiment from 3 independent experiments)</p>	<p>ANOVA F 421 p&lt;0.0001*** Tukey post-test Ctrl vs Glut p&lt;0.0001**** Glut vs Glut+EtOH p&lt;0.0001####</p>
<p>Calciometry on P2 slices (Fig.4B)</p>	<p>Mann-Whitney test</p>	<p>n=10 (Ctrl) n=7 ( <i>in utero</i> EtOH)</p>	<p>Ctrl vs <i>in utero</i> EtOH p=0.0136**</p>
<p>Western blot GluN1 P2 (Fig. 4C)</p>	<p>Unpaired t test</p>	<p>n=3 (11 samples from 3 independent offspring)</p>	<p>Ctrl vs EtOH p=0.0051 **</p>
<p>Western blot GluN2A P2 (Fig. 4D)</p>	<p>Unpaired t test</p>	<p>n=3 (11 samples from 3 independent offspring)</p>	<p>Ctrl vs EtOH p=0.3553, ns</p>
<p>Western blot GluN2B P2 (Fig. 4E)</p>	<p>Unpaired t test</p>	<p>n=3 (11 samples from 3 independent offspring)</p>	<p>Ctrl vs EtOH p=0.17, ns</p>
<p><i>In situ</i> zymography Effect of glutamate on MMPs activity (control group) (Fig. 4F)</p>	<p>Two way ANOVA Tukey post-test</p>	<p>n=14 (Ctrl) n=16 (Glut)</p>	<p>ANOVA Interaction F 5.085 p&lt;0.0001*** Treatment F 136 p&lt;0.0001*** Time F 59.65 p&lt;0.0001***  Bonferroni post-test From t=120 to t=180 min Ctrl vs Glut p&lt;0.001***</p>



<i>In situ</i> zymography Effect of EtOH <i>in utero</i> treatment on MMPs activity (Fig. 4G)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=2	n value should be increased for statistical analysis
Density of GFP positive cells in Gad67-GFP mice (Fig.5C)	Unpaired t test	n=8 (males) n=9 (females)	Ctrl males vs EtOH males p=0.0499* Ctrl females vs EtOH females p=0.0947, ns Ctrl vs EtOH p=0.0139*
Western blot GFP in Gad67-GFP mice (Fig. 5D)	Unpaired t test	n=9 (males) n=9 (females)	Ctrl males vs EtOH males p=0.0244* Ctrl females vs EtOH females p=0.0535, ns Ctrl vs EtOH p=0.0025**
Western blot Dlx1 in Gad67-GFP mice (Fig. 5E)	Unpaired t test	n=6 (males) n=7 (females)	Ctrl males vs EtOH males p=0.0278* Ctrl females vs EtOH females p=0.3658, ns Ctrl vs EtOH p=0.0403*
Western blot Somatostatin in Gad67-GFP mice (Fig. 5F)	Unpaired t test	n=15 (males) n=15(females)	Ctrl males vs EtOH males p=0.5977, ns Ctrl females vs EtOH females p=0.3912, ns Ctrl vs EtOH p=0.2361, ns
Spine density in Gad67GFP mice (Fig. 5H)	Unpaired t test	n =20 fibers analyzed from 3 animals	Ctrl vs EtOH p=0.0013**
Western blot Cleaved caspase-3 (Suppl Fig. 1D)	Paired t test – Wilcoxon test	n=5 (3h and 6h) n=2 (24h Eth) n=4 (24h Ket)	Ctrl vs EtOH 3 hours p>0.9999, ns Ctrl vs EtOH 6 hours p=0.5381, ns Ctrl vs Ket 24 hours p= 0.0007***
Caspase-3 activity (Suppl Fig 1E)	Paired t test – Wilcoxon test	n=4 (0h) n=15 (3h and 6h Eth) n=12 (24h Eth) n=10 (24h ket)	Ctrl vs EtOH 0 hours p=0.8750, ns Ctrl vs EtOH 3 hours p=0.7197, ns Ctrl vs EtOH 6 hours p=0.1205, ns Ctrl vs EtOH 24 hours p=0.3804, ns Ctrl vs Ket 24 hours p=0.0378*

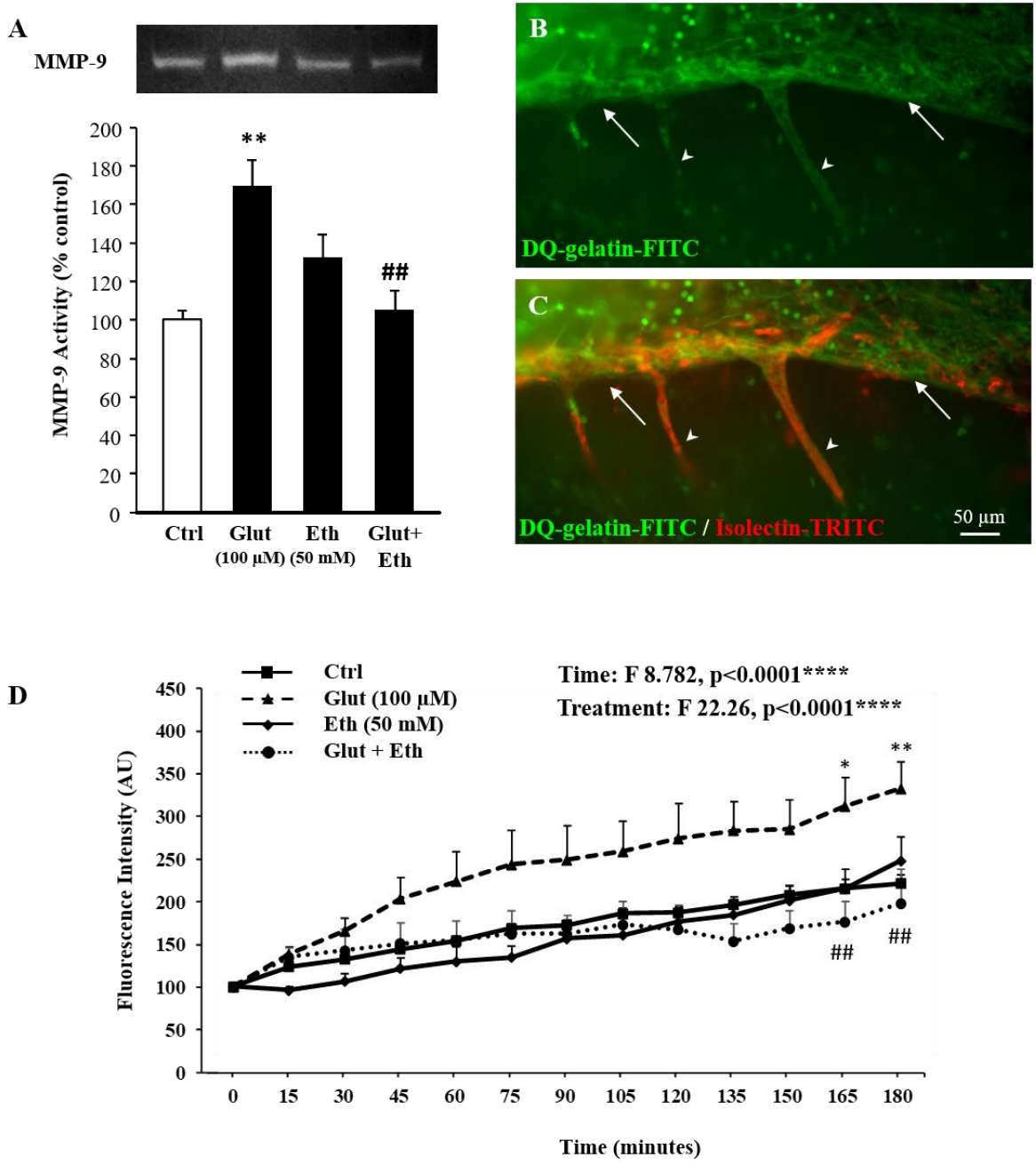


Figure 1 Léger et al.

RESULTATS

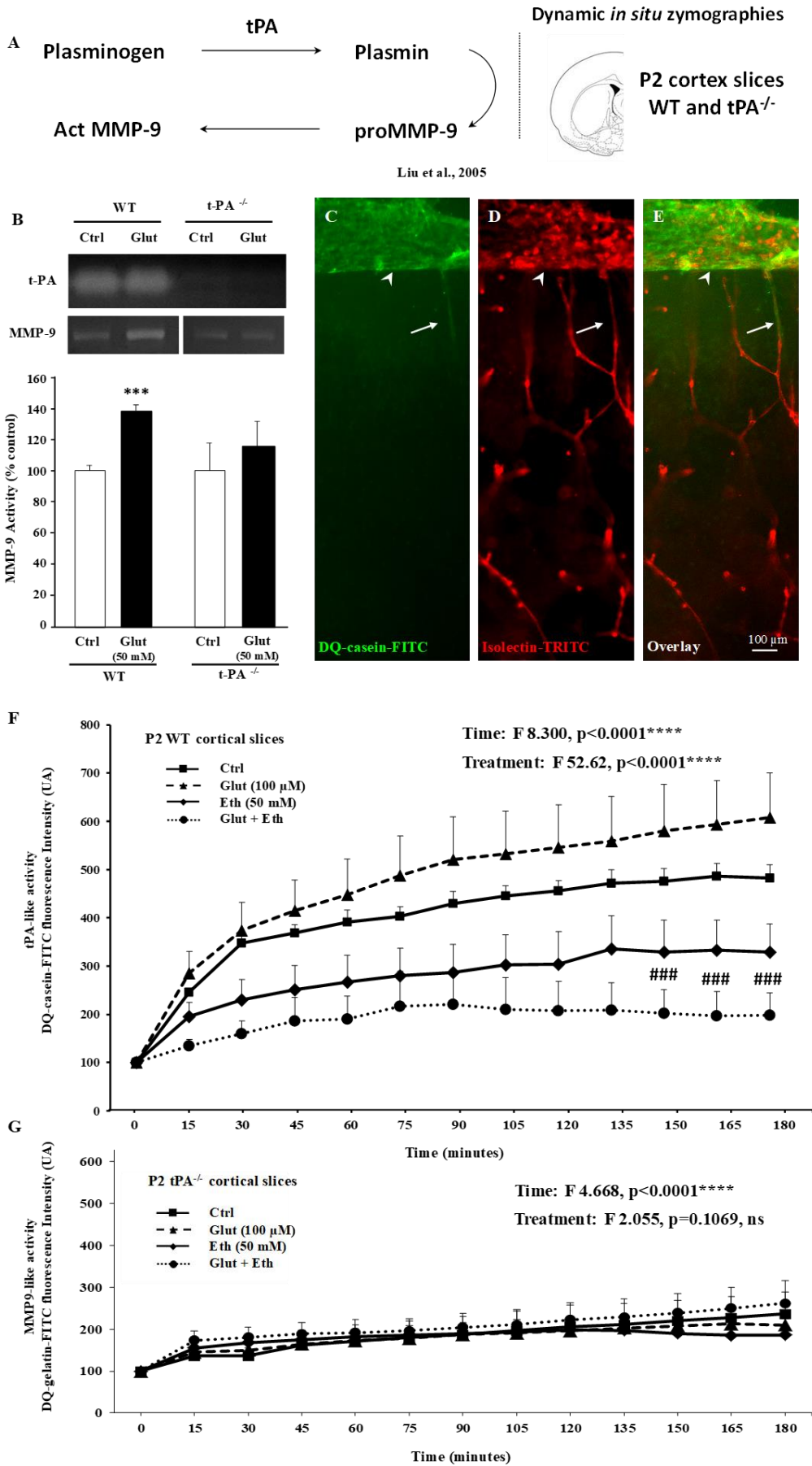


Figure 2 Léger et al.

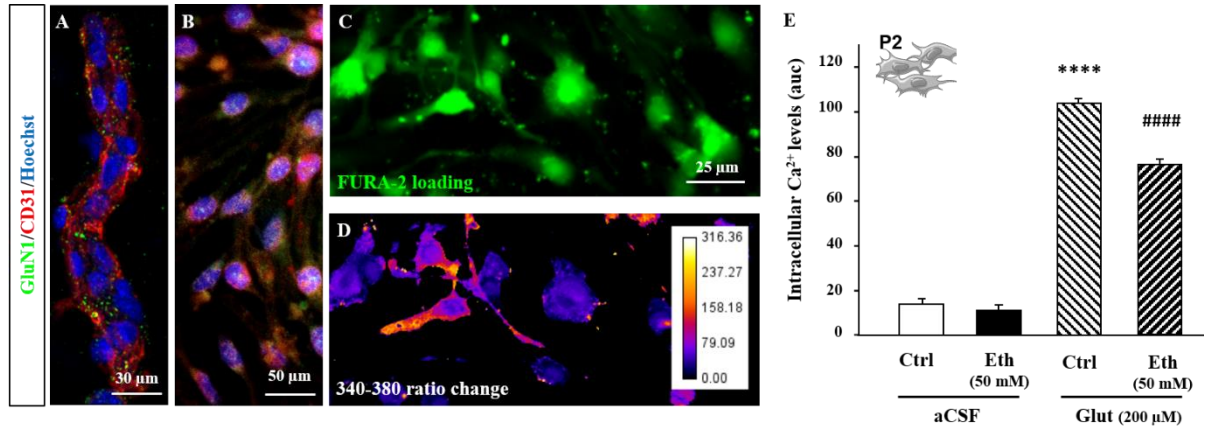


Figure 3 Léger et al.

