Modulation de la migration neuronale par les neurotransmetteurs GABA et glutamate : aspects fondamentaux et implications pathologiques

Jean-Bernard Manent

▶ **To cite this version:**

Jean-Bernard Manent. Modulation de la migration neuronale par les neurotransmetteurs GABA et glutamate : aspects fondamentaux et implications pathologiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2006. Français. NNT : . tel-00103505v2

HAL Id: tel-00103505

https://theses.hal.science/tel-00103505v2

Submitted on 4 Oct 2006

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

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

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

AIX-MARSEILLE II

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-Bernard MANENT

le 19 juin 2006

Titre :

Modulation de la migration neuronale par les neurotransmetteurs GABA et glutamate : aspects fondamentaux et implications pathologiques

Jury :

Pr. André NIEOULLON, président

Dr. Pierre GRESSENS, rapporteur

Dr. Pierre-Marie LLEDO, rapporteur

Dr. Christine METIN, examinateur

Dr. Alfonso REPRESA, directeur de thèse

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

AIX-MARSEILLE II

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-Bernard MANENT

le 19 juin 2006

Titre :

Modulation de la migration neuronale par les neurotransmetteurs GABA et glutamate : aspects fondamentaux et implications pathologiques

Jury :

Pr. André NIEOULLON, président

Dr. Pierre GRESSENS, rapporteur

Dr. Pierre-Marie LLEDO, rapporteur

Dr. Christine METIN, examinateur

Dr. Alfonso REPRESA, directeur de thèse

Remerciements.

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, dirigé par le Dr. Ben-Ari, que je tiens chaleureusement à remercier pour l'environnement scientifique et humain qu'il sait y cultiver. Les équipements et moyens dont j'ai pu bénéficier au sein de cet institut ont contribué efficacement à la réussite de mes travaux, tout comme les discussions et échanges qui y ont eu lieu.

Je remercie le Pr. Nieoullon, qui a accepté de présider le jury de cette thèse, les Drs Gressens et Lledo, qui ont accepté d'évaluer ce travail, ainsi que le Dr. Métin.

Je tiens à exprimer une profonde reconnaissance à Alfonso, mon directeur de thèse et mentor, qui m'a accompagné et guidé tout au long de cette aventure scientifique. Sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, ainsi que ses qualités scientifiques et humaines m'ont permis de réaliser cette thèse dans des conditions idéales. Il a su me transmettre sa vision de la recherche, son enthousiasme et sa passion, influençant de manière indélébile ma carrière scientifique à venir.

Je tiens à remercier très chaleureusement Isabel pour son extraordinaire gentillesse et son aide précieuse ; les moments passés en sa compagnie en pièce d'histologie auront marqué mon séjour au laboratoire. Je remercie Laurent pour sa persévérance lors de l'enregistrement des cellules en migration, sa connaissance encyclopédique de la bibliographie et sa bonne humeur. Je remercie également les autres membres de l'équipe, actuels et passés : Hélène, heureuse maman du petit frère d'Eva et Michaël, qui étudie les têtards en Californie. Je tiens également à remercier Christophe pour son aide et ses conseils toujours judicieux et lui souhaite le meilleur pour sa thèse.

Je remercie les étudiants du laboratoire, des plus anciens aux plus jeunes, pour avoir contribué à la bonne ambiance qui y règne. Je remercie également Vincent pour son amitié et sa gentillesse.

Je remercie tendrement Emmanuelle pour son soutien quotidien et sa compréhension alors que je la délaissais lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'associe mes parents à l'accomplissement de ce travail, rendu possible grâce à leurs encouragements et à leur soutien et j'ai une pensée émue pour mes grands-parents, à qui je dédie ce manuscrit.

La dernière année de thèse a bénéficié du soutien de la Ligue Française Contre l'Epilepsie et du laboratoire UCB-Pharma.

Résumé :

Les progrès récents des techniques d'imagerie cérébrale ont permis d'identifier les défauts de migration neuronale comme cause majeure de retards mentaux, d'épilepsies et de nombreux syndromes neurologiques. La connaissance des mécanismes intervenant dans la modulation de la migration neuronale est donc capitale afin de prévenir de telles anomalies du développement cérébral fœtal, dont le coût socio-économique est élevé. Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans le cadre de cette thématique.

De nombreuses études ont identifié les neurotransmetteurs comme des molécules porteuses d'informations à un niveau plus large que celui de la seule transmission synaptique. En effet, avant même la formation de synapses, les neurotransmetteurs sont présents au sein du tissu cérébral embryonnaire et exercent des actions variées, influençant les étapes de genèse, migration, différentiation et de mort neuronale. Nous avons évalué les rôles joués par les neurotransmetteurs GABA et glutamate au cours de la migration neuronale, ainsi que les conséquences de la perturbation de leurs actions durant la construction du cerveau fœtal.

Afin d'étudier la migration neuronale, nous avons mis au point des préparations originales permettant la visualisation directe de neurones fluorescents en migration. Grâce à elles, nous avons démontré l'existence d'une modulation de la migration neuronale par le GABA et glutamate, libérés selon un mode de sécrétion « non vésiculaire » et agissant par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Nous avons montré que les mécanismes modulant la migration sont caractéristiques du type neuronal et du mode migratoire considéré. Ainsi, la migration radiale des futurs neurones glutamatergiques est modulée majoritairement par l'activation de récepteurs $GABA_A$, alors que la migration tangentielle des futurs interneurones GABAergiques est modulée par l'activation de récepteurs glutamatergiques de type AMPA. Ces résultats suggèrent également l'existence d'une communication précoce entre neurones glutamatergiques et interneurones, pouvant contribuer à la construction cérébrale. Par la suite, nous avons évalué le risque de survenue de malformations cérébrales fœtales, suite à l'administration de médicaments anti-épileptiques, qui potentialisent l'action du GABA, limitent l'action du glutamate et modulent l'activité des canaux ioniques. Nous avons observé une incidence accrue de micro-dysplasies cortico-hippocampiques, à rapprocher de défauts de migration, suite à l'administration chez la rate gestante de valproate et de vigabatrin à des doses compatibles avec celles employées pour le traitement de la femme enceinte épileptique.

Ces résultats soulignent le rôle central joué par les neurotransmetteurs GABA et glutamate, en tant que signaux informatifs majeurs du cerveau en développement. De plus, ils suggèrent le besoin d'évaluer l'impact de l'exposition à des composés pharmacologiques interférant avec les actions de ces neurotransmetteurs lors de la maturation cérébrale.

Table des matières

AVANT-PROPOS.....1

INTRODUCTION GENERALE.....5

CHAPITRE 1. NEUROGENESE ET MODES DE MIGRATION NEURONALE.....7
1.1 REGIONALISATION ET SPECIFICATION DU TELENCEPHALE.....7
1.2 NEUROGENESE CORTICALE ET MIGRATION RADIALE DES NEURONES EXCITATEURS.....9
1.2.1 La zone ventriculaire du cortex cérébral embryonnaire, zone de genèse des neurones excitateurs.....9
1.2.2 Les modes de migration radiale des neurones excitateurs.....17
1.3 NEUROGENESE SOUS-CORTICALE ET MIGRATION TANGENTIELLE DES INTERNEURONES.....31
1.3.1 La zone ventriculaire du primordium des ganglions de la base, zone de genèse de la majorité des interneurones corticaux, hippocampiques et olfactifs.....31
1.3.2 Les voies de migration tangentielle des interneurones.....39
1.4 MODELE GENERAL.....43

CHAPITRE 2. RECEPTEURS ET TRANSPORTEURS DES NEUROTRANSMETTEURS : TYPES ET EXPRESSION PRECOCE.....45
2.1 LES RECEPTEURS ET TRANSPORTEURS DU GLUTAMATE.....45
2.1.1 Les récepteurs AMPA.....47
2.1.2 Les récepteurs kaïnate.....51
2.1.3 Les récepteurs NMDA.....53
2.1.5 Les transporteurs du glutamate.....57
2.2 LES RECEPTEURS ET TRANSPORTEURS DU GABA.....61
2.2.1 Les récepteurs $GABA_A$.....63
2.2.2 Les récepteurs $GABA_C$.....67
2.2.3 Les récepteurs $GABA_B$.....67
2.2.4 Les transporteurs du GABA.....69
2.3 SCHEMA RECAPITULATIF : EXPRESSION PRECOCE DES RECEPTEURS DES NEUROTRANSMETTEURS.....71
2.4 ACTION DEPOLARISANTE DU GABA ET SYNERGIE GABA/NMDA.....71
2.4.1 Le GABA est dépolarisant aux stades précoces du développement.....71
2.4.2 Synergie GABA/NMDA.....73

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA MIGRATION NEURONALE PAR LES NEUROTRANSMETTEURS.....77
3.1 ACTIONS MODULATRICES DU GABA AU COURS DE LA MIGRATION NEURONALE.....77
3.1.1 Modulation de la migration des neurones corticaux par le GABA.....77
3.1.2 Modulation de la migration interneuronale par le GABA.....79
3.1.3 Modulation de la migration rostrale par le GABA.....81
3.2 ACTIONS MODULATRICES DU GLUTAMATE AU COURS DE LA MIGRATION NEURONALE.....83
3.2.1 Modulation de la migration des neurones corticaux par le glutamate.....83
3.2.2 Modulation de la migration interneuronale par le glutamate.....83
3.2.3 Modulation de la migration des cellules granulaires du cervelet.....85
3.3 MODULATION DE LA MIGRATION NEURONALE PAR LE GABA ET LE GLUTAMATE, MODELE GENERAL.....87
3.4 ACTIONS PARACRINES DES NEUROTRANSMETTEURS.....87
3.4.1 Etat de la synaptogenèse aux stades périnatals.....87
3.4.2 Communication intercellulaire avant la formation de synapses.....89

CHAPITRE 4. PERTURBATION DE LA CONSTRUCTION CEREBRALE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX : L'ETHANOL ET DE LA COCAÏNE.....93
4.1 ETHANOL.....93
4.1.1 Syndrome d'alcoolisation fœtale.....93
4.1.2 Mécanismes impliqués.....95
4.2 COCAÏNE.....97
4.2.1 Exposition fœtale à la cocaïne.....97
4.2.2 Mécanismes impliqués.....97
4.3 AUTRES FACTEURS TERATOGENES POTENTIELS.....99

RESULTATS.....101

ARTICLE 1.....103
ARTICLE 2.....133
ARTICLE 3.....161

DISCUSSION GENERALE.....211

Les neurotransmetteurs, des messagers paracrines.....213
Différents modes de migration, différentes actions modulatrices de la migration par les neurotransmetteurs.....217
Interactions précoces entre neurones excitateurs et interneurones.....221
Défauts migratoires après exposition fœtale aux antiépileptiques.....223
Conclusion.....225

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....229

Table des illustrations

Figure 1. Régionalisation du télencéphale.....6
Figure 2. Histoire du neuroépithélium périventriculaire.....10
Figure 3. Histoire de la glie radiaire.....12
Figure 4. Les cellules de la glie radiaire sont les progéniteurs des neurones corticaux.....14
Figure 5. Modes de migration radiale.....16
Figure 6. Neurogenèse et migration corticale.....20
Figure 7. Les quatre phases de migration radiale aux stades tardifs du développement cortical.....22
Figure 8. Neurogenèse et modes de migration hippocampiques.....26
Figure 9. Premières observations de neurones en migration tangentielle issus du sub-pallium.....30
Figure 10. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires médiales.....32
Figure 11. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires latérales.....34
Figure 12. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires caudales.....36
Figure 13. Destinée des interneurones issus des différentes éminences ganglionnaires.....38
Figure 14. Voies de migration tangentielle des interneurones.....40
Figure 15. Modèle général : migrations radiales et tangentielles.....42
Figure 16. Les récepteurs et transporteurs du glutamate, schéma général.....44
Figure 17. Structure et expression précoce des récepteurs AMPA.....46
Figure 18. Expression précoce des récepteurs kaïnate.....50
Figure 19. Expression précoce des récepteurs NMDA.....54
Figure 20. Expression précoce des transporteurs du glutamate EAAT2 et EAAT3.....58
Figure 21. Les récepteurs et transporteurs du GABA, schéma général.....60
Figure 22. Expression précoce des récepteurs $GABA_A$.....62
Figure 23. Expression précoce des récepteurs $GABA_{B1}$.....68
Figure 24. GAT-1 est exprimé mais non fonctionnel aux stades périnatals.....70
Figure 25. Expression précoce des récepteurs des neurotransmetteurs : schéma récapitulatif.....70
Figure 26. Action dépolarisante du GABA.....72
Figure 27. Action dépolarisante du GABA et synergie GABA / NMDA.....74
Figure 28. Distribution des neurotransmetteurs GABA et glutamate au sein du néocortex en développement.....76
Figure 29. Description d'une chambre de Boyden.....76
Figure 30. Actions modulatrices du GABA.....78
Figure 31. Modulation de la migration rostrale par le GABA.....80
Figure 32. Actions modulatrices du glutamate.....82
Figure 33. Modulation de la migration des cellules granulaires du cervelet.....84
Figure 34. Modulation de la migration des jeunes neurones excitateurs et des interneurones corticaux par le GABA et le glutamate.....86
Figure 35. Formation séquentielle des synapses GABA et glutamate au niveau de la région CA1 de l'hippocampe de rongeur.....88
Figure 36. Communication paracrine avant la formation des synapses.....90
Figure 37. L'exposition fœtale à l'éthanol provoque des défauts migratoires.....94
Figure 38. L'exposition fœtale à la cocaïne provoque des défauts migratoires...96

Avant-propos.

Afin de construire un cerveau adulte correctement élaboré, les jeunes neurones doivent migrer à partir de leurs zones de genèse, jusqu'à leurs emplacements définitifs au sein du tissu cérébral, où ils vont élaborer des contacts synaptiques et constituer un réseau neuronal fonctionnel. Les progrès récents des techniques d'imagerie cérébrale ont permis d'identifier les défauts de migration neuronale comme cause majeure de retards mentaux, d'épilepsies et de nombreux syndromes neurologiques. La connaissance des mécanismes intervenant dans la modulation de la migration neuronale est donc capitale afin de prévenir de telles anomalies du développement cérébral fœtal, dont le coût socio-économique est élevé. Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de cette thématique.

De nombreuses études ont identifié les neurotransmetteurs comme des molécules porteuses d'informations à un niveau plus large que celui de la seule transmission synaptique. En effet, avant même la formation de synapses, les neurotransmetteurs sont présents au sein du tissu cérébral embryonnaire et exercent des actions variées, influençant les étapes de genèse, migration, différentiation et de mort neuronale. Nous avons évalué les rôles joués par les acides aminés neurotransmetteurs GABA (acide gamma-amino-butyrique) et glutamate au cours de la migration neuronale, ainsi que les conséquences de la perturbation de leurs actions par les antiépileptiques durant la construction du cerveau fœtal.

Les résultats des travaux réalisés au cours de cette thèse seront présentés à la suite d'une introduction générale les replaçant dans un contexte bibliographique. Le premier chapitre de cette introduction sera consacré à la neurogenèse et aux modes migratoires des neurones excitateurs et des interneurones corticaux et hippocampiques. Le second chapitre sera consacré à l'expression précoce des récepteurs et transporteurs du glutamate et du GABA. Le troisième chapitre concernera les actions modulatrices de ces deux neurotransmetteurs au cours de la migration neuronale. De nombreux composés pharmacologiques étant susceptibles d'interférer avec l'action des neurotransmetteurs, le quatrième

chapitre présentera deux exemples de facteurs environnementaux perturbant la construction cérébrale fœtale : l'éthanol et de la cocaïne.

Les résultats des travaux seront alors commentés et mis en perspective dans une discussion générale, organisée en quatre parties. La première partie de cette discussion sera consacrée aux actions paracrines des neurotransmetteurs. La seconde partie portera sur les actions modulatrices des transmetteurs et leurs différences selon les modes migratoires considérés. La troisième partie portera sur les interactions précoces entre neurones excitateurs et interneurones, dès les étapes de migration. Enfin, la quatrième partie portera sur les défauts migratoires survenant après exposition fœtale aux antiépileptiques.

Introduction générale

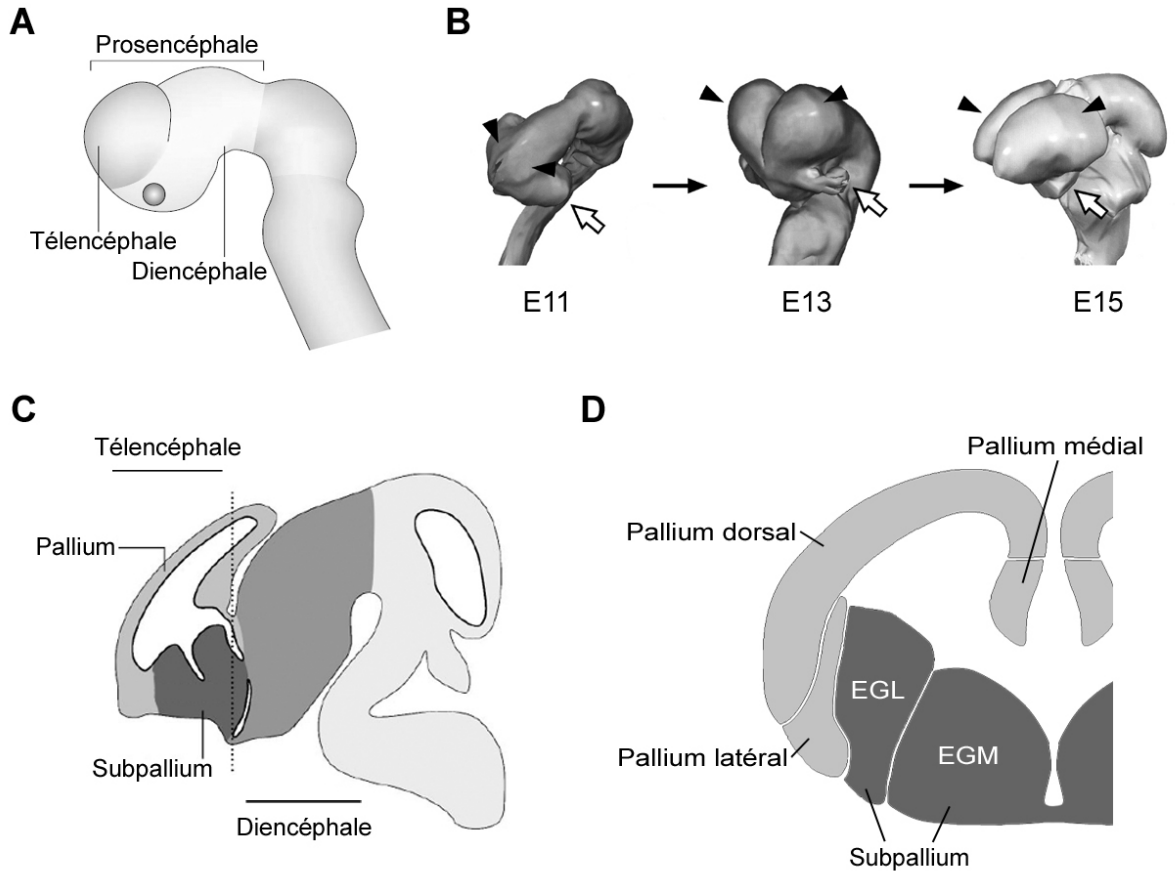


Figure 1. Régionalisation du télencéphale.
A) Schéma représentant les vésicules composant le prosencéphale, ébauche du cerveau antérieur [D'après (Rallu et al., 2002)].
B) Reconstructions tridimensionnelles illustrant l'émergence des deux vésicules télencéphaliques (pointes de flèches noires) et des ébauches des yeux (flèches blanches) chez la souris. Les deux vésicules télencéphaliques sont bien discernables dès E13 chez la souris (7 – 8 semaines chez l'Homme). [D'après (Monuki and Walsh, 2001)].
C) Coupe sagittale de cerveau de souris, illustrant la division du télencéphale en pallium (ou télencéphale dorsal, en gris clair) et subpallium (ou télencéphale ventral, en gris foncé). [D'après (Marin and Rubenstein, 2003)].
D) Coupe coronale de cerveau de souris à E13, illustrant les subdivisions du pallium (gris clair), en un pallium médial (ébauche de l'hippocampe), dorsal (ébauche du néocortex) et latéral (ébauche du cortex olfactif) et du subpallium (gris foncé), en éminence ganglionnaire latérale (EGL) et médiale (EGM), ébauches du striatum et du pallidum, et origine germinative des interneurones. [Modifié d'après (Schuurmans and Guillemot, 2002)].

Chapitre 1. Neurogenèse et modes de migration neuronale

1.1 Régionalisation et spécification du télencéphale.

Le Système Nerveux dérive du tube neural, un long tube constitué de cellules neuroépithéliales, s'allongeant au niveau de la face dorsale de l'embryon. La moelle spinale dérive de la portion caudale de ce tube, alors que la portion rostrale donne naissance au cerveau, à la suite du bourgeonnement de trois, puis cinq vésicules primitives.

Le cerveau antérieur et ses structures associées dérivent de la vésicule la plus antérieure, le prosencéphale, composé du diencéphale et du télencéphale, dont les ébauches sont constituées dès 8 jours de développement embryonnaire (E8) chez la souris (Figure 1A). À E9, à la suite de mouvements d'évagination, le télencéphale se transforme en deux vésicules, les vésicules télencéphaliques, futurs hémisphères cérébraux, qui seront identifiables dès E13 (Rallu et al., 2002 ; Shimamura et al., 1995 ; Monuki and Walsh, 2001) (Figure 1B).

Chaque vésicule télencéphalique comporte deux grandes régions (Figure 1C) : 1) un pallium dorsal, qui donnera naissance au cortex cérébral et à l'hippocampe et 2) un subpallium ventral, qui donnera naissance aux ganglions de la base.

La division pallium – subpallium peut être affinée (Figure 1D) : le télencéphale dorsal peut être subdivisé en un pallium médial (ébauche de l'hippocampe), un pallium dorsal (ébauche du néocortex) et un pallium latéral (ébauche du cortex olfactif). De même, le télencéphale ventral peut être subdivisé en plusieurs éminences ganglionnaires : l'éminence ganglionnaire latérale (EGL, ébauche du striatum), médiale (EGM, ébauche du pallidum) et caudale (EGC) (Marin and Rubenstein, 2003 ; Super et al., 1998).

Ces subdivisions, basées sur des critères morphologiques, sont étroitement corrélées avec l'expression de certains gènes, facteurs de transcription et molécules de signalisation permettant la régionalisation des zones germinatrices télencéphaliques et la spécification des progéniteurs neuraux[1] qu'elles

[1] Cellules pouvant donner naissance aux types cellulaires de la lignée neuronale et gliale.

contiennent (Schuurmans and Guillemot, 2002). Dès les stades précoces du développement embryonnaire, les parois des vésicules télencéphaliques constituent une zone ventriculaire (ZV) composée d'une mosaïque complexe de territoires germinatifs, dont les potentialités et la destinée sont distinctes et spécifiques de la structure cérébrale à construire. Ainsi, les deux types neuronaux principaux du cortex cérébral adulte, les neurones excitateurs glutamatergiques (ou cellules principales) et les interneurones GABAergiques, possèdent des origines germinatives, des voies migratoires et des modes de migration distincts :

- Les neurones excitateurs sont issus des territoires germinatifs de la zone ventriculaire du pallium dorsal et migrent radialement vers leurs couches corticales de destination ;
- Les interneurones sont issus des territoires germinatifs du subpallium ventral et migrent tangentiellement vers leurs couches de destination.

1.2 Neurogenèse corticale et migration radiale des neurones excitateurs.

1.2.1 La zone ventriculaire du cortex cérébral embryonnaire, zone de genèse des neurones excitateurs.

La zone ventriculaire du cortex cérébral embryonnaire est un neuroépithélium pseudostratifié, couche germinative qui contient les progéniteurs de la majorité des neurones excitateurs qui composeront le néocortex adulte. Les premières descriptions des cellules de la zone ventriculaire ont été publiées à la fin du XIXe siècle (Bentivoglio and Mazzarello, 1999) mais leur nature et potentialité n'ont été révélées que récemment.