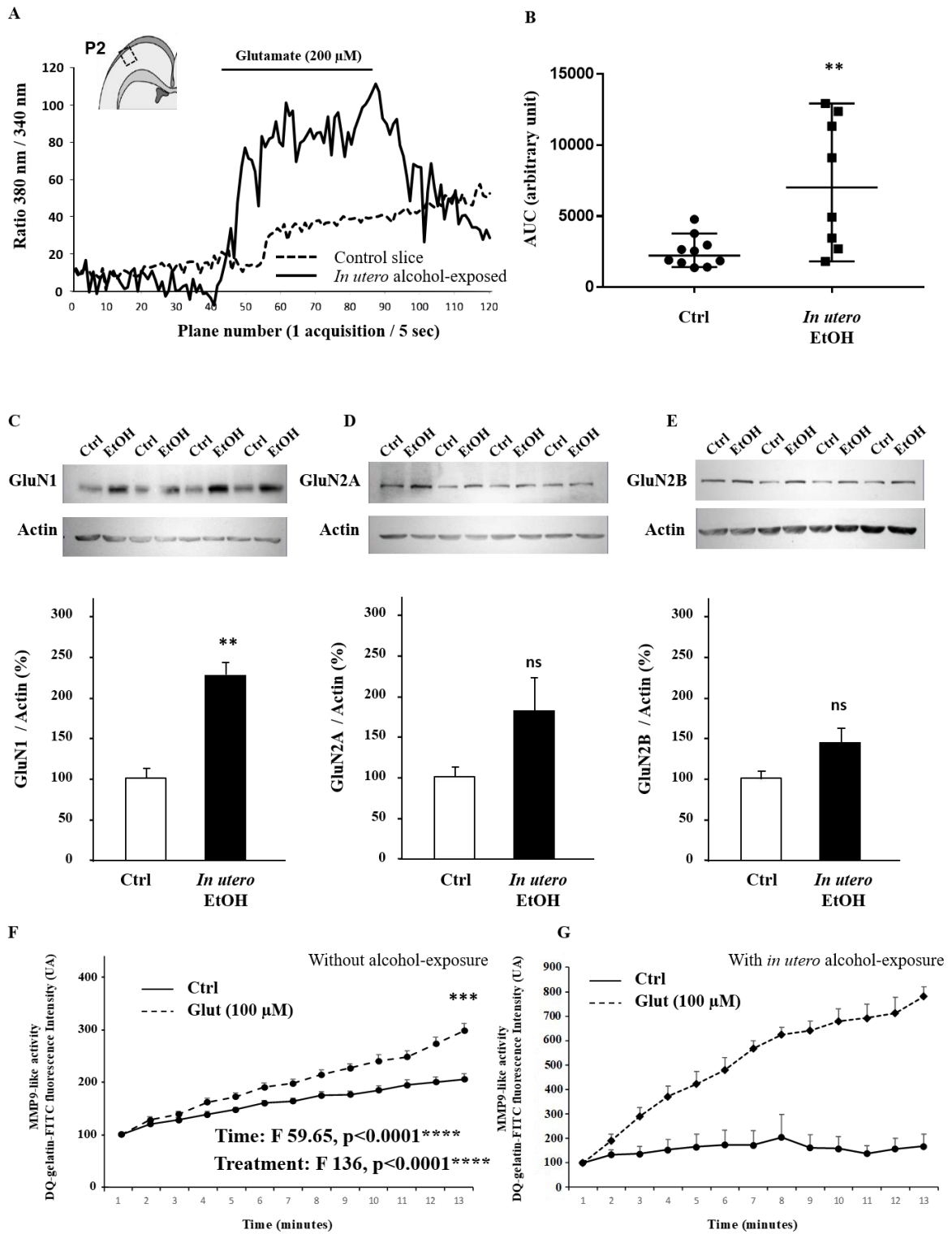


Figure 4 Léger et al.

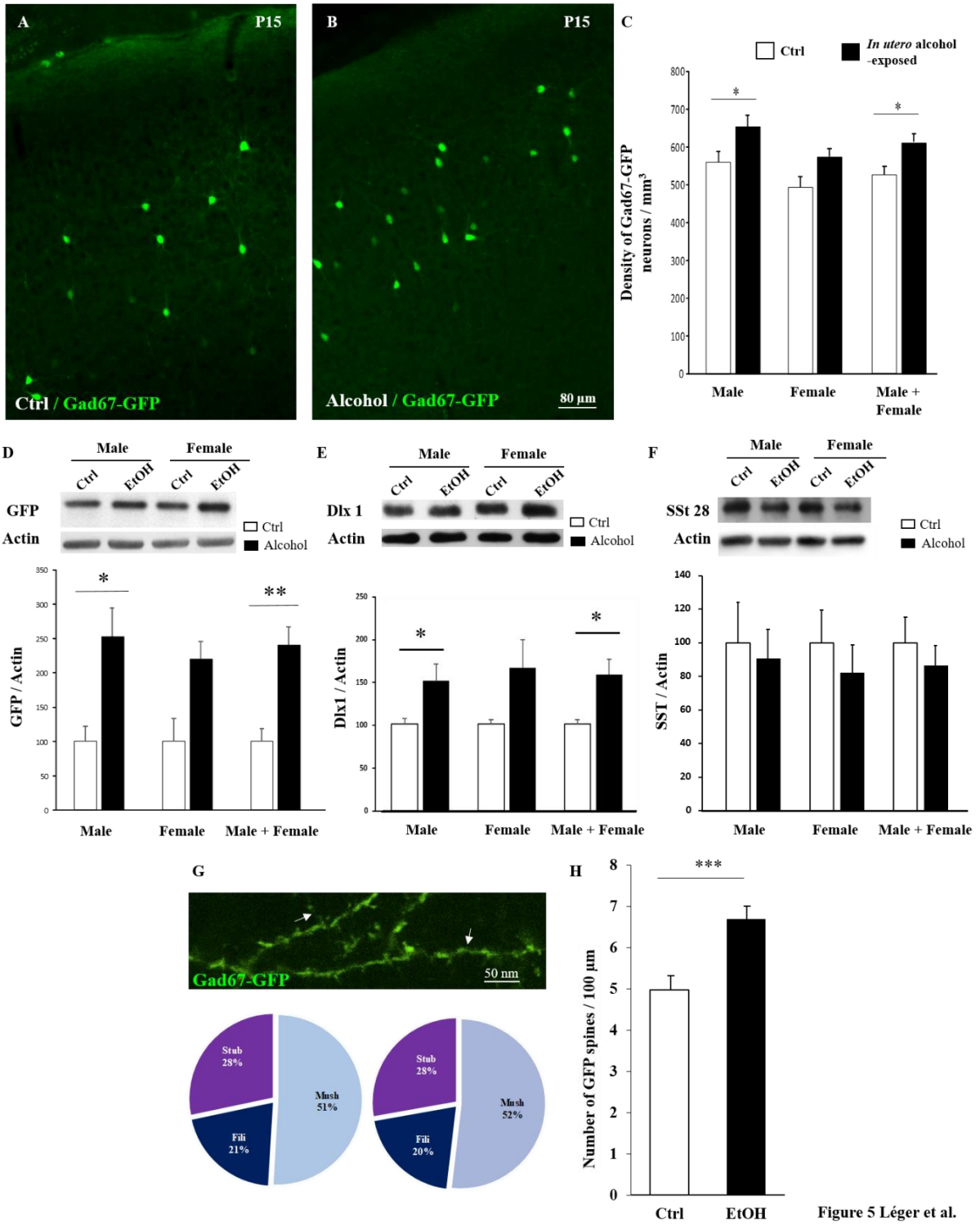
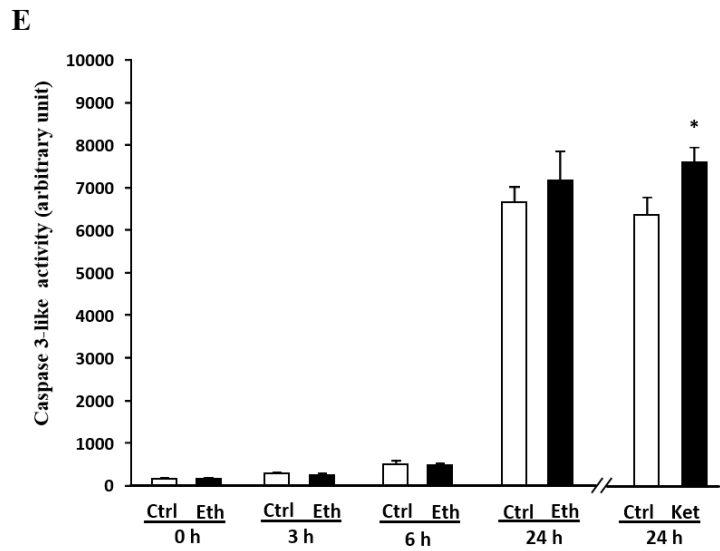
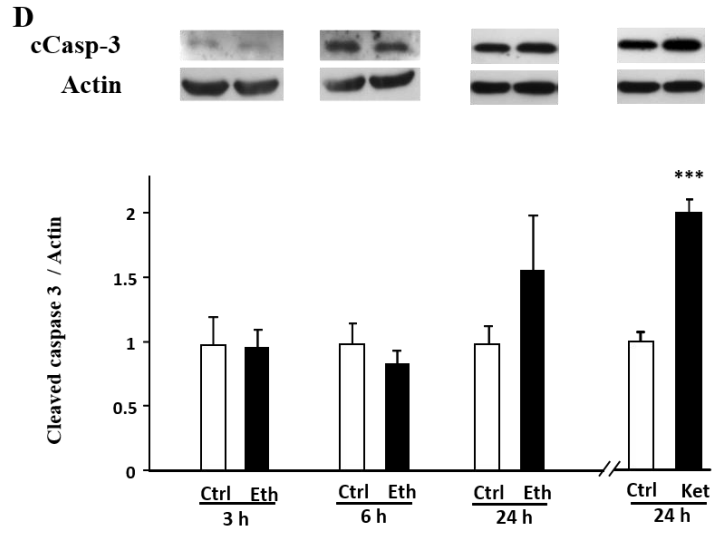
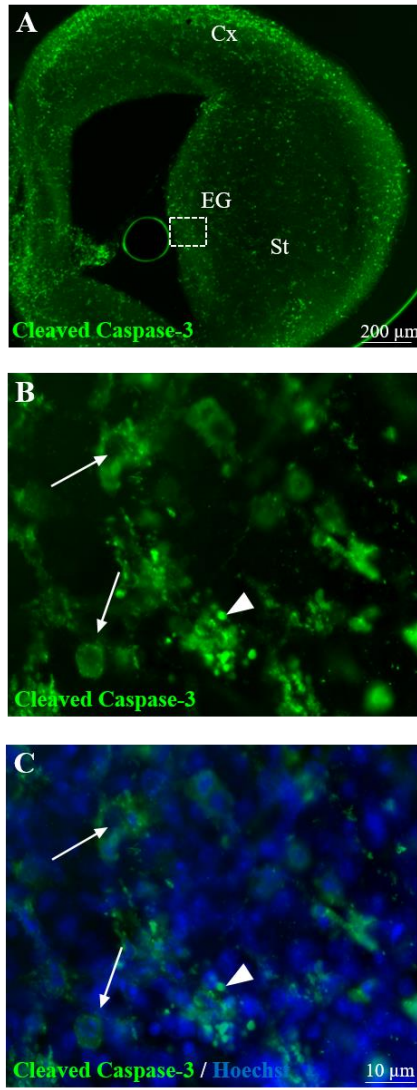


Figure 5 Léger et al.



Supplementary Figure 1 Léger et al.

---

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---



-

### **Etude 1 : Le glutamate contrôle la migration des interneurones GABAergiques dans la voie de migration piale *via* des protéases endothéliales et le récepteur NMDA**

Dans cet article, nous avons émis l'hypothèse que le glutamate pourrait avoir un rôle dans la migration de la population GABAergique corticale *via* un effet sur le récepteur NMDA endothélial et sur la sécrétion de protéases vasculaires. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mis en place différents protocoles sur des souris transgéniques (Gad67-GFP ; Gad67-GFP/tPA<sup>-/-</sup>) afin de répondre à divers objectifs :

- Caractériser l'existence d'une zone vasculaire interagissant avec les interneurones GABAergiques en migration par immunohistochimie sur des tranches organotypiques au stade P2
- Rechercher un éventuel effet du glutamate sur les activités MMP et tPA par zymographie sur gel et *in situ* sur des tranches organotypiques au stade P2
- Etudier l'effet du glutamate sur la migration tangentielle et radiale des neurones en interactions avec la voie de migration piale vasculaire par des expériences de vidéomicroscopie
- Etudier les effets d'une invalidation du gène du tPA ou d'une administration *in vivo* d'un inhibiteur de MMPs sur la mise en place des interneurones GABAergiques.

#### *La migration vasculo-dépendante des interneurones GABAergiques*

De nombreux articles suggèrent qu'une exposition anténatale du cerveau immature à des antagonistes du récepteur NMDA, comme la kétamine (un anesthésique pédiatrique) ou encore le MK801, serait délétère pour la survie des interneurones GABAergiques immatures (Aligny *et al.*, 2014; Bhutta, 2007; Roux *et al.*, 2015). Les récents travaux du groupe de Vasudevan ont permis de démontrer de fortes interactions entre le réseau vasculaire et les neurones GABAergiques en migration (Won *et al.*, 2013a). Ainsi, pendant le neurodéveloppement, les microvaisseaux cérébraux vont former deux voies indispensables à la mise en place de l'innervation neuronale corticale : une voie piale ou superficielle et une voie périventriculaire ou profonde. Les vaisseaux constituant la voie piale se mettent en place à partir de E9 tandis que ceux de la voie périventriculaire, plus tardifs, se mettent en place à

partir de E11 (Vasudevan and Bhide, 2008). Ces deux réseaux vasculaires contribuent à la migration des neurones GABAergiques en servant de support physique et en sécrétant des facteurs de guidance. Chez l'Homme comme chez le Rongeur, les neurones GABAergiques migrent le long de la voie de migration piale de la fin de gestation jusqu'en période postnatale (Xu *et al.*, 2011). En effet, les interneurones originaires des éminences ganglionnaires médianes (EGM) et latérales (EGL) vont migrer de manière tangentielle dans un premier temps et ensuite finir leur migration de manière radiale pour coloniser la plaque corticale (Miyoshi and Fishell, 2011). Plus précisément, les interneurones issus des EGM sont générés plus précocement (E9.5-E15.5) par rapport à ceux issus des EGL (E12.5-E18.5) (Miyoshi and Fishell, 2011). Ces deux types de précurseurs neuronaux vont également aller coloniser des couches corticales différentes. En effet, les interneurones issus des EGM vont coloniser le cortex de manière « *inside-out* » et vont préférentiellement coloniser les couches corticales profondes V et VI alors que ceux dérivant des EGL vont coloniser préférentiellement les couches superficielles de manière « *outside-in* » (Miyoshi and Fishell, 2011). Il a été démontré que 75 % des interneurones corticaux des couches superficielles dérivent des éminences ganglionnaires et que ces interneurones étaient générés après les neurones pyramidaux excitateurs (Miyoshi and Fishell, 2011).

Dans un premier temps, les expériences de marquage immunohistochimique du réseau vasculaire à P2 ont été réalisées dans le but de caractériser la voie de migration piale des interneurones GABAergiques. En effet, bien que le caractère vasculo-dépendant de la migration des interneurones GABAergiques générés au niveau des éminences ganglionnaires ait été démontré (Won *et al.*, 2013a), les mécanismes moléculaires ainsi que les interactions cellulaires impliqués ont été peu étudiés. Nos résultats démontrent l'existence d'une structure vasculaire tangentielle située au niveau des couches superficielles II-IV corticales et bordée par des astrocytes. Les résultats obtenus montrent que des neurones immatures en cours de migration et exprimant la doublecortine sont étroitement liés à la zone vasculaire identifiée dans notre étude. De plus, ces cellules visualisées en bordure de cette zone vasculaire expriment également le GABA suggérant une étroite interaction entre cette zone vasculaire tangentielle et les neurones GABAergiques en migration. De plus, il a été démontré que l'inactivation du VEGF endothélial altérerait négativement l'angiogenèse ainsi que la mise en

place du réseau GABAergique, renforçant ainsi la contribution vasculaire à la migration des neurones GABAergiques (Li *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces données suggère donc qu'il existe une voie de migration vasculaire encore active deux jours après la naissance chez la souris. Ces résultats sont en accord avec la description de neurones GABAergiques dont la mise en place est tardive chez l'Homme. Ils permettent également d'étayer le fait que l'utilisation d'antagonistes NMDA en période périnatale présente des effets délétères qui ciblent préférentiellement les couches superficielles du néocortex.