Premières observations des cellules neuroépithéliales :

Kölliker (Kölliker, 1896) et His (His, 1889) sont les premiers à observer et à décrire un épithélium composé de cellules allongées, les cellules neuroépithéliales, le long du système ventriculaire du cortex cérébral embryonnaire. En utilisant la coloration de Golgi, Kölliker puis Magini

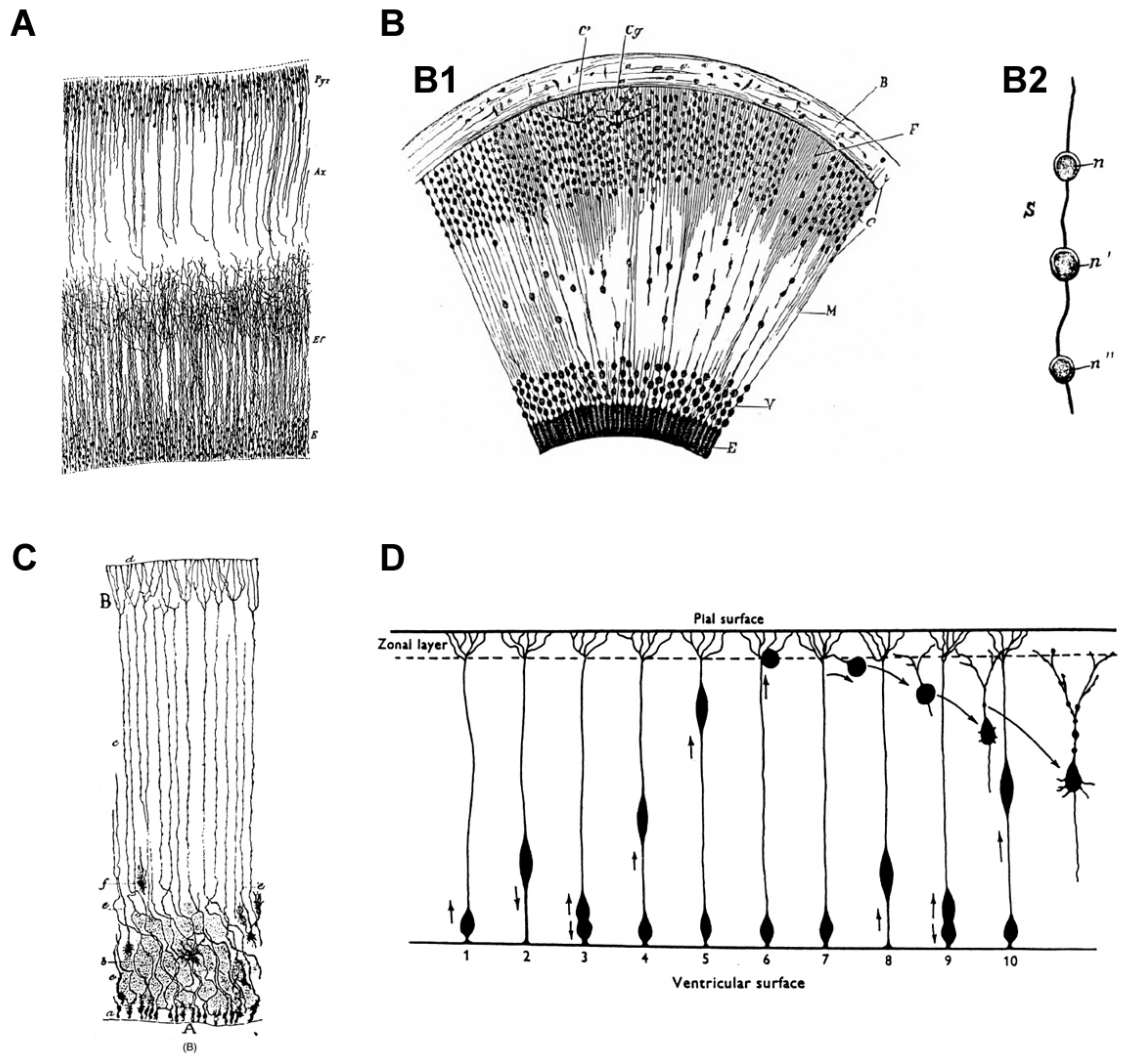


Figure 2. Histoire du neuroépithélium périventriculaire.
A) Représentation par Kölliker des cellules neuroépithéliales (E) du cortex cérébral d'un fœtus humain (4 mois de gestation). [Kölliker, 1896, tiré de (Bentivoglio and Mazzarello, 1999)]
B) Représentation par Magini des cellules neuroépithéliales (E) du cortex cérébral d'un fœtus de veau (4 mois de gestation, dont les prolongements (fibres radiales) s'étendent jusqu'à la surface externe du cerveau (B1). Noter la présence de « varicosités » (V, grossissement en B2), correspondant selon à Magini à des neurones en migration le long des fibres radiales. [Magini, 1888, tiré de (Bentivoglio and Mazzarello, 1999)]
C) Représentation par Cajal des cellules neuroépithéliales du cortex cérébral d'un lapin nouveau-né, illustrant la présence de fibres radiaires (c) et d'arborisations terminales (B) au niveau de la surface corticale externe. [Cajal, 1911, tiré de (Bentivoglio and Mazzarello, 1999)]
D) Modèle proposé par Berry et Rogers, illustrant la migration nucléaire interkinétique des cellules neuroépithéliales de Sauer (stades 1-3 et 7-9) et la migration des noyaux des neurones nouvellement générés au sein des prolongements des cellules neuroépithéliales (stades 4-6), avant détachement (stade 7) et différentiation (stades 8-10). [D'après (Berry and Rogers, 1965)]

(Magini, 1888b ; Magini, 1888a) montrent que les cellules neuroépithéliales sont cylindriques et possèdent de longues fibres radiaires qui s'étendent à travers le manteau cortical, jusqu'à la surface externe du cortex en développement (Figure 2A-B). Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1911) décrit des prolongements radiaires issus des cellules du neuroépithélium périventriculaire et formant des branches terminales au niveau de la surface externe du cortex (Figure 2C).

Evolution des concepts, rôles des cellules de la zone ventriculaire :

Magini (Magini, 1888b ; Magini, 1888a), en observant le long des fibres radiaires de nombreuses cellules sphériques (des « varicosités »), suggère que ces cellules sont les futurs neurones du cortex cérébral, alors en migration le long des fibres radiaires. Il propose ainsi que les cellules neuroépithéliales sont à l'origine des neurones (Figure 2B). Cajal (Ramon y Cajal, 1911) ne considère pas que les fibres radiaires représentent un support migratoire pour les jeunes neurones, mais plutôt un support structural pour le cerveau en développement. Il observe cependant des cellules arrondies présentant des figures mitotiques à proximité de la surface ventriculaire et les décrit comme des cellules précurseurs des neurones corticaux.

Plus tard, Sauer (Sauer, 1935) montre que les cellules neuroépithéliales sont engagées dans un processus de migration nucléaire qualifiée d'interkinétique, dans lequel leurs noyaux s'approchent de la surface ventriculaire pour se diviser, faisant ainsi le lien avec les figures mitotiques décrites par Cajal.

Berry et Rogers (Berry and Rogers, 1965) proposent que les longs prolongements des cellules épithéliales constituent un canal migratoire pour les jeunes neurones, dont les noyaux migrent au sein du prolongement pour s'en détacher après avoir atteint leur destination (Figure 2D). Ainsi, les cellules neuroépithéliales et les cellules présentant des figures mitotiques, décrites initialement par Cajal, constitueraient la même population, observée à des stades distincts du cycle cellulaire.

Les suggestions de Magini, selon lesquelles les jeunes neurones migrent le long des fibres radiaires, sont démontrées par Rakic (Rakic, 1972). En réalisant des

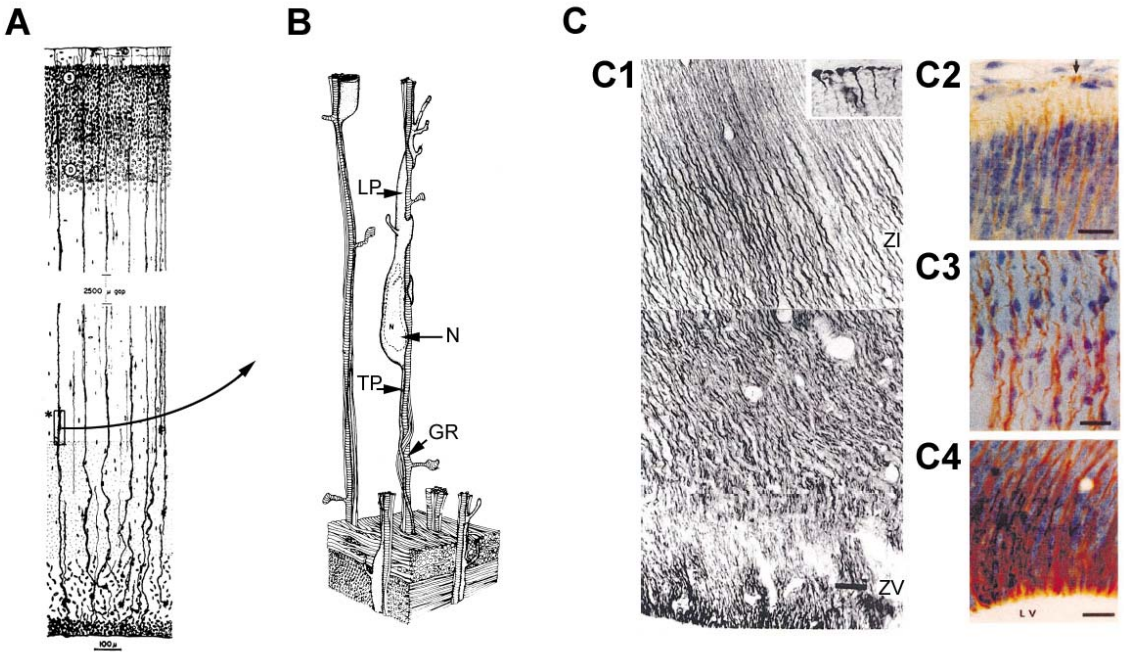


Figure 3. Histoire de la glie radiaire.
A) Représentation par Rakic d'une coupe coronale de cerveau fœtal de singe (97 jours de gestation), illustrant des neurones en migration (cadre élargi en B) le long des fibres de la glie radiaire.
B) Reconstruction d'un neurone en migration (N) le long d'une fibre radiaire (GR), réalisée à partir de clichés en microscopie électronique, montrant un prolongement de guidage (ou leading process, LP) orienté dans la direction de migration, et un trailing process (TP) à l'opposé. [A et B, d'après (Rakic, 1972)]
C) Immunomarquages avec anticorps dirigés contre la GFAP (en noir en C1 et en brun en C2-4), sur coupes de cerveau fœtal de singe (70 jours de gestation). Les fibres radiaires marquées en C1 parcourent l'épaisseur du cortex, de la zone ventriculaire (VZ) à la surface corticale externe, où elles se terminent par des pieds (insert). Des doubles marquages (C2-4) montrent des neurones (bleus) étroitement accolés aux fibres radiaires (brunes). [D'après (Levitt and Rakic, 1980)]

reconstructions à partir de clichés pris en microscopie électronique, Rakic décrit des jeunes neurones de morphologie bipolaire en migration le long des prolongements radiaires. Ces neurones ont un prolongement de guidage ou *leading process* orienté dans la direction de migration et un *trailing process* à l'opposé. Le *leading process* se termine par un cône de croissance (Figure 3A-B).

Concepts modernes, nature et potentialités des cellules de la zone ventriculaire :

La nature et les potentialités des cellules de la zone ventriculaire n'ont pu être élucidées qu'avec l'avènement des techniques de microscopie électronique, d'immunohistochimie et de biologie moléculaire.

Dans un premier temps, les travaux de Rakic révèlent la nature gliale des cellules radiaires de la zone ventriculaire, exprimant chez le primate le marqueur glial GFAP et possédant des granules de glycogène (Rakic, 1972 ; Levitt and Rakic, 1980) (Figure 3C). A la suite de ces travaux, Rakic (Rakic, 1971a ; Rakic, 1971b) introduit pour la première fois le terme de glie radiaire, à présent employé. Ces cellules ont une morphologie bipolaire caractéristique, avec un prolongement au contact de la bordure du ventricule et l'autre prolongement au contact de la surface externe du cortex cérébral. D'autres études montrent par la suite que les cellules de la glie radiaire expriment d'autres marqueurs astrocytaires, comme le transporteur du glutamate GLAST, S100β, la glutamine synthase, la vimentine, la tenascine-C et BLBP. La plupart de ces marqueurs gliaux caractéristiques sont détectés dès E12 chez la souris (Malatesta et al., 2000 ; Malatesta et al., 2003 ; Hartfuss et al., 2001).

Dans un deuxième temps, l'existence d'une transition entre les cellules neuroépithéliales précoces et les cellules de la glie radiaire, caractérisée par l'apparition de l'expression de la nestine à E9/E10 est montrée par Misson et collaborateurs (Misson et al., 1988) et Frederiksen et McKay (Frederiksen and McKay, 1988). De nombreuses études utilisant des vecteurs rétroviraux codant pour des gènes rapporteurs, afin de réaliser des études de lignage (Gray et al., 1988 ; Price and Thurlow, 1988 ; Luskin et al., 1988 ; Grove et al., 1993 ; Kornack and Rakic, 1995 ; Mione et al., 1997 ; Reid et al., 1997) montreront par la suite que les cellules de la glie radiaire dérivent directement ou indirectement des cellules neuroépithéliales précoces (Gotz and Huttner, 2005).

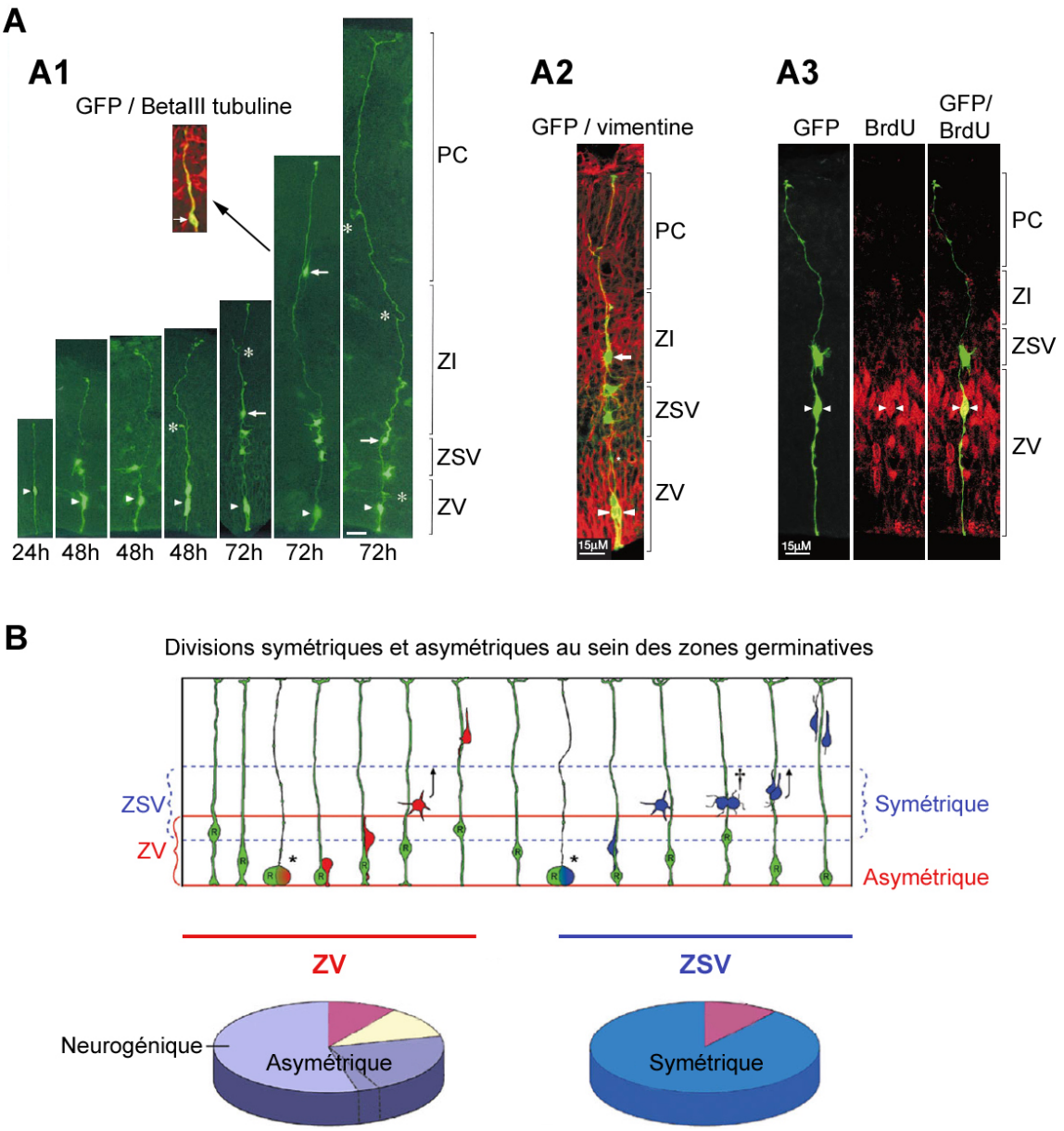


Figure 4. Les cellules de la glie radiaire sont les progéniteurs des neurones corticaux.

A) Une cellule gliale radiaire se divise (elle incorpore le marqueur de division cellulaire BrdU en A3) au niveau de la zone ventriculaire (VZ) pour donner naissance à un neurone (exprimant le marqueur neuronal BetaIII tubuline, insert en A1) qui migre le long du prolongement radiaire en direction de la plaque corticale (PC). Vidéomicroscopie (A1) réalisée après marquage de la cellule gliale radiaire (exprimant la vimentine en A2) avec un rétrovirus codant pour la GFP, qui s'insère au sein de l'ADN et est transmis aux cellules filles. [D'après (Noctor et al., 2001)]

B) Au sein de la zone ventriculaire (VZ), les divisions des cellules de la glie radiaire (cellules vertes marquées R) sont majoritairement asymétriques (mauve) et neurogéniques (mauve clair) : elles donnent naissance à deux cellules filles distinctes, un jeune neurone (cellule rouge qui migre en direction de la plaque corticale) et une autre glie radiaire (cellule verte, auto-renouvellement).

Au sein de la zone sous-ventriculaire (ZSV), les divisions sont majoritairement symétriques (bleu) et donnent majoritairement naissance à deux jeunes neurones (bleu foncé) qui migrent le long de la glie radiaire en direction de la plaque corticale. Les cellules se divisant au niveau de la ZSV sont des progéniteurs intermédiaires. [D'après (Noctor et al., 2004)]

Ainsi, avant la période de neurogenèse (jusqu'à E9-E10), la zone ventriculaire est composée de cellules neuroépithéliales précoces, considérées comme les véritables cellules souches du Système Nerveux Central, qui se divisent pour donner naissance aux cellules de la glie radiaire. Pendant la période de neurogenèse (à partir de E10-E11), les cellules de la glie radiaire constituent la majorité des cellules en division de la zone ventriculaire du cortex embryonnaire (Hartfuss et al., 2001 ; Noctor et al., 2002).

En 2001, les travaux du groupe de Kriegstein (Noctor et al., 2001) suggèrent pour la première fois que les cellules de la glie radiaire sont les progéniteurs des neurones corticaux. En injectant des vecteurs rétroviraux codant pour la protéine fluorescente GFP, ils montrent par vidéo-microscopie que les cellules de la glie radiaire donnent naissance à des jeunes neurones, migrant le long de la glie radiaire qui leur a donné naissance (Figure 4A). De nombreuses études, utilisant des approches similaires [adénovirus (Tamamaki et al., 2001), marquage au DiI (Miyata et al., 2001)] ou le tri de cellules de la glie radiaire par FACS (Malatesta et al., 2000), ont confirmé ces premières observations, démontrant qu'une cellule de glie radiaire se divise pour donner naissance à un neurone et à une autre glie radiaire (auto-renouvellement).

Selon la couche germinative considérée, les divisions cellulaires des cellules de la glie radiaire ont des caractéristiques et des conséquences différentes (Noctor et al., 2004) (Figure 4B) :
- Les divisions ayant lieu au niveau de la zone ventriculaire sont majoritairement des divisions asymétriques et neurogéniques : elles donnent naissance à deux cellules filles distinctes, un jeune neurone et une nouvelle glie radiaire.
- Les divisions ayant lieu au niveau de la zone sous-ventriculaire sont majoritairement des divisions symétriques terminales de progéniteurs intermédiaires : elles donnent naissance à deux cellules filles identiques, deux jeunes neurones qui migrent radialement pour rejoindre la plaque corticale.

A l'heure actuelle, il existe une vision consensuelle de la neurogenèse corticale (Gotz and Huttner, 2005), qui considère que cette dernière s'effectue en deux étapes :
1) Avant et pendant la neurogenèse précoce, les cellules neuroépithéliales

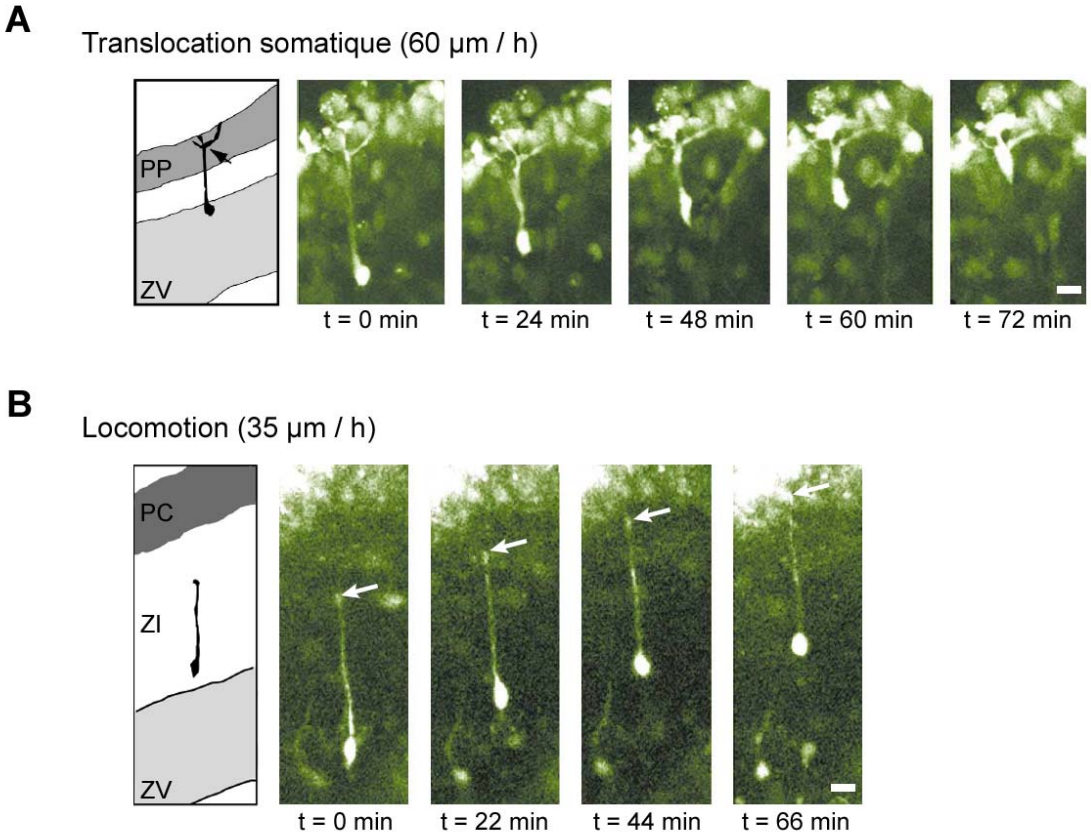


Figure 5. Modes de migration radiale.
A) Migration par translocation somatique. Le corps cellulaire du neurone, situé au niveau de la zone ventriculaire à t=0, se hisse le long du prolongement de guidage, ancré au niveau de la surface corticale externe.
B) Migration par locomotion, le long de la glie radiaire, au niveau de la zone intermédiaire. La longueur du prolongement de guidage reste constante.
[D'après (Nadarajah et al., 2001;Nadarajah et al., 2002)]

précoces (véritables cellules souches neurales) donnent naissance aux cellules de la glie radiaire [et peuvent également donner naissance à des neurones et à des progéniteurs intermédiaires, (Haubensak et al., 2004)].
2) Pendant la neurogenèse, les cellules de la glie radiaire (progéniteurs neuraux) donnent naissance à la très grande majorité des neurones corticaux et hippocampiques, directement ou via la production de progéniteurs intermédiaires (Malatesta et al., 2003 ; Noctor et al., 2004 ; Anthony et al., 2004).

1.2.2 Les modes de migration radiale des neurones excitateurs.

La période de migration neuronale corticale s'étend de E11 à E18 chez la souris (de 10 à 20 semaines chez l'Homme) et peut être divisée en deux grandes périodes[2] :
1) Une période précoce, ou stade de pré-plaque (E11) et stade de plaque corticale précoce (E13), correspondant respectivement à la première et à la deuxième vague migratoire.
2) Une seconde période, ou stade de plaque corticale (E14-E18), correspondant aux vagues migratoires ultérieures.

La description des modes de migration des jeunes neurones corticaux en direction de leur couche de destination a été rendue possible grâce au développement récent des techniques de vidéo-microscopie. En utilisant ce type d'approche sur tranches de cortex embryonnaire, Nadarajah et collaborateurs (Nadarajah et al., 2001) ont identifié deux modes de migration radiale neuronale :
1) Un mode de migration par translocation somatique (Figure 5A), utilisé aux stades précoces (E14 dans leur étude, mais vraisemblablement dès les premières vagues de migration, voir plus loin).
2) Un mode de migration par locomotion (Figure 5B), utilisé aux stades plus tardifs (E16 dans leur étude).

La translocation somatique est employée par les jeunes neurones ayant hérité du

[2] Certains auteurs font la distinction entre le stade de pré-plaque et de plaque corticale précoce.

prolongement de la glie radiaire qui leur a donné naissance, comme démontré par les travaux de Miyata et collaborateurs (Miyata et al., 2001). Dans ce cas, l'extrémité du *leading process* du neurone est déjà insérée au niveau de la surface externe du cortex, puisqu'il correspond à la fibre radiaire. Le corps cellulaire du jeune neurone n'a plus qu'à se hisser (ou « transloquer ») jusqu'à la plaque corticale. Le mouvement du corps cellulaire en translocation est continu et le prolongement de guidage se raccourcit de manière régulière. La vitesse moyenne de migration par translocation somatique est de l'ordre de 60 µm / h.

A l'inverse, la locomotion concerne des neurones en migration le long de la glie radiaire, et se caractérise par des mouvements discontinus, alternant des périodes de déplacement rapide et des pauses, tout en conservant une longueur constante du prolongement de guidage (voir plus loin). La vitesse moyenne de migration par locomotion est de l'ordre de 35 µm / h. La différence de vélocité entre les deux modes migratoires s'explique par le caractère discontinu des mouvements des neurones en locomotion, opposé à la régularité des mouvements des neurones en translocation.

Stade de pré-plaque / plaque corticale précoce (E11-E13) :

Dès leur sortie du cycle cellulaire, les neurones corticaux pionniers migrent de façon radiale à partir du neuroépithélium pour aller former la première couche corticale identifiable, la pré-plaque [décrite initialement comme une couche plexiforme primordiale par (Marin-Padilla, 1971)] (Figure 6B). Les neurones générés par la suite migrent au sein de la pré-plaque (PP) pour former la plaque corticale précoce, scindant la pré-plaque en une couche superficielle, la zone marginale (ZM) et une couche profonde, la sous-plaque (SP) (Figure 6B). La zone marginale (couche I) est constituée principalement de cellules de Cajal-Retzius, générées entre E10.5 et E11.5 (Hevner et al., 2003 ; Bielle et al., 2005) et d'interneurones en migration (voir plus loin).