### II Les facteurs régulant la migration

Il a été démontré que le profil développemental du système vasculaire est superposable à celui du réseau neuronal et que la migration des précurseurs endothéliaux précède de 24 heures celle des neuroblastes (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Vasudevan and Bhide, 2008). Il existe d'autres voies de migration cellulaire vasculo-dépendante comme par exemple la voie de migration des précurseurs neuronaux vers les bulbes olfactifs à l'âge adulte (Snappyan *et al.*, 2009) ou encore la voie de migration des oligodendrocytes pendant le neurodéveloppement (Tsai *et al.*, 2016). Au niveau moléculaire, il a été démontré que les cellules endothéliales du réseau vasculaire sécrètent des molécules chémoattractives comme le BDNF, le NT4 ou encore l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et chémorépulsives comme les Sémaphorines 3, permettant ainsi le guidage et l'orchestration de la migration des cellules (Marín and Rubenstein, 2003). Il a été également décrit que les astrocytes jouent un rôle important pendant la migration en captant et relargant certaines molécules chémoattractives ou répulsives et en servant de bordure physique aux voies de migration (Snappyan *et al.*, 2009).

De plus, la migration des neurones GABAergiques requiert une relation étroite avec les cellules pyramidales excitatrices (Ciceri *et al.*, 2013). Par exemple, de récents travaux suggèrent que la neuréguline 3, exprimée par les cellules pyramidales excitatrices, agit comme un facteur chémoattractif pendant la migration des interneurons GABAergiques (Bartolini *et al.*, 2017). Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux relations entre les cellules endothéliales, les cellules pyramidales et les précurseurs GABAergiques pendant leur migration. Il a été récemment démontré au sein du laboratoire que les cellules endothéliales

de souriceaux nouveau-nés présentent un phénotype particulier, exprimant notamment à haut niveau des récepteurs NMDA fonctionnels (Henry *et al.*, 2013; Legros *et al.*, 2009; Porte *et al.*, 2017). Parallèlement, en condition pathologique comme après un AVC, le glutamate a été montré comme exacerbant la libération et les activités des protéases endothéliales MMP (Michaluk and Kaczmarek, 2007) et tPA (Cassé *et al.*, 2012; Gaberel *et al.*, 2013).

Il est maintenant bien établi que dans le cerveau mature, de nombreux neurotransmetteurs sont libérés au niveau synaptique permettant la communication entre les neurones (Ruediger and Bolz, 2007). Cependant, au cours du neurodéveloppement, la libération de neurotransmetteurs est indispensable et ceci, bien avant la mise en place des synapses par les cellules. A titre d'exemple, le GABA, le glutamate, l'acétylcholine, la dopamine ou encore la sérotonine ont été décrits comme participant à la croissance neuritique et la migration cellulaire chez différentes espèces. Ce rôle trophique des neurotransmetteurs dans la mise en place du cortex cérébral est moins connu et moins décrit (Ruediger and Bolz, 2007). Nous nous sommes donc intéressés aux effets trophiques du glutamate sur la migration des interneurons GABAergiques dans la voie piale vasculaire. Nous avons effectué ces travaux sur des souris transgéniques Gad67-GFP car ces souris possèdent des neurones GFP qui vont préférentiellement coloniser les couches corticales superficielles I-IV utilisant donc la voie de migration piale. Nos résultats démontrent une forte interaction entre les cellules Gad-GFP en train de migrer et le réseau microvasculaire cérébral. Des expériences de vidéotracking de ces cellules par microscopie à fluorescence ont permis de démontrer que l'ajout de glutamate était capable de stimuler à la fois la migration tangentielle et la migration radiale de ces cellules, tandis que de façon opposée, le MK801 inhibait cette migration. Tous ces résultats suggèrent que le glutamate, *via* le récepteur NMDA, régule l'activité vasculaire et contrôle ainsi la migration vasculo-dépendante des interneurons GABAergiques.

Ces résultats suggèrent alors que l'utilisation d'antagonistes du récepteur NMDA pourrait modifier le positionnement des interneurons GABAergiques. Toutefois, le récepteur NMDA étant exprimé par différents types cellulaires dans le cerveau immature, ces résultats ne permettent pas de dire si les effets du glutamate sur l'activité des MMPs endothéliales impliquent une action directe sur la cellule endothéliale ou un effet indirecte *via* un autre type cellulaire. Il serait donc intéressant de rechercher les effets d'une invalidation spécifique du

récepteur NMDA dans les cellules endothéliales sur le réseau vasculaire et sur la mise en place des interneurons GABAergiques.

### III Les MMPs et la migration

La matrice extracellulaire (MEC) est un ensemble dynamique regroupant la lame basale, les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif interstitiel servant principalement de support des parenchymes et assurant l'adhésion cellulaire et la cohésion tissulaire (Rauch, 2004). Cette structure est en constant remodelage participant à des processus physiologiques, plasticité neuronale et synaptique, mais aussi pathologiques, tels que l'invasion tumorale (Alfano *et al.*, 2016; Baeten and Akassoglou, 2011; Rauch, 2004). De plus, la MEC joue un rôle fondamental pendant les étapes de migration et de différenciation cellulaire en permettant des interactions cellulaires et des échanges de signaux *via* des molécules d'adhésion et des intégrines (Bachir *et al.*, 2017). La MEC est une structure pouvant être dégradée par les métalloprotéinases matricielles (MMP) en condition physiologique, pendant la migration cellulaire, mais aussi en condition pathologique, comme lors d'une ischémie cérébrale. La MEC participe ainsi à la régulation des grandes fonctions biologiques, à l'émergence de dommages cérébraux mais également à leur réparation (Ma *et al.*, 2016; Rozario and DeSimone, 2010). Les MMPs sont sécrétées dans la MEC sous forme de zymogène non fonctionnel et vont être activées par clivage protéolytique. Il existe une vingtaine de MMPs différentes codées par des gènes différents. Les MMPs les plus exprimées au sein du SNC sont les MMP-2 et -9 qui appartiennent à la famille des gélatinases et sont principalement sécrétées par les cellules endothéliales et en petite quantité par les astrocytes (Bednarek *et al.*, 2009; Szklarczyk *et al.*, 2002). Il a été décrit que le glutamate, *via* le récepteur NMDA, peut entraîner l'activation de ces MMPs (Ramaswamy *et al.*, 2014) en induisant la sécrétion de tPA endothélial qui va alors provoquer le clivage du plasminogène en plasmine, permettant ainsi le clivage du pro-domaine des MMPs et leur activation (Henry *et al.*, 2013; Omouendze *et al.*, 2013). Les gélatinases vont avoir un rôle de dégradation de la lame basale de la MEC, induisant un phénomène de plasticité de la MEC essentiel à la migration neuronale.

Afin de préciser, dans le cortex immature, l'impact du glutamate sur l'activation des MMPs endothéliales, nous avons réalisé des expériences de mesure des activités gélatinases de la MMP-9 et du tPA par zymographie sur gel et *in situ* sur des tranches organotypiques à P2. Des

traitements par de l'aCSF (du liquide céphalo-rachidien artificiel), du glutamate, du MK-801 (un inhibiteur du récepteur NMDA), du SB-3CT (un inhibiteur des MMPs) et/ou du PAI-1 (un inhibiteur du clivage du plasminogène en plasmine) ont été appliqués sur ces tranches pendant 3 heures avant les mesures. Premièrement, nos résultats montrent que les activités gélatinases de la MMP-9 et caséine du tPA sont présentes dans les microvaisseaux de la voie de migration piale. Deuxièmement, nous avons démontré que le glutamate entraînait une augmentation des activités MMP-9 et tPA endothéliales de manière dose- et MK801-dépendante. De plus, les effets stimulateurs du glutamate sur les activités MMP-9 et tPA sont absents chez les souris tPA<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent que le glutamate stimule l'activité MMP-9 dans la voie de migration piale de manière NMDA et tPA dépendante.

Nous avons également étudié les effets d'une invalidation du tPA et d'une inhibition de la MMP-9 par des injections *in vivo* de GM6001, un inhibiteur non sélectif des MMPs (Pham *et al.*, 2012), sur la mise en place des interneurones GABAergiques au sein du cortex cérébral. Pour cela, nous avons quantifié différents paramètres morphométriques comme la densité cellulaire, le nombre de neurites primaires ou encore les différentes morphologies des épines dendritiques à P15. Les résultats démontrent que dans les couches superficielles, la densité de neurones GABAergiques SST-positifs et/ou Gad67-GFP est significativement diminuée à la fois dans le modèle transgénique (souris tPA<sup>-/-</sup>) et pharmacologique (administration *in vivo* de GM6001). Ces effets sont associés à une distribution altérée des épines dendritiques avec une augmentation de la proportion en sous-type filipodia. En relation avec ces analyses morphométriques, suggérant une mauvaise migration et intégration des interneurones GABAergiques, l'activité locomotrice des souris tPA<sup>-/-</sup> est significativement exacerbée.

Le tPA et le glutamate sont des molécules connues pour leur effet dual, pro-survie et pro-mort, selon le stade de développement étudié, la région concernée et le type cellulaire (Correa *et al.*, 2011; Desfeux *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2013; Macrez *et al.*, 2011). Nos travaux suggèrent ici que le glutamate et le tPA auraient des effets trophiques et indispensables pour la structuration du néocortex et en particulier du système GABAergique. En effet, en considérant que *i)* le glutamate augmente les activités MMP-9 et tPA dans les vaisseaux de la voie de migration tangentielle piale de manière NMDA dépendante, *ii)* le glutamate augmente la migration « *outside-in* » des interneurones GABAergiques le long des vaisseaux de manière NMDA dépendante, *iii)* l'invalidation du tPA ou l'administration *in vivo* d'un inhibiteur de MMP

impactent négativement le positionnement des interneurones GABAergiques dans les couches corticales superficielles, l'analyse de la littérature et de nos résultats montrent que le glutamate, en contrôlant les activités des protéases endothéliales, régule la migration vasculo-dépendante des interneurones originaires des éminences ganglionnaires.

En conclusion, cette étude contribue à préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la migration vasculo-dépendante des interneurones GABAergiques dans la voie de migration piaie. Ces résultats suggèrent une contribution importante des neurones pyramidaux qui, par l'intermédiaire de leur production de facteurs chémoattractifs comme la neuréguline 3 et le glutamate, réguleraient les activités des protéases endothéliales et donc indirectement la migration des interneurones GABAergiques *via* des mécanismes dépendants du récepteur NMDA et du tPA. D'un point de vue clinique, ces résultats soulèvent la question de potentiels effets délétères des antagonistes du récepteur NMDA comme, par exemple, la kétamine qui est encore fréquemment utilisée comme anesthésique pédiatrique ou encore l'alcool, encore trop largement consommé par les femmes enceintes.



**Etude 2 : Une exposition *in utero* à l'alcool altère l'activité protéasique des microvaisseaux de la voie de migration piale et le positionnement cortical des interneurons GABAergiques.**

Dans cet article, nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition *in utero* à l'alcool pourrait impacter la migration de la population GABAergique corticale *via* un effet sur le récepteur NMDA endothélial et sur la sécrétion de protéases vasculaires. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mis en place différents protocoles sur des souris transgéniques Gad67-GFP afin de répondre à divers objectifs :

- Rechercher les effets directs de l'alcool sur la cellule endothéliale néonatale en culture
- Comparer les effets entre une exposition *in utero* chronique et une exposition aiguë *in vitro* à l'alcool sur les activités endothéliales
- Etudier les effets d'un traitement *in utero* chronique sur la mise en place des interneurons GABAergiques dans les couches corticales à P15
- Rechercher les effets d'un traitement aigu *in vitro* à l'éthanol sur la mort apoptotique des précurseurs GABAergiques au sein des éminences ganglionnaires par des études du clivage de la caspase-3 sur des tranches organotypiques au stade E15
- Rechercher les effets d'un traitement aigu *in vitro* à l'éthanol sur les activités MMP et tPA par zymographie sur gel et *in situ* sur des tranches organotypiques au stade P2

Les effets délétères d'une exposition *in utero* à l'alcool sur le cerveau en développement sont maintenant bien décrits (Archibald *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2011). Plus précisément, il a été mis en évidence qu'une exposition *in utero* à l'alcool dégradait de nombreuses structures cérébrales, telles que le corps calleux, entraînant des troubles cognitifs et comportementaux chez ces enfants (Bakoyiannis *et al.*, 2014). En particulier, il a été décrit que cette exposition perturbait également la migration cellulaire dans diverses structures cérébrales telles que les ganglions de la base, le cortex frontal ou encore le cervelet (Jones and Smith, 1973) ainsi qu'une réduction majeure voire complète du corps calleux (Riley *et al.*, 2011). De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans les effets délétères d'une exposition à l'alcool pendant le neurodéveloppement mais en se focalisant pour la plupart sur les cellules nerveuses. Elles ont permis de démontrer que l'alcool altérait très tôt le développement cérébral en impactant la formation du tube neural (Haghighi

Poodeh *et al.*, 2014), la neurogenèse (Olateju *et al.*, 2017), la migration neuronale (Aronne *et al.*, 2011; Shenoda, 2017), la mort des cellules neurales par apoptose (Ikonomidou *et al.*, 2000), la gliogenèse (Rubert *et al.*, 2006; Vemuri and Chetty, 2005) ou encore la myélinisation par les oligodendrocytes (Ozer *et al.*, 2000; Pons-Vázquez *et al.*, 2011). De façon intéressante, des études récentes ont révélé des interactions spécifiques entre les cellules endothéliales et les cellules neurales. Ainsi, les cellules endothéliales sont indispensables à une migration correcte et au bon positionnement de deux populations de cellules nerveuses : les interneurons GABAergiques (Marín and Rubenstein, 2003) et les oligodendrocytes (Tsai *et al.*, 2016). Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux effets d'une alcoolisation *in utero* sur l'angiogenèse cérébrale et sur les activités des cellules endothéliales. À la lumière de tous ces éléments, nous émettons l'hypothèse que les cellules endothéliales joueraient un rôle important dans les effets délétères engendrés par l'alcool sur les processus de migration vasculo-dépendante.