Les cellules de Cajal-Retzius jouent un rôle important dans le développement du néocortex et de l'hippocampe, principalement grâce à la sécrétion de la protéine reeline. La réception du signal reeline par les jeunes neurones en migration est indispensable à leur positionnement correct au sein de la plaque corticale

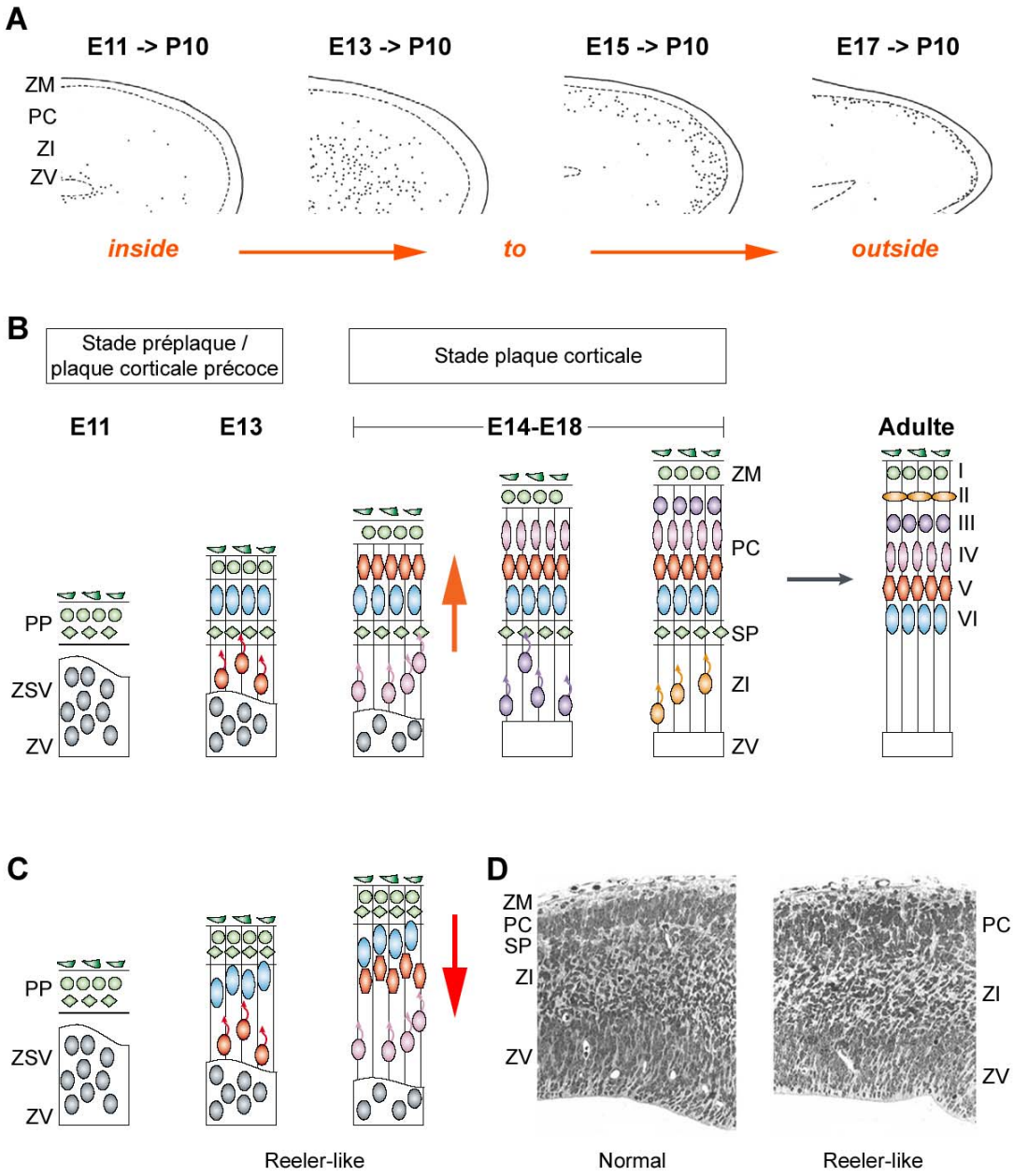


Figure 6. Neurogenèse et migration corticale.
A) Séquence de construction corticale de type inside-to-outside, mise en évidence par Angevine et Sidman, par injection de thymidine tritiée (de E11 à E17, révélation par autoradiographie à P10). Les neurones (points noirs) générés précocement (E11) sont destinés aux couches corticales profondes, alors que les neurones générés tardivement (E17) sont destinés aux couches superficielles. [D'après (Angevine, Jr. and Sidman, 1961)]
B) Séquence de construction corticale, illustrant la migration des vagues successives de neurones (inside-to-outside, flèche orange) au stade pré-plaque / plaque corticale précoce et au stade plaque corticale. [D'après (Gupta et al., 2002)]
C) Chez le mutant reeler, les neurones ne parviennent pas à migrer au sein de la pré-plaque et s'accumulent à son contact, selon une séquence outside-to-inside (flèche rouge).
D) Coupe coronale de cortex normal et reeler, montrant la désorganisation de la plaque corticale et l'absence de sous-plaque chez le mutant reeler. [C et D, d'après (Tissir and Goffinet, 2003)]

(Tissir and Goffinet, 2003). L'absence ou la perturbation de ce signal provoque de sévères malformations du développement cortical, comme dans le cas de la souris mutante *reeler*, dont l'organisation des couches corticales est fortement perturbée.

Dans le cas normal, à chaque vague migratoire, les neurones nouvellement générés migrent au sein de la plaque corticale, dépassant la couche corticale issue de la vague migratoire précédente. Ainsi, les neurones générés plus tardivement migrent au-delà des couches corticales composées par les neurones générés plus précocement. Cette séquence de construction corticale, du ventricule vers la surface externe du cortex (ou séquence inside-to-outside ou inside-out) a été décrite par Angevine et Sidman (Angevine, Jr. and Sidman, 1961) (Figure 6A), en utilisant la technique d'auto-radiographie après injection de thymidine tritiée, un marqueur de division cellulaire.

Dans le cas du mutant *reeler*, la séquence de construction corticale est perturbée : les jeunes neurones ne parviennent pas à migrer jusqu'au sein la pré-plaque et s'accumulent à son contact. Les neurones des vagues migratoires suivantes ne parviennent pas à dépasser les couches issues des vagues précédentes et se positionnent selon une séquence inverse : outside-to-inside (Figure 6C-6D).

Aux stades précoces, les jeunes neurones migrent par translocation somatique (voir plus haut). Dans une revue récente, Nadarajah et collaborateurs (Nadarajah et al., 2003) ont suggéré que le mode de migration par translocation somatique est un reliquat de l'évolution du cortex cérébral, utilisé pour constituer la pré-plaque et la plaque corticale précoce, deux structures plus anciennes au plan phylogénétique que les couches corticales générées ultérieurement [voir aussi (Marin-Padilla, 1998)]. Selon ces auteurs, la présence d'une pré-plaque et d'une plaque corticale précoce normales chez le mutant *reeler* indique que les neurones atteignent ces couches corticales en migrant par translocation somatique, indépendamment de la glie radiaire et de la reeline. L'émergence de la migration par locomotion, guidée par la glie radiaire et dépendante de la reeline, s'expliquerait par la nécessité de contrôler plus étroitement la migration des jeunes neurones à travers des voies migratoires dont la complexité s'accroît

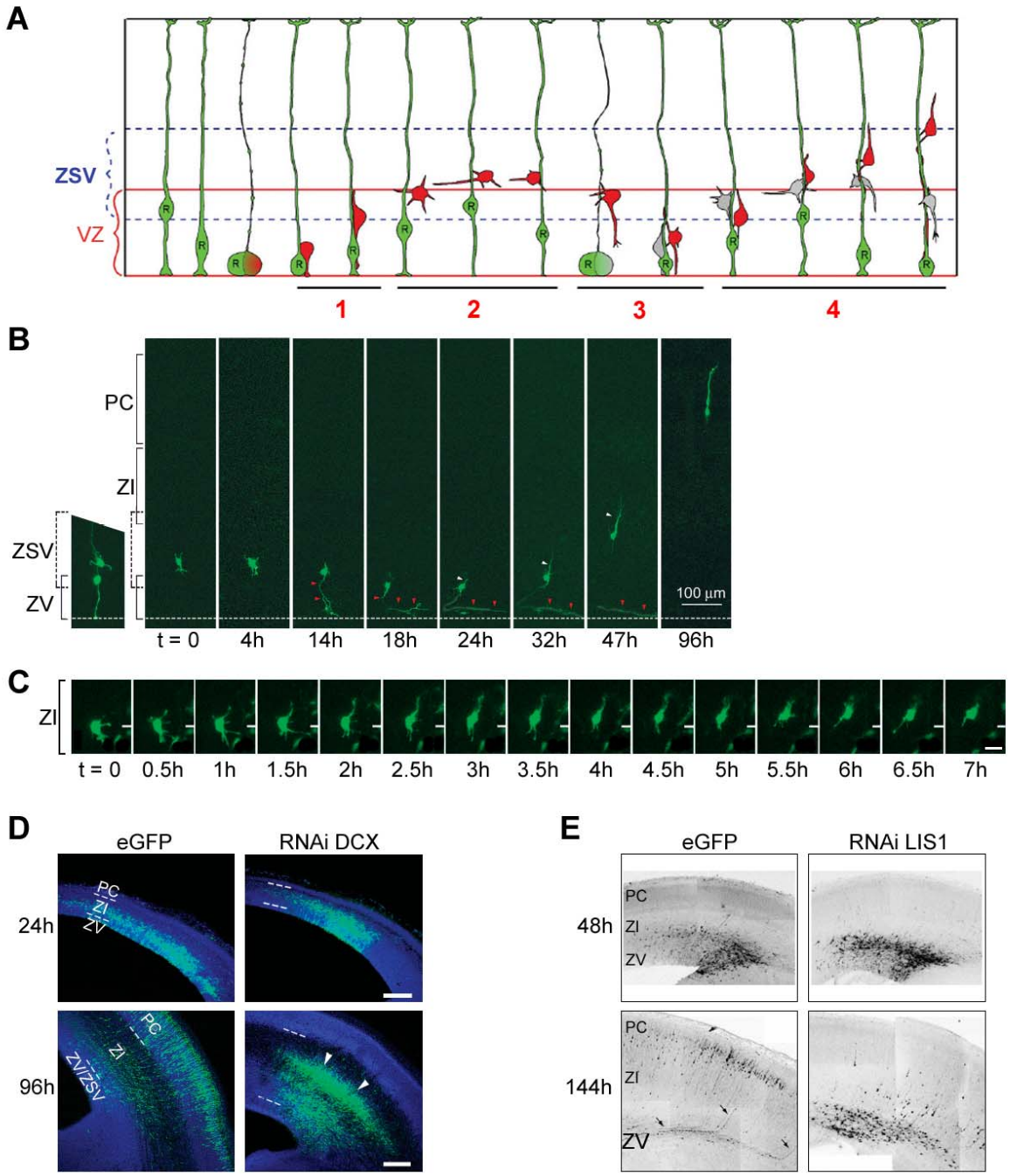


Figure 7. Les quatre phases de migration radiale aux stades tardifs du développement cortical.

A) Les neurones (cellules rouges) migrent radialement de la zone ventriculaire vers la zone sous-ventriculaire (phase 1) et deviennent multipolaires dans la zone intermédiaire inférieure (phase 2), où ils séjournent avant de migrer de manière rétrograde (phase 3) et de s'engager dans une migration finale en direction de la plaque corticale, guidée par la glie radiaire (phase 4). [D'après (Noctor et al., 2004)]

B) Neurone s'engageant successivement en phase 1 (gauche), en phase 2 (0-4h), en phase 3 (14-18h) et en phase 4 (24-96h). [D'après (Noctor et al., 2004)]

C) Neurone multipolaire (phase 2). [D'après (Tabata and Nakajima, 2003)]

D-E) Accumulation de neurones ectopiques au stade multipolaire, au niveau de la zone intermédiaire inférieure, après inactivation des gènes doublecortine (DCX, D) et LIS1 (E) par RNAi. [D, d'après (Bai et al., 2003) et E, d'après (Tsai et al., 2005)]

avec l'avancée de la construction du néocortex. Elle permettrait également de préserver la séquence de construction inside-to-outside.

Stade de plaque corticale (E14-E18) :

La séquence de construction corticale inside-to-outside se poursuit, avec la succession des vagues migratoires, à l'origine de l'établissement des couches corticales de plus en plus superficielles (Figure 6B).
Des travaux récents réalisés en vidéo-microscopie ont fournit des informations plus complètes sur les stades plus tardifs du développement cortical. Les travaux de Noctor et collaborateurs (Noctor et al., 2004) et Tabata et Nakajima (Tabata and Nakajima, 2003) ont démontré que les neurones générés plus tardivement passent par des stades migratoires distincts, caractérisés par d'importantes modifications dans leur morphologie, leur direction et leur vitesse de migration. Ces observations sont à l'origine d'un modèle général [cf (Kriegstein and Noctor, 2004 ; Kriegstein, 2005)], qui divise la migration radiale en quatre phases (Figure 7A) :

Phase 1 : Migration radiale initiale
Les neurones nouvellement générés au niveau de la zone ventriculaire, par division asymétrique d'une glie radiaire, migrent en direction de la zone sous-ventriculaire (ZSV), le long de la glie radiaire leur ayant donné naissance (Figure 7A-B).