De récents travaux menés au sein du laboratoire ont permis de démontrer qu'une exposition *in utero* à l'alcool altère l'organisation des vaisseaux dans les couches corticales superficielles à la fois chez l'Homme et chez la Souris (Jégou *et al.*, 2012; Lecuyer *et al.*, 2017). Or, il est maintenant bien connu que les vaisseaux de la voie de migration piaie guide la migration des interneurons GABAergiques qui vont coloniser les couches corticales superficielles (Won *et al.*, 2013a). De plus, les résultats de l'étude 1 montrent le rôle du glutamate et du récepteur NMDA dans le contrôle de l'activité endothéliale. Comme l'éthanol est un antagoniste NMDA, nous avons donc recherché les effets de l'alcool sur l'activité des cellules endothéliales néonatales et sur le positionnement des interneurons GABAergiques dans les couches corticales superficielles.

#### *l'Effet d'une exposition aiguë à l'alcool sur l'activité calcique endothéliale*

La toxicité de l'alcool pendant le neurodéveloppement résulte d'actions indirectes et directes de la molécule d'éthanol, comme par exemple ses interactions avec les lipides membranaires (Yalcin *et al.*, 2017) ou les effets de ses métabolites comme l'acétaldéhyde (Matsushita and Higuchi, 2017). L'éthanol peut également modifier directement la neurotransmission en interagissant directement avec des récepteurs, comme par exemple les récepteurs NMDA (Zhao *et al.*, 2015b) dont il est un antagoniste et GABA<sub>A</sub> (Chandler *et al.*, 2017) dont il est un agoniste. Or, il a été récemment démontré la présence de récepteur

NMDA fonctionnels sur les cellules endothéliales néonatales, suggérant un effet de l'éthanol sur l'activité endothéliale (Legros *et al.*, 2009). A la lumière de ces informations, nous avons décidé d'étudier les effets de l'éthanol sur la mobilisation calcique intracellulaire dans des cultures de cellules endothéliales néonatales et dans les couches superficielles corticales sur des tranches organotypiques de cerveau. Dans le modèle de tranche organotypique, le glutamate stimule globalement la mobilisation calcique quantifiée par microfluorimétrie au niveau de la voie de migration piale des interneurons GABAergiques. Il est cependant important de noter que dans ce modèle de tranche, l'organisation histologique du tissu est préservée et que plusieurs types cellulaires, dont les neurones, expriment des récepteurs au glutamate. Il est donc difficile de déterminer les parts neuronales et endothéliales dans ces réponses globales. Nous avons donc réitéré l'expérience sur des cultures de cellules endothéliales néonatales. Dans un premier temps, des expériences d'immunohistochimie ont permis de confirmer la présence de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA sur ces cellules. Dans un deuxième temps, les expériences de calcimétrie ont permis de démontrer que le glutamate augmente significativement la mobilisation calcique intracellulaire et que lorsqu'il est co-administré, l'éthanol inhibe significativement les effets du glutamate à la fois dans les cultures de cellules endothéliales et dans le modèle de tranche organotypique. Ces résultats constituent la première démonstration d'une interaction fonctionnelle entre le glutamate et l'alcool au niveau de la voie de migration piale des interneurons GABAergiques et plaident pour une contribution des cellules endothéliales. Des expériences supplémentaires sont encore nécessaires pour démontrer l'implication directe du récepteur NMDA sur l'effet inhibiteur de l'alcool sur la réponse induite par le glutamate.

### II Effet d'une exposition aiguë à l'alcool sur l'activité des protéases endothéliales

Parce qu'il a été démontré qu'une interaction entre les cellules endothéliales et les interneurons est indispensable à une bonne migration le long de la voie de migration piale (Won *et al.*, 2013b), nous avons recherché les effets du glutamate et/ou de l'éthanol sur l'activation de protéases endothéliales : la MMP-9 et le tPA. En effet, de nombreuses études démontrent la contribution majeure de ces deux protéases dans le contrôle de la migration à la fois dans un contexte physiologique (Ould-Yahoui *et al.*, 2013) et pathologique (Liu *et al.*, 2017) de par leur action de dégradation de la matrice extracellulaire (Yeh *et al.*, 2016). Des expériences de zymographie sur gel montrent que le glutamate augmente significativement

l'activité MMP-9 et tPA dans des extraits de cortex microdisséqués de souriceaux. De plus, il est mis en évidence que lorsqu'il est co-incubé, l'éthanol réduit significativement l'effet du glutamate sur l'activité de ces 2 protéases. Des expériences de zymographie *in situ* réalisées sur des tranches organotypiques démontrent des activités MMP-9 et tPA en étroite interaction avec les microvaisseaux de voie de migration piaie et les vaisseaux radiaux qui traversent les couches corticales superficielles. De façon intéressante, nous avons également mis en évidence que les effets à la fois du glutamate et de l'éthanol sur l'activité MMP-9 n'étaient pas retrouvés chez les souris KO pour le gène du tPA, ce qui renforce encore le lien fonctionnel entre ces 2 protéases (Jin *et al.*, 2010; Omouendze *et al.*, 2013). Ces résultats démontrent qu'un traitement aigu à l'alcool est capable d'inhiber l'activité de deux protéases au niveau de la voie de migration piaie, protéases connues pour être impliquées dans la migration cellulaire.

### III Effets distincts d'un traitement aigu in vitro à l'alcool et d'une exposition in vivo

Dans le but de valider les effets de l'alcool sur les protéases endothéliales dans un modèle *in vivo*, nous avons effectué des expériences similaires chez des souriceaux nés de mère exposées à l'alcool pendant leur dernière semaine de gestation. De façon surprenante, lorsque l'on compare aux traitements aigus, les effets d'une exposition *in utero* à l'alcool sur la mobilisation calcique et sur les activités enzymatiques des protéases endothéliales sont drastiquement différents. En effet, alors que le traitement aigu à l'alcool inhibe les effets du glutamate sur la mobilisation calcique et sur les activités MMP-9 et tPA, un traitement chronique *in utero* à l'alcool exacerbe les effets du glutamate. Or, cet effet dual des différents traitements à l'alcool a également été rapporté sur des cellules neuronales (Baculis *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015). En particulier, il a été démontré qu'à l'inverse d'une exposition aiguë, une exposition chronique à l'éthanol promeut l'excitabilité des neurones corticaux (Nimitvilai *et al.*, 2017) et qu'une exposition de 7 jours à l'éthanol de neurones corticaux issus de cellules souches stimule l'expression de différents gènes; dont les gènes codants pour les sous-unités du récepteur NMDA (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B et GRIN2D ; Xiang *et al.*, 2015). De façon cohérente avec ces résultats, nous avons démontré qu'une exposition chronique à l'alcool augmente de façon significative l'expression protéique de GluN1, GluN2A et GluN2B. Ces résultats constituent la première démonstration qu'une exposition *in utero* à l'alcool altère la fonction vasculaire cérébrale et entraîne une exacerbation de l'activité des protéases

endothéliales au niveau de la voie de migration piale. Ces résultats supportent l'idée d'une contribution vasculaire aux effets délétères de l'alcool sur la migration des interneurons GABAergiques au cours du développement cérébral.

#### VI Une exposition chronique in utero à l'alcool impacte la densité et la maturation des épines dendritiques des interneurons GABAergiques chez les souris nouveau-nées

Dans le but de déterminer si les effets d'une exposition *in utero* à l'alcool sur l'activité endothéliale des vaisseaux constituant la voie de migration piale sont associés à des défauts de migration des interneurons GABA, nous avons réalisés des traitements *in utero* à l'alcool chez des souris Gad67-GFP. Ces souris expriment la GFP dans les interneurons issus des éminences ganglionnaires qui vont préférentiellement coloniser les couches corticales superficielles (Oliva *et al.*, 2000). De plus, il est décrit que la migration de ces neurones Gad67-GFP est achevée après 2 semaines de vie (Southwell *et al.*, 2012) et qu'une majorité de ces neurones utilisent la voie de migration piale pour aller coloniser les couches corticales superficielles (Miyoshi and Fishell, 2011). De façon intéressante, une analyse morphométrique des interneurons Gad67-GFP montre qu'à la fois la densité en corps cellulaire et en épines dendritiques est significativement augmentée chez les groupes traités par rapport au groupe contrôle. Ces résultats semblent être en désaccord avec d'autres données de la littérature qui démontrent que l'alcool est neurotoxique et induit une mort neuronale (Ikonomidou *et al.*, 2000). Cependant, une autre étude récente menée par Skorput et ses collaborateurs ciblant les interneurons GABAergiques démontre qu'une alcoolisation *in utero* augmente la densité corticale en interneurons Nkx2/ Tomato originaires des éminences ganglionnaires (Skorput *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent donc des effets différents de l'alcool selon les populations neuronales considérées et que les effets stimulateurs d'une alcoolisation *in utero* sur l'activité des protéases endothéliales MMP-9 et tPA auraient pour conséquence d'accélérer la migration vasculo-dépendante des interneurons GABAergiques en favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire.

En conclusion, il est maintenant bien établi qu'une alcoolisation fœtale peut entraîner des anomalies du développement cérébral associées à des troubles du comportement. Pour cette raison, la plupart des études se sont concentrées sur les cellules nerveuses pour caractériser

les mécanismes impliqués. Des travaux précédents du laboratoire ont démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool perturbait l'angiogenèse cérébrale à la fois chez le fœtus humain et murin. Cette nouvelle étude est la première indiquant que l'alcool altère l'activité endothéliale au niveau de la route de migration piale et que cet effet sur le système vasculaire se traduit par une exacerbation de l'activité de 2 protéases endothéliales (MMP-9 et tPA). Elle montre également que cette exacerbation de l'activité endothéliale est associée à une augmentation de la densité en neurones Gad67-GFP présents dans les couches corticales superficielles. L'ensemble de ces travaux suggère une contribution vasculaire dans les troubles de la migration neuronale décrits lors d'une exposition *in utero* à l'alcool.

-

---

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---





- Abbott, C.W., Kozanian, O.O., Kanaan, J., Wendel, K.M., Huffman, K.J., 2016. The Impact of Prenatal Ethanol Exposure on Neuroanatomical and Behavioral Development in Mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 122–133. <https://doi.org/10.1111/acer.12936>
- Abdel-Mannan, O., Cheung, A.F.P., Molnár, Z., 2008. Evolution of cortical neurogenesis. *Brain Res. Bull.*, Evolution and the Generation of Novelties in the Nervous System Proceedings of the 5th European Conference on Comparative Neurobiology: April 25-28, 2007, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.047>
- Adams, S.M., de Rivero Vaccari, J.C., Corriveau, R.A., 2004. Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9441–9450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3290-04.2004>
- Agapito, M.A., Zhang, C., Murugan, S., Sarkar, D.K., 2014. Fetal alcohol exposure disrupts metabolic signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons via a circadian mechanism in male mice. *Endocrinology* 155, 2578–2588. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2030>
- Akgül, G., McBain, C.J., 2016. Diverse roles for ionotropic glutamate receptors on inhibitory interneurons in developing and adult brain. *J. Physiol.* 594, 5471–5490. <https://doi.org/10.1113/JP271764>
- Alfano, M., Nebuloni, M., Allevi, R., Zerbi, P., Longhi, E., Lucianò, R., Locatelli, I., Pecoraro, A., Indrieri, M., Speziali, C., Doglioni, C., Milani, P., Montorsi, F., Salonia, A., 2016. Linearized texture of three-dimensional extracellular matrix is mandatory for bladder cancer cell invasion. *Sci. Rep.* 6, 36128. <https://doi.org/10.1038/srep36128>
- Aligny, C., Roux, C., Dourmap, N., Ramdani, Y., Do-Rego, J.-C., Jégou, S., Leroux, P., Leroux-Nicollet, I., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2014. Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. *Cell Death Dis.* 5, e1311. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.275>
- Andersen, G.L., Romundstad, P., De La Cruz, J., Himmelmann, K., Sellier, E., Cans, C., Kurinczuk, J.J., Vik, T., 2011. Cerebral palsy among children born moderately preterm or at moderately low birthweight between 1980 and 1998: a European register-based study. *Dev. Med. Child Neurol.* 53, 913–919. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2011.04079.x>
- Andreone, B.J., Lacoste, B., Gu, C., 2015. Neuronal and vascular interactions. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 25–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033835>
- Ang, E.S.B.C., Haydar, T.F., Gluncic, V., Rakic, P., 2003. Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5805–5815.
- Archibald, S.L., Fennema-Notestine, C., Gamst, A., Riley, E.P., Mattson, S.N., Jernigan, T.L., 2001. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev. Med. Child Neurol.* 43, 148–154.

- Arikkath, J., Reichardt, L.F., 2008. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 31, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.07.001>
- Aronne, M.P., Guadagnoli, T., Fontanet, P., Evrard, S.G., Brusco, A., 2011. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Exp. Neurol.* 229, 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.03.002>
- Attwell, D., Gibb, A., 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 841–849. <https://doi.org/10.1038/nrn1784>
- Autti-Rämö, I., Autti, T., Korkman, M., Kettunen, S., Salonen, O., Valanne, L., 2002. MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol. *Dev. Med. Child Neurol.* 44, 98–106.
- Bachir, A.I., Horwitz, A.R., Nelson, W.J., Bianchini, J.M., 2017. Actin-Based Adhesion Modules Mediate Cell Interactions with the Extracellular Matrix and Neighboring Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023234>
- Back, S.A., Rosenberg, P.A., 2014. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia* 62, 1790–1815. <https://doi.org/10.1002/glia.22658>
- Baculis, B.C., Diaz, M.R., Valenzuela, C.F., 2015. Third trimester-equivalent ethanol exposure increases anxiety-like behavior and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 137, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.009>
- Baeten, K.M., Akassoglou, K., 2011. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev. Neurobiol.* 71, 1018–1039. <https://doi.org/10.1002/dneu.20954>
- Bakoyiannis, I., Gkioka, E., Pergialiotis, V., Mastroleon, I., Prodromidou, A., Vlachos, G.D., Perrea, D., 2014. Fetal alcohol spectrum disorders and cognitive functions of young children. *Rev. Neurosci.* 25, 631–639. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0029>
- Balaszczuk, V., Bender, C., Pereno, G.L., Beltramino, C.A., 2011. Alcohol-induced neuronal death in central extended amygdala and pyriform cortex during the postnatal period of the rat. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 29, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.05.011>
- Barinka, F., Druga, R., 2010. Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol. Res.* 59, 665–677.
- Bartolini, G., Sánchez-Alcañiz, J.A., Osório, C., Valiente, M., García-Frigola, C., Marín, O., 2017. Neuregulin 3 Mediates Cortical Plate Invasion and Laminar Allocation of GABAergic Interneurons. *Cell Rep.* 18, 1157–1170. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.089>
- Basile, J.R., Afkhami, T., Gutkind, J.S., 2005. Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6889–6898. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.6889-6898.2005>