Phase 2 : « séjour prolongé » au niveau de la zone sous-ventriculaire
Les neurones en migration font une pause au niveau de la région constituée par les zones sous-ventriculaire et intermédiaire (ZSV-IZ), pendant 24h [et même jusqu'à 96h au niveau de l'hippocampe, si l'on se réfère aux études pionnières d'Altman et Bayer (Altman and Bayer, 1990c), qui qualifiaient cette période de « séjour prolongé », voir plus loin]. Au cours de cette phase, les jeunes neurones adoptent une morphologie multipolaire et changent totalement de comportement migratoire. Les observations en vidéo-microscopie de Tabata et Nakajima (Tabata and Nakajima, 2003) ont montré que les jeunes neurones multipolaires émettent et rétractent leurs prolongements de manière très dynamique, alors que les déplacements de leurs corps cellulaires deviennent très limités (Figure

7B-C). Les neurones multipolaires semblent devenus indépendants des guides migratoires constitués par les fibres de la glie radiaire et sont capables de migrer latéralement (Noctor et al., 2004) et tangentiellement (Tabata and Nakajima, 2003). Kriegstein émet même l'hypothèse selon laquelle les neurones multipolaires peuvent ainsi passer d'une fibre radiaire à une autre (Kriegstein, 2005).

Phase 3 : Migration rétrograde

Certains neurones émettent un prolongement en direction du ventricule et peuvent « transloquer » leur corps cellulaire en direction de celui-ci, en un mouvement de migration rétrograde, avant de passer en phase 4 (Figure 7A-B). D'autres neurones ne font que marquer une pause au niveau de la ZSV et passent directement de phase 2 à phase 4.

Phase 4 : Migration radiale secondaire

Les jeunes neurones adoptent une morphologie bipolaire, classiquement décrite par Rakic (Rakic, 1972), avec un *leading process* orienté dans la direction de migration, vers la surface externe du cortex en développement, et un *trailing process* à l'opposé, en direction du ventricule. Dans certains cas, le *trailing process* peut rester au contact de la bordure du ventricule et constituerait le futur axone (Figure 7B) (Noctor et al., 2004). Les neurones engagés dans la phase 4 migrent selon le mode de locomotion décrit par Nadarajah et collaborateurs (Nadarajah et al., 2001), caractérisé par des mouvements discontinus du corps cellulaire tout en maintenant une longueur constante du prolongement de guidage. Ce mode de migration par locomotion est dépendant des interactions avec la glie radiaire.

Les transitions entre les différentes phases migratoires sont particulièrement cruciales et il est probable que certaines malformations du développement cortical (voir chapitre 4) résultent d'un échec de transition entre ces phases [proposé par (Bai et al., 2003 ; Noctor et al., 2004)]. Par exemple, l'électroporation des cellules de la zone ventriculaire avec des ARN interférant de la protéine doublecortine (DCX) provoque un arrêt de migration de neurones multipolaires au niveau de la région constituée par les zones sous-ventriculaire et intermédiaire (ZSV-IZ), constituant ainsi une bande sous-corticale composée de

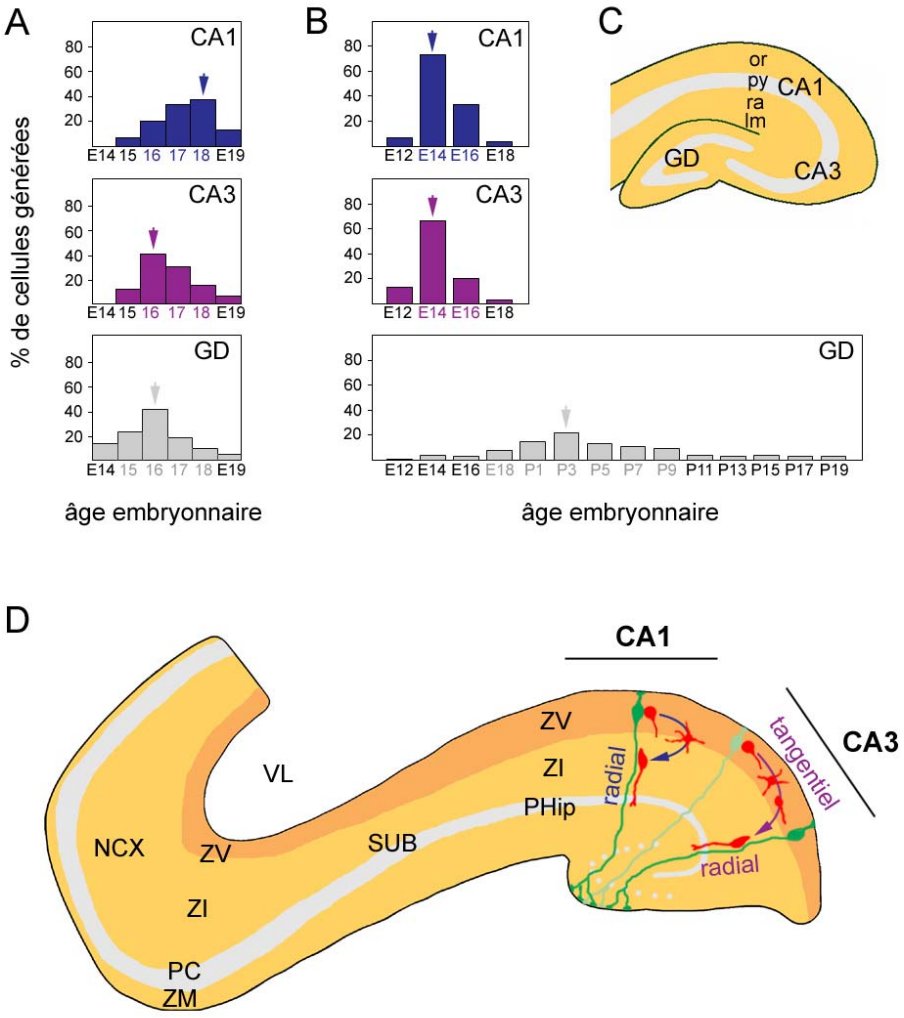


Figure 8. Neurogenèse et modes de migration hippocampiques.
A-B) Neurogenèse des cellules principales des régions CA1 et CA3 et des cellules granulaires du gyrus denté (GD), après injections de thymidine tritiée et sacrifices à des âges embryonnaires séquentiels chez le rat (A) et chez la souris (B). [D'après (Bayer, 1980) et (Altman and Bayer, 1990)]
C) Représentation schématique d'un hippocampe adulte, avec les différentes couches : *stratum oriens* (or), *stratum pyramidale* (py), *stratum radiatum* (ra), *stratum lacunosum moleculare* (lm) ; ainsi que les grandes subdivisions : régions CA1 et CA3 et gyrus denté.
D) Modes migratoires au niveau des régions CA1 et CA3 :
Au niveau de la région CA1, les neurones pyramidaux nouvellement générés à partir des cellules de la glie radiaire (vert), passent par un stade de migratoire multipolaire au niveau de la zone intermédiaire (ZI), avant de migrer radialement le long des fibres de glie radiaire pour rejoindre la plaque hippocampique.
Au niveau de la région CA3, les neurones pyramidaux nouvellement générés migrent selon un mode multipolaire pour atteindre un flux migratoire au sein duquel ils migrent tangentiellement, guidé par la glie. Arrivés à proximité de leur destination, les neurones pyramidaux adoptent finalement un mode de migration radial, le long des fibres de la glie radiaire pour s'intégrer au sein de la couche pyramidale.
PC : plaque corticale, NCX : néocortex, PC : plaque corticale, Phip : plaque hippocampique, SUB : subiculum, VL : ventricule latéral, ZI : zone intermédiaire, ZM : zone marginale, ZV : zone ventriculaire.

neurones ectopiques (Figure 7D) (Bai et al., 2003). De même, l'électroporation des cellules de la zone ventriculaire avec des ARN interférant du produit du gène LIS1 perturbe la transition entre la phase de migration multipolaire et la phase bipolaire, provoquant une accumulation de neurones ectopiques au niveau de la zone sous-ventriculaire (Figure 7E) (Tsai et al., 2005).

Le cas particulier de l'hippocampe :

L'hippocampe est une structure corticale simplifiée, constituée d'un nombre réduit de couches cellulaires, les cellules principales étant regroupées au sein d'une couche cellulaire unique (Figure 8C). Les neurones excitateurs (cellules principales) destinés à constituer la couche pyramidale des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe sont générés au niveau du neuroépithélium des cornes d'Ammon de E16 à E18 chez le rat (pic à E18 pour CA1 et à E16 pour CA3) (Bayer, 1980) (Figure 8A) et de E14 à E16 chez la souris (pics à E16) (Stanfield and Cowan, 1979) (Figure 8B, mais voir aussi article 1).
Les cellules granulaires du gyrus denté sont générées au niveau du neuroépithélium denté de E15 à E18 chez le rat (pic à E16, Figure 8A) (Bayer, 1980) et de E18 à P9 chez la souris (pic à P3, Figure 8B) (Stanfield and Cowan, 1979) [voir aussi (Bagri et al., 2002), qui montrent une neurogenèse s'étalant de E16 à E20, avec un pic à E18].

Les voies migratoires des cellules principales et granulaires ont été décrites par Altman et Bayer (Altman and Bayer, 1990c;Altman and Bayer, 1990a;Altman and Bayer, 1990b), grâce à des injections séquentielles de thymidine tritiée. Les cellules principales sont générées en vagues successives, selon un gradient inside-to-outside comparable à celui observé pour le cortex : les cellules les plus profondes (proches du futur *stratum oriens*) sont générées précocement, alors que les cellules les plus superficielles (proches du futur *stratum radiatum*) sont générées plus tardivement. Les cellules granulaires sont initialement générées au sein du neuroépithélium denté (ou matrice germinative primaire), en continuité du neuroépithélium des cornes d'Ammon, puis d'une matrice germinative secondaire, constituée à partir et au contact du premier.

Nakahira et Yuasa (Nakahira and Yuasa, 2005) ont revisité ces études grâce à

des électroporations *in utero* à l'aide de plasmides codant pour la GFP, et ont affiné les observations initiales (résumé à la Figure 8D, à l'exception de la migration des futures cellules granulaires) :

La migration neuronale à destination du *stratum pyramidale* de la région CA1 est de type multipolaire aux stades précoces (E14-E16) et devient bipolaire et guidée par la glie radiaire (locomotion) aux stades tardifs (E16-E18).

La migration neuronale à destination du *stratum pyramidale* de la région CA3 est plus complexe, elle utilise en partie un flux migratoire tangentiel, à partir duquel les neurones migrent radialement vers leur couche de destination. Aux stades précoces (E14-E16), les neurones rejoignent ce flux migratoire en migrant tangentiellement selon un mode multipolaire. Arrivés au sein du flux migratoire, ils adoptent un mode de migration tangentiel guidé par la glie (E16-E18). Les neurones atteignent enfin leur destination finale en adoptant un mode migratoire bipolaire, radial et guidé par la glie (dès E16).

La migration neuronale à destination de la couche granulaire du gyrus denté est plus longue et complexe. Les cellules granulaires générées au niveau des matrices germinatives primaire puis secondaire migrent initialement (E16) au sein d'un flux migratoire tangentiel (partagé par la suite avec les cellules destinées à CA3), le long des fibres de glie radiaire (immunopositives pour la nestine). Arrivées à proximité de leur destination finale (P2), les cellules granulaires quittent le flux migratoire pour migrer radialement le long des fibres gliales (immunopositives pour la GFAP) jusqu'à la couche granulaire.
La migration à destination du gyrus denté concerne les futures cellules granulaires, mais également une sous-population de cellules précurseurs, qui vont s'établir au niveau du hile et constituer une matrice germinative tertiaire. Cette matrice serait responsable de la neurogenèse post-natale de la plupart des cellules granulaires et permettrait la constitution de la population de cellules responsables de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte (Bagri et al., 2002 ; Li and Pleasure, 2005).

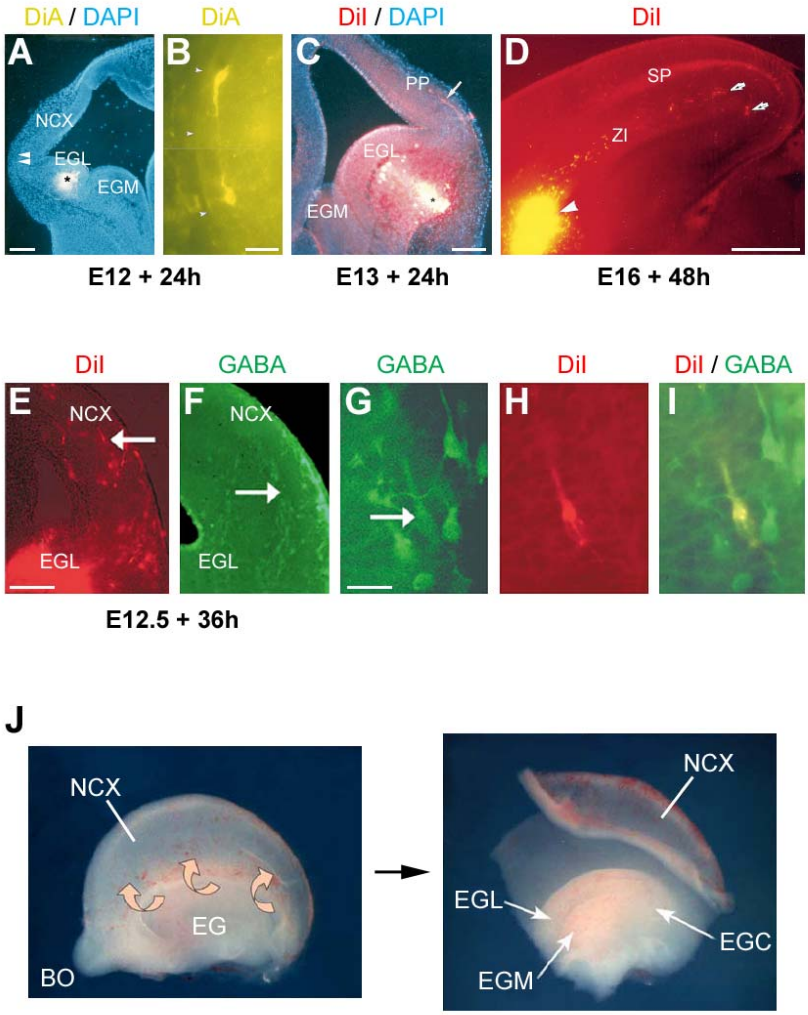


Figure 9. Premières observations de neurones en migration tangentielle issus du sub-pallium.
Des dépôts de cristaux de DiA (A, B) ou de DiI (C, D, E, H) au niveau des éminences ganglionnaires latérales à différents âges embryonnaires (E12-E16) permettent de marquer des neurones migrant tangentiellement au sein de la pré-plaque (A-C) ou de la zone intermédiaire (D-G) du nécortex en développement. Ces neurones, marqués au DiI, sont des interneurones en migration, exprimant le GABA (F, G, I).
Organisation anatomique des éminences ganglionnaires (EG) (J), avant (à gauche) et après (à droite) excision du néocortex (NCX). Les éminences ganglionnaires latérales (EGL), médiales (EGM) et caudales (EGC) sont indiquées.
Echelles : 500 µm en D, 200 µm en A-C, 100 µm en E, 25 µm en B, 15 µm en G.
[A-C, d'après (de Carlos et al., 1996) ; D, d'après (Tamamaki et al., 1997) ; E-I, d'après (Anderson et al., 1997) ; J, d'après (Flames and Marin, 2005)).

1.3 Neurogenèse sous-corticale et migration tangentielle des interneurones.

Contrairement aux neurones excitateurs corticaux, qui constituent une population relativement homogène, les interneurones GABAergiques se caractérisent par une extraordinaire diversité aux plans morphologique, neurochimique et électrophysiologique (Markram et al., 2004 ; Somogyi and Klausberger, 2005). La description récente de leurs zones de neurogenèse et de leurs voies migratoires a permis de suggérer que cette diversité possède une origine développementale (Wonders and Anderson, 2005 ; Flames and Marin, 2005).

1.3.1 La zone ventriculaire du primordium des ganglions de la base, zone de genèse de la majorité des interneurones corticaux, hippocampiques et olfactifs.

L'observation d'une population de neurones générés au niveau des éminences ganglionnaires du sub-pallium et migrant tangentiellement vers le néocortex en développement (Tamamaki et al., 1997 ; de Carlos et al., 1996) (Figure 9A-D) va marquer le point de départ d'une série d'études qui vont démontrer que ces neurones sont les futurs interneurones GABAergiques du cortex, de l'hippocampe et du bulbe olfactif.

L'étude d'Anderson et collaborateurs (Anderson et al., 1997) montre pour la première fois que les neurones GABAergiques corticaux sont générés au niveau du télencéphale ventral et plus particulièrement au niveau des éminences ganglionnaires latérales[3] (Figure 9E-I).

D'autres études (voir plus loin) vont ensuite affiner la description des territoires responsables de la genèse des interneurones et ainsi permettre de distinguer trois zones germinatives (Figure 9J) :
1) L'éminence ganglionnaire médiale (EGM), zone germinative initiale et

[3] Chez l'Homme, les interneurones sont également générés au niveau des éminences ganglionnaires du télencéphal ventral (35%), mais le sont majoritairement (65%) au niveau des zones ventriculaires et sous-ventriculaires du téléncéphale dorsal (Letinic et al., 2002).

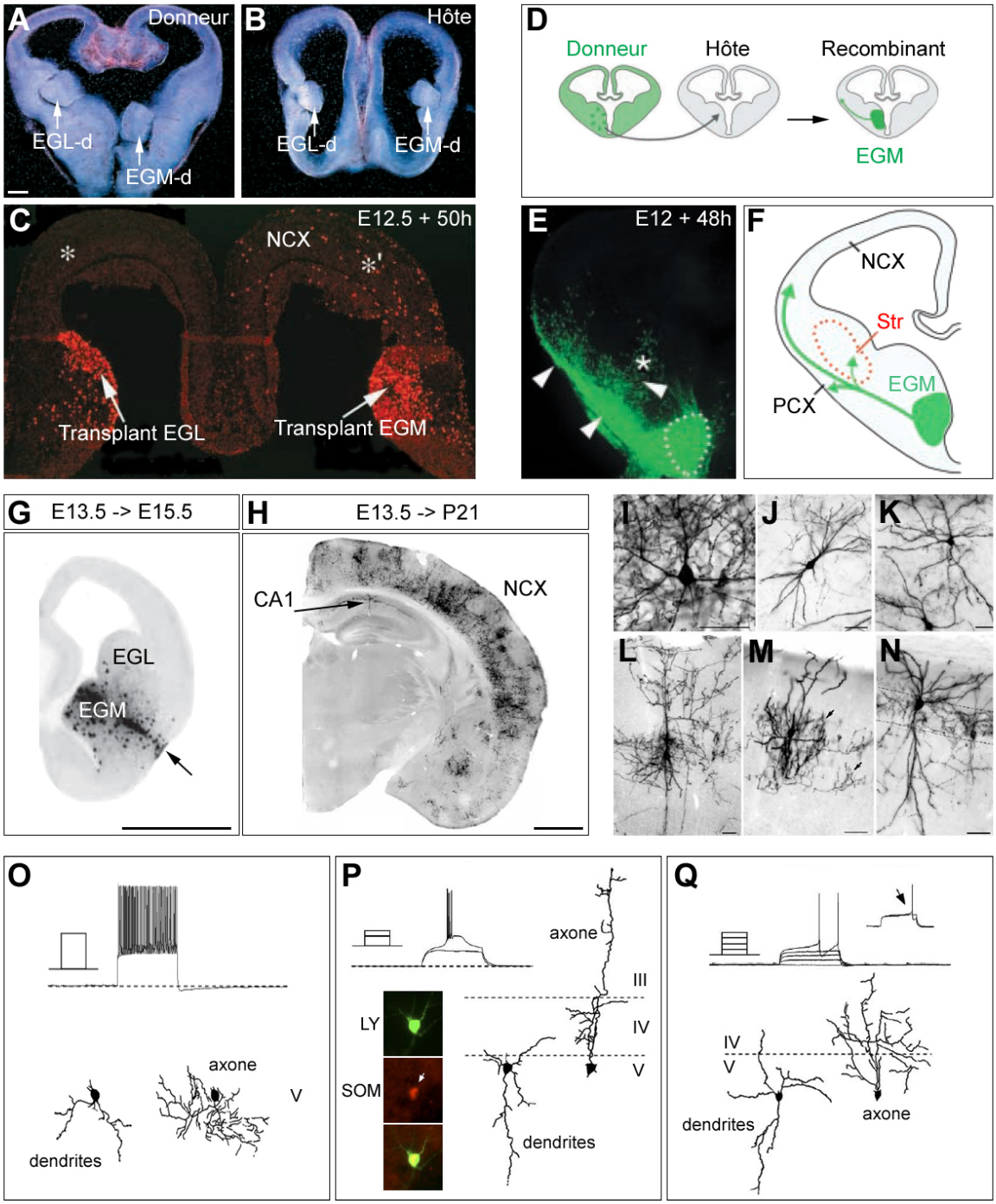


Figure 10. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires médiales.

A-C) Expérience de transplantation d'EGL (EGL-d) et d'EGM (EGM-d) marquées au BrdU sur des tranches hôtes (B) à E12.5 maintenues en culture pendant 50h (C). De nombreuses cellules BrdU+ ont migré vers le néocortex (NCX) à partir des EGM-d (*'), mais aucune à partir des EGL-d (*). [D'après (Anderson et al., 2001)]

D-F) Expérience de transplantation d'EGM marquées à la GFP sur des tranches hôtes (D) à E12, maintenues en culture pendant 48h (E). Des cellules GFP+ ont migré vers le striatum (Str), le cortex pariétal (PCX) et le néocortex (NCX). [D'après (Marin et al., 2001)]

G-N) Expérience de transplantation *in utero* (E13.5) de cellules issues des EGM, marquées à la phosphatase alcaline. Coupes coronales observées 1 jour après transplantation (G) et chez l'adulte (H), montrant la différentiation des cellules greffées…

Suite en page 34.

principale de la majorité des interneurones corticaux et hippocampiques, particulièrement ceux exprimant la somatostatine et la parvalbumine. L'EGM est également à l'origine des interneurones du striatum.
2) L'éminence ganglionnaire latérale (EGL), zone germinative utilisée plus tardivement pour générer des interneurones corticaux, hippocampiques et destinés au bulbe olfactif et au striatum.
3) L'éminence ganglionnaire caudale (EGC), zone germinative des interneurones corticaux et hippocampiques, exprimant la calrétinine.

L'éminence ganglionnaire médiale :

Alors que les études princeps se sont focalisées sur les éminences ganglionnaires latérales, les études conduites ultérieurement ont révélé que les éminences ganglionnaires médiales représentent la source initiale des interneurones. Des dépôts de cristaux de DiI au niveau des EGM ont permis d'identifier des neurones exprimant le GABA, en migration à destination du cortex (Lavdas et al., 1999 ; Jimenez et al., 2002). Ces études seront confirmées par des expériences de transplantations à l'aide d'EGM issues de souris GFP (Figure 10D-F) (Marin et al., 2001 ; Polleux et al., 2002) ou marquées au BrdU, un analogue de la thymidine (Figure 10A-C) (Anderson et al., 2001).
Le développement de techniques de transplantation *in utero* ont permis d'affiner ces observations. Ainsi, Wichterle et collaborateurs (Wichterle et al., 2001) ont transplanté à E13.5 au niveau des EGM d'embryons hôtes, des cellules issues des EGM et exprimant un gène rapporteur (Figure 10G). Ces cellules ont migré au niveau cortical et hippocampique et se sont différenciées en plusieurs sous-types morphologiques d'interneurones (chandelier, bi-tufted, cellule en panier, Figure 10H-N), exprimant majoritairement la parvalbumine (~70%), mais également la somatostatine, seuls quelques-uns exprimant la calrétinine (3%).
Des résultats similaires ont été obtenus après injection intra-cérébro-ventriculaire à E12.5 et E15.5 chez des embryons hôtes, de cellules dissociées à partir des EGM d'embryons exprimant un gène rapporteur (Valcanis and Tan, 2003). De la même manière, les interneurones observés chez l'adulte expriment majoritairement la parvalbumine (~70-80%). Plus récemment, en utilisant une approche *in vitro*, Xu et collaborateurs (Xu et al., 2004) ont montré que les neurones dissociés à partir des EGM se différencient en interneurones exprimant

Suite de la page 32.
…en un grand nombre d'interneurones corticaux (multipolaires : I et K, bi-tufted : J, cellule en panier : L, chandelier : M) et hippocampiques (basket cell : N). Echelles, 1 mm en G-H et 50 µm en I-N. [D'après (Wichterle et al., 2001)]
O-Q) Types morphologiques et électrophysiologiques d'interneurones générés après transplantation *in utero* (E13.5) de cellules issues des EGM, marquées à la GFP. Interneurone déchargeant de façon rapide (fast-spiking) et de type cellule en panier (O). Interneurone déchargeant en bouffée d'un ou plusieurs potentiels d'action (burst-spiking) et de type cellule de Martinotti, exprimant la somatostatine (P). Interneurone déchargeant de manière retardée à potentiel d'action unique (delayed-spiking), et de type multipolaire (Q). [D'après (Butt et al., 2005)]