- Bautch, V.L., James, J.M., 2009. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adhes. Migr.* 3, 199–204.
- Bednarek, N., Clément, Y., Lelièvre, V., Olivier, P., Loron, G., Garnotel, R., Gressens, P., 2009. Ontogeny of MMPs and TIMPs in the murine neocortex. *Pediatr. Res.* 65, 296–300. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181973aee>
- Beggs, H.E., Baragona, S.C., Hemperly, J.J., Maness, P.F., 1997. NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J. Biol. Chem.* 272, 8310–8319.
- Belforte, J.E., Zsiros, V., Sklar, E.R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E.M., Nakazawa, K., 2010. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat. Neurosci.* 13, 76–83. <https://doi.org/10.1038/nn.2447>
- Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., Métin, C., 2005. Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons Comprises Two Alternating Phases: Forward Migration of the Golgi/Centrosome Associated with Centrosome Splitting and Myosin Contraction at the Rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005>
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. <https://doi.org/10.1038/nrn920>
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., Cherubini, E., 2012. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 18, 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23, 781–783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>
- Berman, R.F., Hannigan, J.H., 2000. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus* 10, 94–110. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<94::AID-HIPO11>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<94::AID-HIPO11>3.0.CO;2-T)
- Beste, C., Stock, A.-K., Ness, V., Hoffmann, R., Saft, C., 2015. Evidence for divergent effects of neurodegeneration in Huntington’s disease on attentional selection and neural plasticity: implications for excitotoxicity. *Brain Struct. Funct.* 220, 1437–1447. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0735-7>
- Bhutta, A.T., 2007. Ketamine: a controversial drug for neonates. *Semin. Perinatol.* 31, 303–308. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2007.07.005>
- Bi, S., Kim, Y.J., Zheng, F., 2012. Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46, 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002>
- Blair, E., Watson, L., 2006. Epidemiology of cerebral palsy. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 11, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2005.10.010>

- Blaylock, R.L., 2017. Parkinson's disease: Microglial/macrophage-induced immunoexcitotoxicity as a central mechanism of neurodegeneration. *Surg. Neurol. Int.* 8, 65. [https://doi.org/10.4103/sni.sni\\_441\\_16](https://doi.org/10.4103/sni.sni_441_16)
- Bonde, C., Noraberg, J., Noer, H., Zimmer, J., 2005. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136, 779–794. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.020>
- Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M.A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., Cossart, R., 2009. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326, 1419–1424. <https://doi.org/10.1126/science.1175509>
- Boulland, J.-L., Chaudhry, F.A., 2012. Ontogenetic changes in the distribution of the vesicular GABA transporter VGAT correlate with the excitation/inhibition shift of GABA action. *Neurochem. Int.* 61, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.018>
- Boylan, G.B., Young, K., Panerai, R.B., Rennie, J.M., Evans, D.H., 2000. Dynamic cerebral autoregulation in sick newborn infants. *Pediatr. Res.* 48, 12–17. <https://doi.org/10.1203/00006450-200007000-00005>
- Brolese, G., Lunardi, P., Broetto, N., Engelke, D.S., Lírio, F., Batassini, C., Tramontina, A.C., Gonçalves, C.-A., 2014. Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 269, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.023>
- Bui, A., Kim, H.K., Maroso, M., Soltesz, I., 2015. Microcircuits in Epilepsy: Heterogeneity and Hub Cells in Network Synchronization. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022855>
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L., 2017. Oxidative Stress in the Newborn. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1094247. <https://doi.org/10.1155/2017/1094247>
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., Djonov, V., 2004. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 474–488. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20184>
- Burri, P.H., Tarek, M.R., 1990. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* 228, 35–45. <https://doi.org/10.1002/ar.1092280107>
- Buske, C., Gerlai, R., 2011. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.009>
- Buzsáki, G., Draguhn, A., 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1929. <https://doi.org/10.1126/science.1099745>
- Bystron, I., Blakemore, C., Rakic, P., 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 110–122. <https://doi.org/10.1038/nrn2252>

- Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Carmeliet, P., Storkebaum, E., 2002. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 39–53. <https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0290>
- Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436, 193–200. <https://doi.org/10.1038/nature03875>
- Case, M., Soltesz, I., 2011. Computational modeling of epilepsy. *Epilepsia* 52 Suppl 8, 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03225.x>
- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., Docagne, F., 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5186–5199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>
- Caviness Jr., V.S., Takahashi, T., 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev.* 17, 159–163. [https://doi.org/10.1016/0387-7604\(95\)00029-B](https://doi.org/10.1016/0387-7604(95)00029-B)
- Caviness, V.S., Rakic, P., 1978. Mechanisms of Cortical Development: A View From Mutations in Mice. *Annu. Rev. Neurosci.* 1, 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.01.030178.001501>
- Celio, M.R., 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375–475.
- Chae, T., Kwon, Y.T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E., Tsai, L.H., 1997. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18, 29–42.
- Chalothorn, D., Faber, J.E., 2010. Formation and maturation of the native cerebral collateral circulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.03.014>
- Chandler, C.M., Overton, J.S., Rüedi-Bettschen, D., Platt, D.M., 2017. GABAA Receptor Subtype Mechanisms and the Abuse-Related Effects of Ethanol: Genetic and Pharmacological Evidence. *Handb. Exp. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_80](https://doi.org/10.1007/164_2017_80)
- Christiansen, J.H., Coles, E.G., Wilkinson, D.G., 2000. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 719–724.
- Chu, B., Anantharam, V., Treistman, S.N., 1995. Ethanol inhibition of recombinant heteromeric NMDA channels in the presence and absence of modulators. *J. Neurochem.* 65, 140–148.

- Ciceri, G., Dehorter, N., Sols, I., Huang, Z.J., Maravall, M., Marín, O., 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1199–1210. <https://doi.org/10.1038/nn.3485>
- Clarke, M.E., Gibbard, W.B., 2003. Overview of fetal alcohol spectrum disorders for mental health professionals. *Can. Child Adolesc. Psychiatry Rev. Rev. Can. Psychiatr. Enfant Adolesc.* 12, 57–63.
- Coles, C.D., Platzman, K.A., 1993. Behavioral development in children prenatally exposed to drugs and alcohol. *Int. J. Addict.* 28, 1393–1433.
- Corbin, J.G., Butt, S.J.B., 2011. Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 710–732. <https://doi.org/10.1002/dneu.20890>
- Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., Docagne, F., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J. Exp. Med.* 208, 1229–1242. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>
- Coune, F., Silvestre de Ferron, B., González-Marín, M.C., Antol, J., Naassila, M., Pierrefiche, O., 2017. Resistance to ethanol sensitization is associated with a loss of synaptic plasticity in the hippocampus. *Synap. N. Y. N* 71. <https://doi.org/10.1002/syn.21899>
- Coutts, D.J.C., Harrison, N.L., 2015. Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 455–462. <https://doi.org/10.1111/acer.12642>
- Craig, A.M., Kang, Y., 2007. Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.011>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, re16. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Cheng, Q., Yeh, H.H., 2006. Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 16, 1377–1388. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj084>
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W.L., Yanagawa, Y., Obata, K., Yeh, H.H., 2008. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 1854–1864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5110-07.2008>
- Dalton, G.L., Wu, D.C., Wang, Y.T., Floresco, S.B., Phillips, A.G., 2012. NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in

the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology* 62, 797–806. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.001>

Day, N.L., Richardson, G.A., 2004. An analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on growth: a teratologic model. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 127C, 28–34. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30013>

de la Monte, S.M., Tong, M., Carlson, R.I., Carter, J.J., Longato, L., Silbermann, E., Wands, J.R., 2009. Ethanol inhibition of aspartyl-asparaginyl-beta-hydroxylase in fetal alcohol spectrum disorder: potential link to the impairments in central nervous system neuronal migration. *Alcohol Fayettev. N* 43, 225–240. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.09.009>

De Zio, D., Giunta, L., Corvaro, M., Ferraro, E., Cecconi, F., 2005. Expanding roles of programmed cell death in mammalian neurodevelopment. *Semin. Cell Dev. Biol., Cellular Cholesterol Metabolism and Trafficking and Apoptosis in Development* 16, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.12.003>

Dean, C., Dresbach, T., 2006. Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci.* 29, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.11.003>

Delcour, M., Olivier, P., Chambon, C., Pansiot, J., Russier, M., Liberge, M., Xin, D., Gestreau, C., Alescio-Lautier, B., Gressens, P., Verney, C., Barbe, M.F., Baud, O., Coq, J.-O., 2012. Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in adult rats with white matter injury following prenatal ischemia. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 22, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00504.x>

Desfeux, A., El Ghazi, F., Jégou, S., Legros, H., Marret, S., Laudenbach, V., Gonzalez, B.J., 2010. Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 20, 1092–1108. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp181>

Dikranian, K., Qin, Y.-Q., Labruyere, J., Nemmers, B., Olney, J.W., 2005. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 155, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.11.005>

Domellöf, E., Fagard, J., Jacquet, A.-Y., Rönnqvist, L., 2011. Goal-directed arm movements in children with fetal alcohol syndrome: a kinematic approach. *Eur. J. Neurol.* 18, 312–320. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03142.x>

Domingues, A.M. de J., Neugebauer, K.M., Fern, R., 2011. Identification of four functional NR3B isoforms in developing white matter reveals unexpected diversity among glutamate receptors. *J. Neurochem.* 117, 449–460. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07212.x>

Drake, C.J., 2003. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 69, 73–82. <https://doi.org/10.1002/bdrc.10003>

Druga, R., 2009. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol. (Praha)* 55, 201–217.



- El Fatimy, R., Miozzo, F., Le Mouël, A., Abane, R., Schwendimann, L., Sabéran-Djoneidi, D., de Thonel, A., Massaoudi, I., Paslaru, L., Hashimoto-Torii, K., Christians, E., Rakic, P., Gressens, P., Mezger, V., 2014. Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol. Med.* 6, 1043–1061. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303311>
- El Ghazi, F., Desfeux, A., Brasse-Lagnel, C., Roux, C., Lesueur, C., Mazur, D., Remy-Jouet, I., Richard, V., Jégou, S., Laudenbach, V., Marret, S., Bekri, S., Prevot, V., Gonzalez, B.J., 2012. NO-dependent protective effect of VEGF against excitotoxicity on layer VI of the developing cerebral cortex. *Neurobiol. Dis.* 45, 871–886. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.003>
- El-Khoury, R., Panayotis, N., Matagne, V., Ghata, A., Villard, L., Roux, J.-C., 2014. GABA and glutamate pathways are spatially and developmentally affected in the brain of *Mecp2*-deficient mice. *PloS One* 9, e92169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092169>
- Fabio, M.C., March, S.M., Molina, J.C., Nizhnikov, M.E., Spear, N.E., Pautassi, R.M., 2013. Prenatal ethanol exposure increases ethanol intake and reduces c-Fos expression in infralimbic cortex of adolescent rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 842–852. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.12.009>
- Fahey, M.C., Maclennan, A.H., Kretschmar, D., Gecz, J., Kruer, M.C., 2017. The genetic basis of cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* 59, 462–469. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13363>
- Farber, N.B., Creeley, C.E., Olney, J.W., 2010. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. *Neurobiol. Dis.* 40, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.025>
- Faria, A.C., Veldhuis, J.D., Thorner, M.O., Vance, M.L., 1989. Half-time of endogenous growth hormone (GH) disappearance in normal man after stimulation of GH secretion by GH-releasing hormone and suppression with somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 535–541. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-3-535>
- Farley, N.-M.M., Mihic, S.J., 2015. Allosteric modulation of the glycine receptor activated by agonists differing in efficacy. *Brain Res.* 1606, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.024>
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., Britto, J.M., 2012. Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons. *Neurosignals* 20, 168–189. <https://doi.org/10.1159/000334489>
- Favrais, G., van de Looij, Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didinger, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., Sizonenko, S., Hagberg, H., Lelièvre, V., Gressens, P., 2011. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann. Neurol.* 70, 550–565. <https://doi.org/10.1002/ana.22489>
- Feltes, B.C., de Faria Poloni, J., Nunes, I.J.G., Bonatto, D., 2014. Fetal alcohol syndrome, chemo-biology and OMICS: ethanol effects on vitamin metabolism during neurodevelopment as measured by systems biology analysis. *Omics J. Integr. Biol.* 18, 344–363. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0144>

- Fernandes, Y., Rampersad, M., Gerlai, R., 2015. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* 18. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu089>
- Fischl, B., Dale, A.M., 2000. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11050–11055. <https://doi.org/10.1073/pnas.200033797>
- Fishell, G., Rudy, B., 2011. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are.” *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 535–567. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113717>
- Fiske, B.K., Brunjes, P.C., 2001. NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. *J. Neurobiol.* 47, 223–232.
- Gaberel, T., Macrez, R., Gauberti, M., Montagne, A., Hebert, M., Petersen, K.-U., Touze, E., Agin, V., Emery, E., Ali, C., Vivien, D., 2013. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 67, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.023>
- Gavaldà, N., Pérez-Navarro, E., García-Martínez, J.M., Marco, S., Benito, A., Alberch, J., 2008. Bax deficiency promotes an up-regulation of Bim(EL) and Bak during striatal and cortical postnatal development, and after excitotoxic injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 663–672. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.013>
- Gelfand, M.V., Hong, S., Gu, C., 2009. Guidance from above: common cues direct distinct signaling outcomes in vascular and neural patterning. *Trends Cell Biol.* 19, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.001>
- Gelman, D.M., Marín, O., 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2136–2141. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07267.x>
- Gentet, L.J., Kremer, Y., Taniguchi, H., Huang, Z.J., Staiger, J.F., Petersen, C.C.H., 2012. Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat. Neurosci.* 15, 607–612. <https://doi.org/10.1038/nn.3051>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Girault, V., Gilard, V., Marguet, F., Lesueur, C., Hauchecorne, M., Ramdani, Y., Laquerrière, A., Marret, S., Jégou, S., Gonzalez, B.J., Brasse-Lagnel, C., Bekri, S., 2017. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis.* 8, e2610. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.29>

- Godin, E.A., O'Leary-Moore, S.K., Khan, A.A., Parnell, S.E., Ament, J.J., Dehart, D.B., Johnson, B.W., Allan Johnson, G., Styner, M.A., Sulik, K.K., 2010. Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 7. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34, 98–111. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01071.x>
- Gonzalez-Burgos, G., Lewis, D.A., 2012. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 38, 950–957. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs010>
- Granzotto, A., Sensi, S.L., 2015. Intracellular zinc is a critical intermediate in the excitotoxic cascade. *Neurobiol. Dis.* 81, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.010>
- Grateron, L., Cebada-Sanchez, S., Marcos, P., Mohedano-Moriano, A., Insausti, A.M., Muñoz, M., Arroyo-Jimenez, M.M., Martinez-Marcos, A., Artacho-Perula, E., Blaizot, X., Insausti, R., 2003. Postnatal development of calcium-binding proteins immunoreactivity (parvalbumin, calbindin, calretinin) in the human entorhinal cortex. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 311–316.
- Gray, J.A., Zito, K., Hell, J.W., 2016. Non-ionotropic signaling by the NMDA receptor: controversy and opportunity. *F1000Research* 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8366.1>
- Greenberg, D.A., Jin, K., 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438, 954–959. <https://doi.org/10.1038/nature04481>
- Gressens, P., Lammens, M., Picard, J.J., Evrard, P., 1992. Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 27, 219–226.
- Grigoriev, V.V., Efimova, A.D., Ustyugov, A.A., Shevchenko, V.P., Bachurin, S.O., Myasoedov, N.F., 2016. Glutamate release and uptake processes are altered in a new mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dokl. Biochem. Biophys.* 468, 165–167. <https://doi.org/10.1134/S1607672916030017>
- Groc, L., Bard, L., Choquet, D., 2009. Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.029>
- Guerri, C., Bazinet, A., Riley, E.P., 2009. Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 44, 108–114. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn105>
- Guo, S., Lok, J., Zhao, S., Leung, W., Som, A.T., Hayakawa, K., Wang, Q., Xing, C., Wang, X., Ji, X., Zhou, Y., Lo, E.H., 2016. Effects of Controlled Cortical Impact on the Mouse Brain Vasculome. *J. Neurotrauma* 33, 1303–1316. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4101>
- Guo, S., Zhou, Y., Xing, C., Lok, J., Som, A.T., Ning, M., Ji, X., Lo, E.H., 2012. The vasculome of the mouse brain. *PloS One* 7, e52665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052665>

- Gupta, A., Tsai, L.-H., Wynshaw-Boris, A., 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–355. <https://doi.org/10.1038/nrg799>
- Haghighi Poodeh, S., Alhonen, L., Salonurmi, T., Savolainen, M.J., 2014. Ethanol-induced impairment of polyamine homeostasis – A potential cause of neural tube defect and intrauterine growth restriction in fetal alcohol syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.079>
- Hatten, M.E., Mason, C.A., 1990. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46, 907–916.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
- Hendry, S.H., Jones, E.G., Emsen, P.C., 1984. Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 2497–2517.
- Henry, V.J., Lecointre, M., Laudenbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., Berezowski, V., Carmeliet, P., Vivien, D., Marret, S., Gonzalez, B.J., Leroux, P., 2013. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiol. Dis.* 50, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.020>
- Henson, M.A., Roberts, A.C., Pérez-Otaño, I., Philpot, B.D., 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.004>
- Himmelman, K., Uvebrant, P., 2014. The panorama of cerebral palsy in Sweden. XI. Changing patterns in the birth-year period 2003-2006. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 103, 618–624. <https://doi.org/10.1111/apa.12614>
- Hollyday, M., 2001. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 161–173. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00093-9)
- Honse, Y., Ren, H., Lipsky, R.H., Peoples, R.W., 2004. Sites in the fourth membrane-associated domain regulate alcohol sensitivity of the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 46, 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.11.006>
- Hotulainen, P., Hoogenraad, C.C., 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189, 619–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>
- Howlett, T.A., Willis, D., Walker, G., Wass, J.A.H., Trainer, P.J., UK Acromegaly Register Study Group (UKAR-3), 2013. Control of growth hormone and IGF1 in patients with acromegaly in the UK: responses to medical treatment with somatostatin analogues and dopamine agonists. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 79, 689–699. <https://doi.org/10.1111/cen.12207>
- Hoyme, H.E., May, P.A., Kalberg, W.O., Kodituwakku, P., Gossage, J.P., Trujillo, P.M., Buckley, D.G., Miller, J.H., Aragon, A.S., Khaole, N., Viljoen, D.L., Jones, K.L., Robinson, L.K., 2005. A

practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatrics* 115, 39–47. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0259>

Hsieh, C.-H., Lin, Y.-J., Chen, W.-L., Huang, Y.-C., Chang, C.-W., Cheng, F.-C., Liu, R.-S., Shyu, W.-C., 2017. HIF-1 $\alpha$  triggers long-lasting glutamate excitotoxicity via system xc(-) in cerebral ischaemia-reperfusion. *J. Pathol.* 241, 337–349. <https://doi.org/10.1002/path.4838>

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovskaja, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.

INSERM Collective Expertise Centre, 2000. Alcohol: Health effects, in: INSERM Collective Expert Reports. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris.

Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K., Negishi, M., 2006. Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 $\beta$  through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* 7, 704–709. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400737>

Jaatinen, P., Rintala, J., 2008. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum Lond. Engl.* 7, 332–347. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0034-z>

Jakobsson, L., Franco, C.A., Bentley, K., Collins, R.T., Ponsioen, B., Aspalter, I.M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., Gerhardt, H., 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* 12, 943–953. <https://doi.org/10.1038/ncb2103>

Jégou, S., El Ghazi, F., de Lendeu, P.K., Marret, S., Laudenbach, V., Uguen, A., Marcorelles, P., Roy, V., Laquerrière, A., Gonzalez, B.J., 2012. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann. Neurol.* 72, 952–960. <https://doi.org/10.1002/ana.23699>

Jin, R., Yang, G., Li, G., 2010. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol. Dis.* 38, 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.03.008>

Johnson, G.L., Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>

Jones, K.L., Smith, D.W., 1973. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet Lond. Engl.* 302, 999–1001.

Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G.L., Takeichi, M., 2007. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev. Biol.* 304, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.014>

- Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., Collingridge, G.L., Lombet, A., Issa, L., Rene, F., Loeffler, J.-P., Kavelaars, A., Verney, C., Mantz, J., Gressens, P., 2012. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann. Neurol.* 72, 536–549. <https://doi.org/10.1002/ana.23626>
- Kaindl, A.M., Favrais, G., Gressens, P., 2009. Molecular mechanisms involved in injury to the preterm brain. *J. Child Neurol.* 24, 1112–1118. <https://doi.org/10.1177/0883073809337920>
- Kalberg, W.O., Provost, B., Tollison, S.J., Tabachnick, B.G., Robinson, L.K., Eugene Hoyme, H., Trujillo, P.M., Buckley, D., Aragon, A.S., May, P.A., 2006. 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.* 30, 2037–2045. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00250.x>
- Karagiannis, A., Gallopin, T., Dávid, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., Hillman, E.M.C., Staiger, J.F., Cauli, B., 2009. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3642–3659. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0058-09.2009>
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1993. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 70, 387–396.
- Kayakabe, M., Kakizaki, T., Kaneko, R., Sasaki, A., Nakazato, Y., Shibasaki, K., Ishizaki, Y., Saito, H., Suzuki, N., Furuya, N., Yanagawa, Y., 2013. Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 286. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00286>
- Keen-Rhinehart, E., Ondek, K., Schneider, J.E., 2013. Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. *Front. Neurosci.* 7, 213. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00213>
- Kelsom, C., Lu, W., 2013. Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci.* 3, 19. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-19>
- Kim, C.H., Lee, J., Lee, J.-Y., Roche, K.W., 2008. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J. Neurosci. Res.* 86, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jnr.21437>
- Komuro, H., Rakic, P., 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95–97.
- Kruse, M., Michelsen, S.I., Flachs, E.M., Brønnum-Hansen, H., Madsen, M., Uldall, P., 2009. Lifetime costs of cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* 51, 622–628. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2008.03190.x>
- Latif-Hernandez, A., Faldini, E., Ahmed, T., Balschun, D., 2016. Separate Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Functions in Depotentiation vs. LTP: A Distinct Role for

- Group1 mGluR Subtypes and NMDARs. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 252. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00252>
- Laufer, B.I., Kapalanga, J., Castellani, C.A., Diehl, E.J., Yan, L., Singh, S.M., 2015. Associative DNA methylation changes in children with prenatal alcohol exposure. *Epigenomics* 7, 1259–1274. <https://doi.org/10.2217/epi.15.60>
- Laurie, D.J., Seeburg, P.H., 1994. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 3180–3194.
- Le Magueresse, C., Monyer, H., 2013. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* 77, 388–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.011>
- Lecointre, M., Hauchecorne, M., Chaussivert, A., Marret, S., Leroux, P., Jegou, S., Leroux-Nicollet, I., Gonzalez, B.J., Henry, V.J., 2014. The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 764–767. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.30>
- Lecuyer, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2017. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 44. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0444-6>
- Lee, R.M., 1995. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol. Ther.* 66, 149–173.
- Lee, Y.S., Kang, J.W., Lee, Y.H., Kim, D.W., 2011. ID4 mediates proliferation of astrocytes after excitotoxic damage in the mouse hippocampus. *Anat. Cell Biol.* 44, 128–134. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.2.128>
- Legros, H., Launay, S., Roussel, B.D., Marcou-Labarre, A., Calbo, S., Catteau, J., Leroux, P., Boyer, O., Ali, C., Marret, S., Vivien, D., Laudénbach, V., 2009. Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1146–1158. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.39>
- Leigland, L.A., Ford, M.M., Lerch, J.P., Kroenke, C.D., 2013. The influence of fetal ethanol exposure on subsequent development of the cerebral cortex as revealed by magnetic resonance imaging. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37, 924–932. <https://doi.org/10.1111/acer.12051>
- Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.P., Menuet, J.C., 2003. Children of alcoholic parents-observed anomalies: discussion of 127 cases. *Ther. Drug Monit.* 25, 132–136.
- Letinić, K., Kostović, I., 1997. Transient fetal structure, the gangliothalamic body, connects telencephalic germinal zone with all thalamic regions in the developing human brain. *J. Comp. Neurol.* 384, 373–395.
- Letinic, K., Rakic, P., 2001. Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 931–936. <https://doi.org/10.1038/nn0901-931>

- Letinic, K., Zoncu, R., Rakic, P., 2002. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645–649. <https://doi.org/10.1038/nature00779>
- Lewis, S.J., Zuccolo, L., Davey Smith, G., Macleod, J., Rodriguez, S., Draper, E.S., Barrow, M., Alati, R., Sayal, K., Ring, S., Golding, J., Gray, R., 2012. Fetal alcohol exposure and IQ at age 8: evidence from a population-based birth-cohort study. *PLoS One* 7, e49407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049407>
- Li, S., Haigh, K., Haigh, J.J., Vasudevan, A., 2013. Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 14809–14815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1368-13.2013>
- Lin, L.C., Sibille, E., 2015. Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Mol. Psychiatry* 20, 377–387. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.184>
- Liu, Q.-H., Wang, Y., Yong, H.-M., Hou, P.-F., Pan, J., Bai, J., Zheng, J.-N., 2017. XRCC1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis through suppressing MMP-2 and MMP-9. *Oncotarget* 8, 109382–109392. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22680>
- Liu, X.-B., Murray, K.D., Jones, E.G., 2004. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8885–8895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2476-04.2004>
- Livy, D.J., Maier And, S.E., West, J.R., 2001. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the ventrolateral nucleus of the thalamus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 774–780.
- Livy, D.J., Miller, E.K., Maier, S.E., West, J.R., 2003. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicol. Teratol.* 25, 447–458.
- Logsdon, E.A., Finley, S.D., Popel, A.S., Mac Gabhann, F., 2014. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 1491–1508. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12164>
- Lohmann, C., Kessels, H.W., 2014. The developmental stages of synaptic plasticity. *J. Physiol.* 592, 13–31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235119>
- London, N.R., Whitehead, K.J., Li, D.Y., 2009. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* 12, 149–158. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9130-z>
- López-Bendito, G., Sturgess, K., Erdélyi, F., Szabó, G., Molnár, Z., Paulsen, O., 2004. Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 14, 1122–1133. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh072>



- Low, C.-M., Wee, K.S.-L., 2010. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol. Pharmacol.* 78, 1–11. <https://doi.org/10.1124/mol.110.064006>
- Lowery, L.A., Van Vactor, D., 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332–343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Luhmann, H.J., 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>
- Lui, J.H., Hansen, D.V., Kriegstein, A.R., 2011. Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell* 146, 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030>
- Luján, R., Shigemoto, R., López-Bendito, G., 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130, 567–580. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.042>
- Luo, J., Miller, M.W., 1999. Transforming growth factor beta1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol. *J. Neurochem.* 72, 2286–2293.
- Luo, J., Miller, M.W., 1998. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27, 157–167.
- Luo, L., 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601–635. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.031802.150501>
- Ma, F., Martínez-San Segundo, P., Barceló, V., Morancho, A., Gabriel-Salazar, M., Giralt, D., Montaner, J., Rosell, A., 2016. Matrix metalloproteinase-13 participates in neuroprotection and neurorepair after cerebral ischemia in mice. *Neurobiol. Dis.* 91, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.016>
- Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Parcq, J., Cassé, F., Hommet, Y., Orset, C., Agin, V., Bezin, L., Berrocoso, T.G., Petersen, K.U., Montaner, J., Maubert, E., Vivien, D., Ali, C., 2011. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 42, 2315–2322. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.606293>
- Maloney, S.E., Rieger, M.A., Dougherty, J.D., 2013. Identifying essential cell types and circuits in autism spectrum disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 113, 61–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418700-9.00003-4>
- Manent, J.-B., Beguin, S., Ganay, T., Represa, A., 2011. Cell-autonomous and cell-to-cell signalling events in normal and altered neuronal migration. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1595–1608. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07867.x>

- Manzo-Avalos, S., Saavedra-Molina, A., 2010. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 4281–4304. <https://doi.org/10.3390/ijerph7124281>
- Marín, O., 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2019–2029. <https://doi.org/10.1111/ejn.12225>
- Marín, O., Rubenstein, J.L., 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 780–790. <https://doi.org/10.1038/35097509>
- Marín, O., Rubenstein, J.L.R., 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058>
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., Tsai, L.-H., 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001834. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001834>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Marret, S., Vanhulle, C., Laquerriere, A., 2013. Pathophysiology of cerebral palsy. *Handb. Clin. Neurol.* 111, 169–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00016-6>
- Matsushita, S., Higuchi, S., 2017. Review: Use of Asian samples in genetic research of alcohol use disorders: Genetic variation of alcohol metabolizing enzymes and the effects of acetaldehyde. *Am. J. Addict.* 26, 469–476. <https://doi.org/10.1111/ajad.12477>
- Mattson, S.N., Riley, E.P., Gramling, L., Delis, D.C., Jones, K.L., 1997. Heavy prenatal alcohol exposure with or without physical features of fetal alcohol syndrome leads to IQ deficits. *J. Pediatr.* 131, 718–721.
- Mattson, S.N., Riley, E.P., Sowell, E.R., Jernigan, T.L., Sobel, D.F., Jones, K.L., 1996. A decrease in the size of the basal ganglia in children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 1088–1093.
- McConnell, S.K., Kaznowski, C.E., 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254, 282–285.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S–15S.
- Melom, J.E., Littleton, J.T., 2011. Synapse development in health and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.01.002>

- Michaluk, P., Kaczmarek, L., 2007. Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ.* 14, 1255–1258. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402141>
- Miller, M.W., 1995. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19, 1500–1509.
- Miller, M.W., 1993. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17, 304–314.
- Minarovits, J., Banati, F., Szenthe, K., Niller, H.H., 2016. Epigenetic Regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 879, 1–25. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24738-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24738-0_1)
- Miyoshi, G., Fishell, G., 2011. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 21, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq155>
- Molliver, M.E., Kostović, I., van der Loos, H., 1973. The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus. *Brain Res.* 50, 403–407.
- Monk, C.S., Webb, S.J., Nelson, C.A., 2001. Prenatal Neurobiological Development: Molecular Mechanisms and Anatomical Change. *Dev. Neuropsychol.* 19, 211–236. [https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902\\_5](https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902_5)
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Morgan, R.J., Soltesz, I., 2008. Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6179–6184. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801372105>
- Mukoyama, Y.-S., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Gu, C., Anderson, D.J., 2005. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Dev. Camb. Engl.* 132, 941–952. <https://doi.org/10.1242/dev.01675>
- Müller, F., O’Rahilly, R., 1987. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. *Anat. Embryol. (Berl.)* 176, 413–430.
- Murry, C.E., Keller, G., 2008. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell* 132, 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.008>
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O.L., Parnavelas, J.G., 2003. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 13, 607–611.

- Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., Belforte, J.E., 2012. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* 62, 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>
- Narboux-Nême, N., Wassef, M., 2003. [Origin of GABAergic cortical interneurons in mice and humans]. *Med. Sci. MS* 19, 408–411. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003194408>
- Naseer, M.I., Ullah, I., Rasool, M., Ansari, S.A., Sheikh, I.A., Bibi, F., Chaudhary, A.G., Al-Qahtani, M.H., Kim, M.O., 2014. Downregulation of dopamine D<sub>1</sub> receptors and increased neuronal apoptosis upon ethanol and PTZ exposure in prenatal rat cortical and hippocampal neurons. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 35, 1681–1688. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1812-7>
- Nevo, I., Hamon, M., 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.* 26, 305–336; discussion 337–342.
- Nevo, I., Langlois, X., Laporte, A.M., Kleven, M., Koek, W., Lima, L., Maudhuit, C., Martres, M.P., Hamon, M., 1995. Chronic alcoholization alters the expression of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor subtypes in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 229–239.
- Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G., 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305, 187–202.
- Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., Tsai, L.H., 1998. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395, 194–198. <https://doi.org/10.1038/26034>
- Nimitvilai, S., Lopez, M.F., Mulholland, P.J., Woodward, J.J., 2017. Ethanol Dependence Abolishes Monoamine and GIRK (Kir3) Channel Inhibition of Orbitofrontal Cortex Excitability. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1800–1812. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.22>
- O’Hare, E.D., Kan, E., Yoshii, J., Mattson, S.N., Riley, E.P., Thompson, P.M., Toga, A.W., Sowell, E.R., 2005. Mapping cerebellar vermal morphology and cognitive correlates in prenatal alcohol exposure. *Neuroreport* 16, 1285–1290.
- Ohshima, T., Gilmore, E.C., Longenecker, G., Jacobowitz, D.M., Brady, R.O., Herrup, K., Kulkarni, A.B., 1999. Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 6017–6026.
- Olateju, O.I., Spocter, M.A., Patzke, N., Ihunwo, A.O., Manger, P.R., 2017. Hippocampal neurogenesis in the C57BL/6J mice at early adulthood following prenatal alcohol exposure. *Metab. Brain Dis.* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0156-4>
- Oliva, A.A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., Swann, J.W., 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3354–3368.

- Olney, J.W., 1984. Excitotoxic food additives--relevance of animal studies to human safety. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6, 455–462.
- Olney, J.W., 1969. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 28, 455–474.
- Olney, J.W., Sharpe, L.G., 1969. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166, 386–388.
- Olney, J.W., Tenkova, T., Dikranian, K., Muglia, L.J., Jermakowicz, W.J., D'Sa, C., Roth, K.A., 2002a. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol. Dis.* 9, 205–219. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0475>
- Olney, J.W., Tenkova, T., Dikranian, K., Qin, Y.-Q., Labruyere, J., Ikonomidou, C., 2002b. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 133, 115–126.
- Olney, J.W., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., Ikonomidou, C., 2001. Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7, 267–275. <https://doi.org/10.1002/mrdd.1037>
- Omouendze, P.L., Henry, V.J., Porte, B., Dupré, N., Carmeliet, P., Gonzalez, B.J., Marret, S., Leroux, P., 2013. Hypoxia-ischemia or excitotoxin-induced tissue plasminogen activator-dependent gelatinase activation in mice neonate brain microvessels. *PLoS One* 8, e71263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071263>
- O'Rahilly, R., Müller, F., 1999. Minireview: Summary of the initial development of the human nervous system. *Teratology* 60, 39–41. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9926\(199907\)60:1<39::AID-TERA11>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199907)60:1<39::AID-TERA11>3.0.CO;2-I)
- Ould-Yahoui, A., Sbai, O., Baranger, K., Bernard, A., Gueye, Y., Charrat, E., Clément, B., Gignes, D., Dive, V., Girard, S.D., Féron, F., Khrestchatsky, M., Rivera, S., 2013. Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant.* 22, 993–1010. <https://doi.org/10.3727/096368912X657468>
- 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, 21–25.
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., Hollmann, M., 2012. GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci.* 35, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.010>
- Pallo, S.P., DiMaio, J., Cook, A., Nilsson, B., Johnson, G.V.W., 2016. Mechanisms of tau and A $\beta$ -induced excitotoxicity. *Brain Res.* 1634, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.048>

- Pancoast, M., Dobyns, W., Golden, J.A., 2005. Interneuron deficits in patients with the Miller-Dieker syndrome. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 400–404. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0979-z>
- Paoletti, P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Paoletti, P., Neyton, J., 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Park, J.-A., Choi, K.-S., Kim, S.-Y., Kim, K.-W., 2003. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 247–253.
- Pavlova, M.A., Krägeloh-Mann, I., 2013. Limitations on the developing preterm brain: impact of periventricular white matter lesions on brain connectivity and cognition. *Brain J. Neurol.* 136, 998–1011. <https://doi.org/10.1093/brain/aws334>
- Peoples, R.W., White, G., Lovinger, D.M., Weight, F.F., 1997. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-activated current in mouse hippocampal neurones: whole-cell patch-clamp analysis. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1035–1042. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701483>
- Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., Pietrini, G., 2000. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J. Neurochem.* 75, 1076–1084.
- Pérez-Otaño, I., Ehlers, M.D., 2004. Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals* 13, 175–189. <https://doi.org/10.1159/000077524>
- Petroff, O.A.C., 2002. GABA and glutamate in the human brain. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 8, 562–573.
- Pham, L.-D.D., Hayakawa, K., Seo, J.H., Nguyen, M.-N., Som, A.T., Lee, B.J., Guo, S., Kim, K.-W., Lo, E.H., Arai, K., 2012. Crosstalk between oligodendrocytes and cerebral endothelium contributes to vascular remodeling after white matter injury. *Glia* 60, 875–881. <https://doi.org/10.1002/glia.22320>
- Pierce, D.R., Williams, D.K., Light, K.E., 1999. Purkinje cell vulnerability to developmental ethanol exposure in the rat cerebellum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 1650–1659.
- Pons-Vázquez, S., Gallego-Pinazo, R., Galbis-Estrada, C., Zanon-Moreno, V., Garcia-Medina, J.J., Vila-Bou, V., Sanz-Solana, P., Pinazo-Durán, M.D., 2011. Combined pre- and postnatal

ethanol exposure in rats disturbs the myelination of optic axons. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 46, 514–522. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agr063>

Popova, S., Lange, S., Burd, L., Rehm, J., 2016. The Economic Burden of Fetal Alcohol Spectrum Disorder in Canada in 2013. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 51, 367–375. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agg117>

Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., Rehm, J., 2017. Global Prevalence of Alcohol Use and Binge Drinking During Pregnancy and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0077>

Porcionatto, M.A., 2006. The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 39, 313–320. <https://doi.org/S0100-879X2006000300001>

Porte, B., Hardouin, J., Zerdoumi, Y., Derambure, C., Hauchecorne, M., Dupre, N., Obry, A., Lequerre, T., Bekri, S., Gonzalez, B., Flaman, J.M., Marret, S., Cosette, P., Leroux, P., 2017. Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 495–513. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630557>

Pozas, E., Ibáñez, C.F., 2005. GDNF and GFR $\alpha$ 1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* 45, 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.043>

Pregno, G., Zamburlin, P., Gambarotta, G., Farcito, S., Licheri, V., Fregnan, F., Perroteau, I., Lovisolò, D., Bovolín, P., 2011. Neuregulin1/ErbB4-induced migration in ST14A striatal progenitors: calcium-dependent mechanisms and modulation by NMDA receptor activation. *BMC Neurosci.* 12, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-103>

Prior, B.M., Yang, H.T., Terjung, R.L., 2004. What makes vessels grow with exercise training? *J. Appl. Physiol.* 97, 1119–1128. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00035.2004>

Radek, K.A., Kovacs, E.J., Gallo, R.L., DiPietro, L.A., 2008. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H174–184. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00699.2007>

Ramaswamy, P., Aditi Devi, N., Hurmath Fathima, K., Dalavaikodihalli Nanjaiah, N., 2014. Activation of NMDA receptor of glutamate influences MMP-2 activity and proliferation of glioma cells. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 35, 823–829. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1604-5>

Rauch, U., 2004. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 2031–2045. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4043-x>

Resendiz, M., Chen, Y., Oztürk, N.C., Zhou, F.C., 2013. Epigenetic medicine and fetal alcohol spectrum disorders. *Epigenomics* 5, 73–86. <https://doi.org/10.2217/epi.12.80>

- Resendiz, M., Mason, S., Lo, C.-L., Zhou, F.C., 2014. Epigenetic regulation of the neural transcriptome and alcohol interference during development. *Front. Genet.* 5, 285. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00285>
- Riley, E.P., Infante, M.A., Warren, K.R., 2011. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol. Rev.* 21, 73–80. <https://doi.org/10.1007/s11065-011-9166-x>
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674. <https://doi.org/10.1038/386671a0>
- Risau, W., Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
- Rizzo, M.T., Leaver, H.A., 2010. Brain Endothelial Cell Death: Modes, Signaling Pathways, and Relevance to Neural Development, Homeostasis, and Disease. *Mol. Neurobiol.* 42, 52–63. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8132-6>
- Roberts, A.C., Díez-García, J., Rodriguiz, R.M., López, I.P., Luján, R., Martínez-Turrillas, R., Picó, E., Henson, M.A., Bernardo, D.R., Jarrett, T.M., Clendeninn, D.J., López-Mascaraque, L., Feng, G., Lo, D.C., Wesseling, J.F., Wetsel, W.C., Philpot, B.D., Pérez-Otaño, I., 2009. Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.016>
- Robinson, S., Li, Q., Dechant, A., Cohen, M.L., 2006. Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. *J. Neurosurg.* 104, 396–408. <https://doi.org/10.3171/ped.2006.104.6.396>
- Roebuck, T.M., Simmons, R.W., Mattson, S.N., Riley, E.P., 1998. Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 252–258.
- Rompala, G.R., Zsiros, V., Zhang, S., Kolata, S.M., Nakazawa, K., 2013. Contribution of NMDA receptor hypofunction in prefrontal and cortical excitatory neurons to schizophrenia-like phenotypes. *PLoS One* 8, e61278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061278>
- Roux, C., Aligny, C., Lesueur, C., Girault, V., Brunel, V., Ramdani, Y., Genty, D., Driouich, A., Laquerrière, A., Marret, S., Brasse-Lagnel, C., Gonzalez, B.J., Bekri, S., 2015. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. *Exp. Neurol.* 267, 177–193. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.037>
- Roymans, D., Slegers, H., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur. J. Biochem.* 268, 487–498.
- Rozario, T., DeSimone, D.W., 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>



- 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, 483–496. <https://doi.org/10.1002/jnr.20963>
- Rueda, C.B., Traba, J., Amigo, I., Llorente-Folch, I., González-Sánchez, P., Pardo, B., Esteban, J.A., del Arco, A., Satrústegui, J., 2015. Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCA3/SLC25A23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3566–3581. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2702-14.2015>
- Ruediger, T., Bolz, J., 2007. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 104–115. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_8)
- Ruhrberg, C., Bautsch, V.L., 2013. Neurovascular development and links to disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1675–1684. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1277-5>
- Saghatelyan, A., 2009. Role of blood vessels in the neuronal migration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.006>
- Sanderson, J.L., Gorski, J.A., Dell'Acqua, M.L., 2016. NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. *Neuron* 89, 1000–1015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.043>
- Sanes, J.N., 2000. Skill learning: Motor cortex rules for learning and memory. *Curr. Biol.* 10, R495–R497. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00557-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00557-1)
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., Roche, K.W., 2013. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 19, 62–75. <https://doi.org/10.1177/1073858411435129>
- Schmid, R.S., Anton, E.S., 2003. Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 13, 219–224.
- Sellier, E., Platt, M.J., Andersen, G.L., Krägeloh-Mann, I., De La Cruz, J., Cans, C., Surveillance of Cerebral Palsy Network, 2016. Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. *Dev. Med. Child Neurol.* 58, 85–92. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12865>
- Shenoda, B.B., 2017. An Overview of the Mechanisms of Abnormal GABAergic Interneuronal Cortical Migration Associated with Prenatal Ethanol Exposure. *Neurochem. Res.* 42, 1279–1287. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2169-5>
- Siemerink, M.J., Klaassen, I., Van Noorden, C.J.F., Schlingemann, R.O., 2013. Endothelial tip cells in ocular angiogenesis: potential target for anti-angiogenesis therapy. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 61, 101–115. <https://doi.org/10.1369/0022155412467635>
- Simmons, R.W., Thomas, J.D., Levy, S.S., Riley, E.P., 2010. Motor response programming and movement time in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Fayettev. N* 44, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.02.013>

- Skorput, A.G.J., Gupta, V.P., Yeh, P.W.L., Yeh, H.H., 2015. Persistent Interneuronopathy in the Prefrontal Cortex of Young Adult Offspring Exposed to Ethanol In Utero. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 10977–10988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1462-15.2015>
- Smith, S.M., Garic, A., Berres, M.E., Flentke, G.R., 2014. Genomic factors that shape craniofacial outcome and neural crest vulnerability in FASD. *Front. Genet.* 5, 224. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00224>
- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., Parent, A., Saghatelian, A., 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4172–4188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4956-08.2009>
- Sokol, R.J., Delaney-Black, V., Nordstrom, B., 2003. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA* 290, 2996–2999. <https://doi.org/10.1001/jama.290.22.2996>
- Sommer, J.B., Bach, A., Malá, H., Strømgaard, K., Mogensen, J., Pickering, D.S., 2017. In vitro and in vivo effects of a novel dimeric inhibitor of PSD-95 on excitotoxicity and functional recovery after experimental traumatic brain injury. *Eur. J. Neurosci.* 45, 238–248. <https://doi.org/10.1111/ejn.13483>
- Sood, B., Delaney-Black, V., Covington, C., Nordstrom-Klee, B., Ager, J., Templin, T., Janisse, J., Martier, S., Sokol, R.J., 2001. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. dose-response effect. *Pediatrics* 108, E34.
- Southwell, D.G., Paredes, M.F., Galvao, R.P., Jones, D.L., Froemke, R.C., Sebe, J.Y., Alfaro-Cervello, C., Tang, Y., Garcia-Verdugo, J.M., Rubenstein, J.L., Baraban, S.C., Alvarez-Buylla, A., 2012. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491, 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature11523>
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Kan, E., Thompson, P.M., Riley, E.P., Toga, A.W., 2008. Abnormal cortical thickness and brain-behavior correlation patterns in individuals with heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 18, 136–144. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm039>
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Thompson, P.M., Jernigan, T.L., Riley, E.P., Toga, A.W., 2001. Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology* 57, 235–244.
- Spadoni, A.D., McGee, C.L., Fryer, S.L., Riley, E.P., 2007. Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.006>
- Spitzer, N.C., 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707–712. <https://doi.org/10.1038/nature05300>

- Steinhausen, H.C., Willms, J., Spohr, H.L., 1993. Long-term psychopathological and cognitive outcome of children with fetal alcohol syndrome. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 32, 990–994. <https://doi.org/10.1097/00004583-199309000-00016>
- Streissguth, A.P., Aase, J.M., Clarren, S.K., Randels, S.P., LaDue, R.A., Smith, D.F., 1991a. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA* 265, 1961–1967.
- Streissguth, A.P., Randels, S.P., Smith, D.F., 1991b. A test-retest study of intelligence in patients with fetal alcohol syndrome: implications for care. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 30, 584–587. <https://doi.org/10.1097/00004583-199107000-00009>
- Subbanna, S., Nagre, N.N., Umapathy, N.S., Pace, B.S., Basavarajappa, B.S., 2015. Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R Exon1 histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* 18. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu028>
- Sudheer, S., Bhushan, R., Fauler, B., Lehrach, H., Adjaye, J., 2012. FGF Inhibition Directs BMP4-Mediated Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Syncytiotrophoblast. *Stem Cells Dev.* 21, 2987–3000. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0099>
- Sulik, K.K., 2005. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 230, 366–375.
- Swayze, V.W., Johnson, V.P., Hanson, J.W., Piven, J., Sato, Y., Giedd, J.N., Mosnik, D., Andreasen, N.C., 1997. Magnetic resonance imaging of brain anomalies in fetal alcohol syndrome. *Pediatrics* 99, 232–240.
- Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., McKay, R.D.G., Kaczmarek, L., 2002. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 920–930.
- Tam, S.J., Watts, R.J., 2010. Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 379–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-152829>
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F., 2003. Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5803–5813. <https://doi.org/10.1242/dev.00825>
- Tanaka, D.H., Nakajima, K., 2012. GABAergic interneuron migration and the evolution of the neocortex. *Dev. Growth Differ.* 54, 366–372. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01351.x>
- Tanaka, K., 2013. [Brain development and glutamate]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo* 65, 1121–1132.

- Tau, G.Z., Peterson, B.S., 2010. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 35, 147–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>
- Tenkova, T., Young, C., Dikranian, K., Labruyere, J., Olney, J.W., 2003. Ethanol-induced apoptosis in the developing visual system during synaptogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2809–2817.
- Titterness, A.K., Christie, B.R., 2012. Prenatal ethanol exposure enhances NMDAR-dependent long-term potentiation in the adolescent female dentate gyrus. *Hippocampus* 22, 69–81. <https://doi.org/10.1002/hipo.20849>
- Tong, G., Takahashi, H., Tu, S., Shin, Y., Talantova, M., Zago, W., Xia, P., Nie, Z., Goetz, T., Zhang, D., Lipton, S.A., Nakanishi, N., 2008. Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 99, 122–132. <https://doi.org/10.1152/jn.01044.2006>
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., Kikutani, H., 2005. FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1712–1719. <https://doi.org/10.1038/nn1596>
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010a. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010b. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Tsai, H.-H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A.-C., Kuo, C.J., Chan, J.R., Daneman, R., Fancy, S.P.J., 2016. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379–384. <https://doi.org/10.1126/science.aad3839>
- Tsai, V.W.-W., Scott, H.L., Lewis, R.J., Dodd, P.R., 2005. The role of group I metabotropic glutamate receptors in neuronal excitotoxicity in Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* 7, 125–141.
- Tsang, T.W., Carmichael Olson, H., Latimer, J., Fitzpatrick, J., Hand, M., Oscar, J., Carter, M., Elliott, E.J., 2017. Behavior in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Remote Australia: A Population-Based Study. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 38, 528–537. <https://doi.org/10.1097/DBP.0000000000000463>
- Tsang, T.W., Lucas, B.R., Carmichael Olson, H., Pinto, R.Z., Elliott, E.J., 2016. Prenatal Alcohol Exposure, FASD, and Child Behavior: A Meta-analysis. *Pediatrics* 137, e20152542. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-2542>

- Valcanis, H., Tan, S.-S., 2003. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5113–5122.
- Valenzuela, C.F., Partridge, L.D., Mameli, M., Meyer, D.A., 2008. Modulation of glutamatergic transmission by sulfated steroids: role in fetal alcohol spectrum disorder. *Brain Res. Rev.* 57, 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.009>
- Vallés, S., Sancho-Tello, M., Miñana, R., Climent, E., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., 1996. Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *J. Neurochem.* 67, 2425–2433.
- Van Overbeeke, J.J., Hillen, B., Tulleken, C.A., 1991. A comparative study of the circle of Willis in fetal and adult life. The configuration of the posterior bifurcation of the posterior communicating artery. *J. Anat.* 176, 45–54.
- Vance, K.M., Hansen, K.B., Traynelis, S.F., 2012. GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *J. Physiol.* 590, 3857–3875. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234062>
- Vasudevan, A., Bhide, P.G., 2008. Angiogenesis in the embryonic CNS: a new twist on an old tale. *Cell Adhes. Migr.* 2, 167–169.
- Vazin, T., Ashton, R.S., Conway, A., Rode, N.A., Lee, S.M., Bravo, V., Healy, K.E., Kane, R.S., Schaffer, D.V., 2014. The effect of multivalent Sonic hedgehog on differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic and GABAergic neurons. *Biomaterials* 35, 941–948. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.025>
- Vemuri, M.C., Chetty, C.S., 2005. Alcohol impairs astroglialogenesis by stem cells in rodent neurospheres. *Neurochem. Int.* 47, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.04.019>
- Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G., Nottebaum, A.F., 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* 19, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.10.001>
- Viljoen, D.L., Gossage, J.P., Brooke, L., Adnams, C.M., Jones, K.L., Robinson, L.K., Hoyme, H.E., Snell, C., Khaole, N.C.O., Kodituwakku, P., Asante, K.O., Findlay, R., Quinton, B., Marais, A.-S., Kalberg, W.O., May, P.A., 2005. Fetal alcohol syndrome epidemiology in a South African community: a second study of a very high prevalence area. *J. Stud. Alcohol* 66, 593–604.
- Villette, V., Guigue, P., Picardo, M.A., Sousa, V.H., Leprince, E., Lachamp, P., Malvache, A., Tressard, T., Cossart, R., Baude, A., 2016. Development of early-born  $\gamma$ -Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood. *J. Comp. Neurol.* 524, 2440–2461. <https://doi.org/10.1002/cne.23961>
- Vishnoi, S., Raisuddin, S., Parvez, S., 2016. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer* 35, 365–374. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016016399>

- Volpe, J.J., 2011. Systemic inflammation, oligodendroglial maturation, and the encephalopathy of prematurity. *Ann. Neurol.* 70, 525–529. <https://doi.org/10.1002/ana.22533>
- Volpe, J.J., 2009a. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin. Pediatr. Neurol.* 16, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2009.09.005>
- Volpe, J.J., 2009b. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* 8, 110–124. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70294-1)
- Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., Kozlowski, P., Tarnawski, M., Dumas, R., Rabe, A., 2001. Effect of a single embryonic exposure to alcohol on glucose transporter (GLUT-1) distribution in brain vessels of aged mouse. *J. Neurocytol.* 30, 167–174.
- Wang, P.Y., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Wenthold, R.J., Brenowitz, S.D., 2011. Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9289–9297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5639-10.2011>
- Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C.Z., Markram, H., 2002. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 12, 395–410.
- Washburn, S.E., Ramadoss, J., Chen, W.-J.A., Cudd, T.A., 2015. Effects of all three trimester moderate binge alcohol exposure on the foetal hippocampal formation and olfactory bulb. *Brain Inj.* 29, 104–109. <https://doi.org/10.3109/02699052.2014.947629>
- Wass, T.S., Persutte, W.H., Hobbins, J.C., 2001. The impact of prenatal alcohol exposure on frontal cortex development in utero. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 737–742. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.117656>
- Wilhelm, C.J., Guizzetti, M., 2015. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 65. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00065>
- Williams, L., Jackson, C.P.T., Choe, N., Pelland, L., Scott, S.H., Reynolds, J.N., 2014. Sensory-motor deficits in children with fetal alcohol spectrum disorder assessed using a robotic virtual reality platform. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 116–125. <https://doi.org/10.1111/acer.12225>
- Willoughby, K.A., Sheard, E.D., Nash, K., Rovet, J., 2008. Effects of prenatal alcohol exposure on hippocampal volume, verbal learning, and verbal and spatial recall in late childhood. *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS* 14, 1022–1033. <https://doi.org/10.1017/S1355617708081368>
- Wittko-Schneider, I.M., Schneider, F.T., Plate, K.H., 2014. Cerebral angiogenesis during development: who is conducting the orchestra? *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1135, 3–20. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_1)

- Won, C., Lin, Z., Kumar T, P., Li, S., Ding, L., Elkhali, A., Szabó, G., Vasudevan, A., 2013a. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat. Commun.* 4, 2149. <https://doi.org/10.1038/ncomms3149>
- Won, C., Lin, Z., Kumar T, P., Li, S., Ding, L., Elkhali, A., Szabó, G., Vasudevan, A., 2013b. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat. Commun.* 4, 2149. <https://doi.org/10.1038/ncomms3149>
- Wonders, C.P., Anderson, S.A., 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 687–696. <https://doi.org/10.1038/nrn1954>
- Wong, H.-K., Liu, X.-B., Matos, M.F., Chan, S.F., Pérez-Otaño, I., Boysen, M., Cui, J., Nakanishi, N., Trimmer, J.S., Jones, E.G., Lipton, S.A., Sucher, N.J., 2002. Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 450, 303–317. <https://doi.org/10.1002/cne.10314>
- Wu, S., Esumi, S., Watanabe, K., Chen, J., Nakamura, K.C., Nakamura, K., Kometani, K., Minato, N., Yanagawa, Y., Akashi, K., Sakimura, K., Kaneko, T., Tamamaki, N., 2011. Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Dev. Camb. Engl.* 138, 2499–2509. <https://doi.org/10.1242/dev.063032>
- Wyper, K.R., Rasmussen, C.R., 2011. Language impairments in children with fetal alcohol spectrum disorders. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol. J. Ther. Popul. Pharmacologie Clin.* 18, e364-376.
- Xiang, Y., Kim, K.-Y., Gelernter, J., Park, I.-H., Zhang, H., 2015. Ethanol upregulates NMDA receptor subunit gene expression in human embryonic stem cell-derived cortical neurons. *PLoS One* 10, e0134907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134907>
- Xu, G., Broadbelt, K.G., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Belliveau, R.A., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., Kinney, H.C., 2011. Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 841–858. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31822f471c>
- Xu, M., Smothers, C.T., Trudell, J., Woodward, J.J., 2012. Ethanol inhibition of constitutively open N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 218–226. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.187179>
- Xu, M., Smothers, C.T., Woodward, J.J., 2015. Cysteine substitution of transmembrane domain amino acids alters the ethanol inhibition of GluN1/GluN2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 91–101. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.222034>
- Yalcin, E.B., McLean, T., Tong, M., de la Monte, S.M., 2017. Progressive white matter atrophy with altered lipid profiles is partially reversed by short-term abstinence in an experimental model of alcohol-related neurodegeneration. *Alcohol Fayettev. N* 65, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.05.008>
- Yau, H.-J., Wang, H.-F., Lai, C., Liu, F.-C., 2003. Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons

tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 13, 252–264.

Yeh, C.-M., Lin, C.-W., Yang, J.-S., Yang, W.-E., Su, S.-C., Yang, S.-F., 2016. Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. *Oncotarget* 7, 21952–21967. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8009>

Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., Anton, E.S., 2007. Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One* 2, e794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000794>

Young, C., Klocke, B.J., Tenkova, T., Choi, J., Labruyere, J., Qin, Y.-Q., Holtzman, D.M., Roth, K.A., Olney, J.W., 2003. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ.* 10, 1148–1155. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401277>

Yozu, M., Tabata, H., Nakajima, K., 2005. The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7268–7277. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2072-05.2005>

Zhao, Y., Ren, H., Dwyer, D.S., Peoples, R.W., 2015a. Different sites of alcohol action in the NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunits. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.018>

Zhao, Y., Ren, H., Dwyer, D.S., Peoples, R.W., 2015b. Different sites of alcohol action in the NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunits. *Neuropharmacology* 97, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.018>

Zheng, C.-Y., Wang, Y.-X., Kachar, B., Petralia, R.S., 2011. Differential localization of SAP102 and PSD-95 is revealed in hippocampal spines using super-resolution light microscopy. *Commun. Integr. Biol.* 4, 104–105. <https://doi.org/10.4161/cib.4.1.14172>

Zhu, S., Stein, R.A., Yoshioka, C., Lee, C.-H., Goehring, A., Mchaourab, H.S., Gouaux, E., 2016. Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell* 165, 704–714. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.028>

Zink, M., Ferbert, T., Frank, S.T., Seufert, P., Gebicke-Haerter, P.J., Spanagel, R., 2011. Perinatal exposure to alcohol disturbs spatial learning and glutamate transmission-related gene expression in the adult hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 34, 457–468. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07776.x>

Zorumski, C.F., Mennerick, S., Izumi, Y., 2014a. Acute and Chronic Effects of Ethanol on Learning-Related Synaptic Plasticity. *Alcohol Fayettev. N* 48, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.09.045>



Zorumski, C.F., Mennerick, S., Izumi, Y., 2014b. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol Fayettev.* N 48, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.09.045>