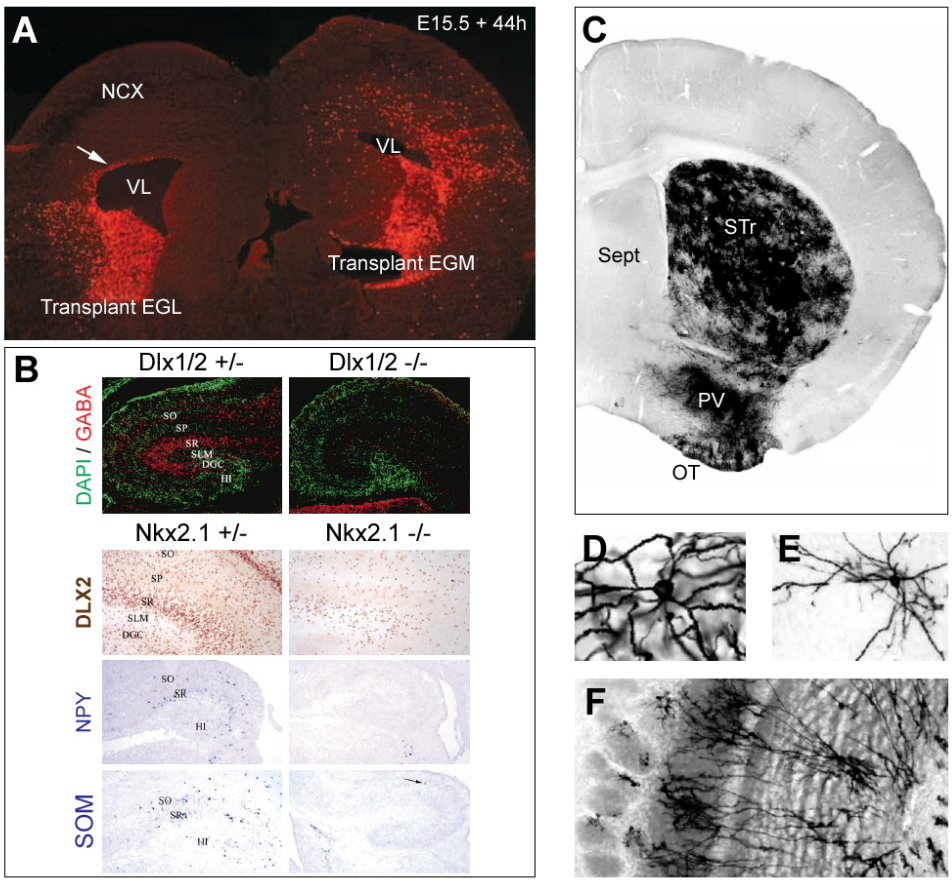


Figure 11. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires latérales.
A) Expérience de transplantation d'EGL et d'EGM marquées au BrdU sur des tranches hôtes (B) à E15.5 maintenues en culture pendant 44h (C). Une vague de cellules BrdU+ a migré vers le néocortex à partir des EGL (à gauche), en empruntant une voie migratoire profonde (flèche). De nombreuses cellules BrdU+ ont migré vers le néocortex (NCX) à partir des EGM (à droite). [D'après (Anderson et al., 2001)]
B) Perte massive de neurones GABAergiques hippocampiques chez les animaux KO pour Dlx1/2 (à droite). Perte limitée d'interneurones hippocampiques (DLX2+) chez les animaux KO pour Nkx2.1 (à droite), affectant les populations d'interneurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) et la somatostatine (SOM). [D'après (Pleasure et al., 2000)].
C-F) Expérience de transplantation *in utero* (E13.5) de cellules issues des EGL, marquées à la phosphatase alcaline. Coupe coronale observée chez l'adulte, montrant la différentiation des cellules greffées en un grand nombre d'interneurones du striatum (STr) de type médium spiny (D), en interneurones du pallidum ventral (PV en C), des tubercules olfactifs (OT en C), des bulbes olfactifs (F), ainsi que de quelques interneurones corticaux (E). [D'après (Wichterle et al., 2001)]

majoritairement la parvalbumine (~80%) et la somatostatine, après plusieurs jours en culture.
Pour finir, Butt et collaborateurs (Butt et al., 2005) ont transplanté au niveau des EGM d'embryons hôtes, des cellules issues des EGM de souris GFP à E13.5 et ont étudié les caractéristiques électrophysiologiques et neurochimiques des interneurones ainsi générés chez l'adulte (Figure 10O-Q). Ces interneurones expriment majoritairement la parvalbumine (~60%) et la somatostatine (~35%). Les interneurones exprimant la parvalbumine sont principalement de morphologie cellule en panier et de type fast-spiking. Les interneurones exprimant la somatostatine sont de deux types : burst-spiking et delayed-spiking. Ainsi, l'origine germinative des interneurones permet de prédire leurs propriétés neurochimiques et électrophysiologiques.

L'éminence ganglionnaire latérale :

Les éminences ganglionnaires latérales ont été les zones germinatives les plus étudiées, mais l'interprétation des résultats obtenus est compliquée par le fait que les interneurones en migration en provenance des EGM transitent par les EGL. Néanmoins, des transplantations sur tranches organotypiques en culture d'EGL marquées au BrdU (Anderson et al., 2001) ont permis de démontrer que les EGL sont à l'origine des interneurones corticaux et hippocampiques générés plus tardivement (E15.5, Figure 11A).
De la même manière, la transplantation *in utero* au niveau des EGL d'embryons hôtes, de cellules issues des EGL et exprimant un gène rapporteur codant pour la phosphatase alcaline, ont permis de montrer que les EGL à E13.5 sont à l'origine des interneurones du striatum, des bulbes olfactifs et de quelques interneurones corticaux (Figure 11C-F) (Wichterle et al., 2001).
Enfin, l'étude de la distribution des interneurones chez des lignées de souris transgéniques, pour lesquelles les facteurs de transcription régulant la spécification des cellules précurseurs du sub-pallium ont été inactivés, a permis de clarifier les origines des interneurones hippocampiques. Ainsi, les souris KO pour Dlx1/2, affectant les cellules précurseurs des EGM et des EGL, sont dépourvues d'interneurones hippocampiques (Figure 11B), alors que les souris KO pour Nkx2.1, qui affecte uniquement les cellules précurseurs EGM, ne sont dépourvues que d'une population distincte d'interneurones hippocampiques,

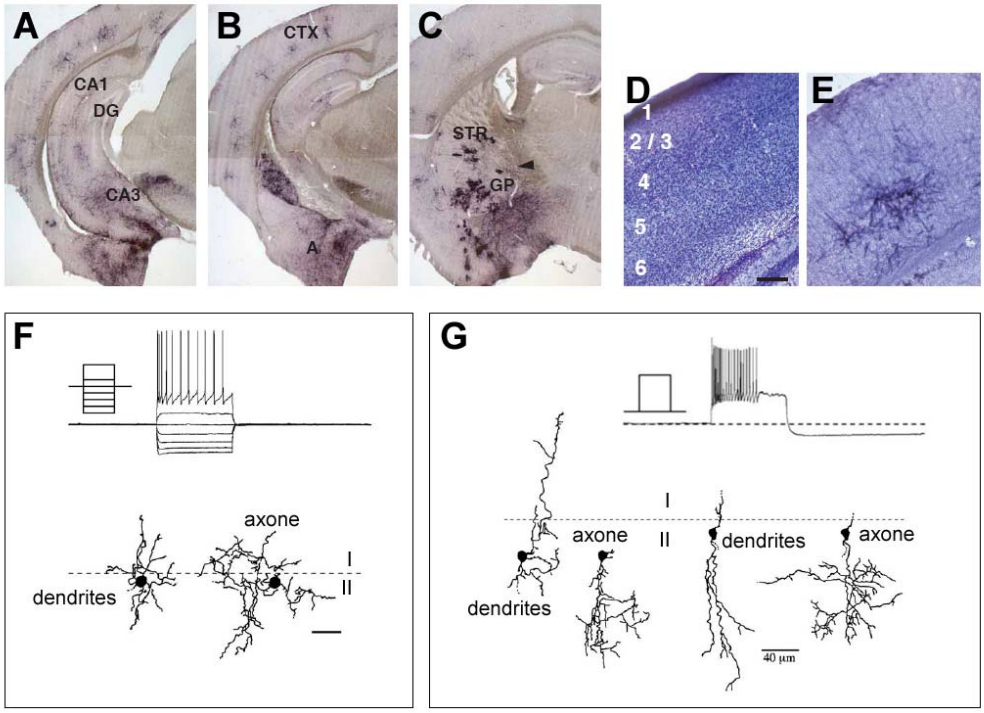


Figure 12. Interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires caudales.

A-E) Expérience de transplantation *in utero* (E13.5) de cellules issues des EGC, marquées à la phosphatase alcaline. Coupe coronale observée chez l'adulte, montrant la différentiation des cellules greffées en un grand nombre d'interneurones du cortex (CTX) et de l'hippocampe (CA1, CA3, DG) en A et B, du noyau accumbens (A) en B, du striatum (STR) et globus pallidus (GP) en C. Les interneurones corticaux sont majoritairement situés au niveau des couches profondes (couche 5 : comparer coloration de Nissl en D avec interneurone en E). [D'après (Nery et al., 2002)]

F-G) Types morphologiques et électrophysiologiques d'interneurones générés après transplantation *in utero* (E13.5 en F et E15.5 en G) de cellules issues des EGC, marquées à la GFP. Interneurones déchargeant en bouffées régulières de potentiels d'action (regular-spiking), et de type dense plexus (F). Interneurones déchargeant en bouffées régulières de potentiels d'action et présentant une adaptation rapide (rapidly adaptating regular spiking), de type bipolaire (G). [D'après (Butt et al., 2005)]

exprimant la somatostatine et le neuropeptide Y (Figure 11B) (Pleasure et al., 2000). Ces résultats impliquent que les interneurones hippocampiques sont générés au niveau des EGL, mais également au niveau d'autres zones germinatives non affectées par les mutations étudiées.

L'éminence ganglionnaire caudale :

Les potentialités des éminences ganglionnaires caudales ont été les plus récemment décrites. En utilisant des approches par transplantation *in utero* comparables à celles présentées plus haut, Nery et collaborateurs (Nery et al., 2002) ont démontré que les cellules issues des EGC à E13.5 sont à l'origine des interneurones de plusieurs structures cérébrales : des couches corticales profondes (couche V) et de l'hippocampe (en très grand nombre), des structures limbiques (noyau accumbens, amygdale) et du striatum (Figure 12A-E). Ces interneurones expriment majoritairement la somatostatine (~25%), ainsi que la calbindine (~15%) et la parvalbumine (~3%).
Les neurones dissociés à partir des EGC à E14.5 se différencient en interneurones exprimant majoritairement la calrétinine (~30%) après plusieurs jours en culture (Xu et al., 2004). Lorsqu'ils sont dissociés à E16.5, ils se différencient majoritairement en interneurones exprimant la parvalbumine (~10%).
L'étude des caractéristiques électrophysiologiques et neurochimiques des cellules issues des EGC de souris GFP, transplantées au niveau des EGC d'embryons hôtes par Butt et collaborateurs (Butt et al., 2005) a montré que les interneurones générés sont de morphologie bipolaire, expriment la calrétinine et sont de type regular-spiking. La destinée de ces interneurones est âge-dépendante (Figure 12F-G) : ainsi, les interneurones issus des EGC transplantés à E13.5 sont de morphologie bi-tufted et dense plexus et ne présentent par de potentiels d'action de rebond (no-rebound regular spiking), alors que les interneurones des EGC transplantés à E15.5 sont de morphologie double-bouquet et bi-tufted et présentent une adaptation rapide (rapidly adaptating regular spiking).

Un schéma récapitulatif des différents types d'interneurones générés par

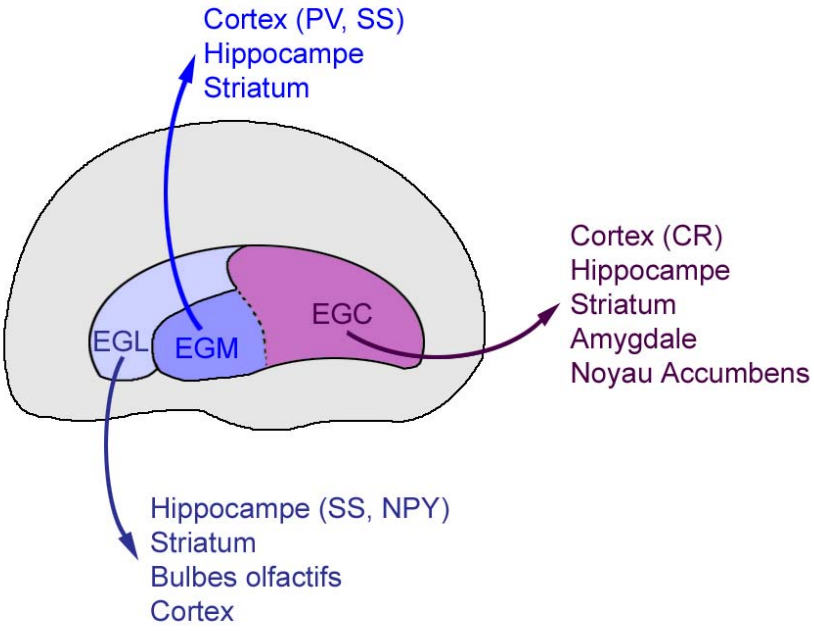


Figure 13. Destinée des interneurones issus des différentes éminences ganglionnaires.
Les interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires médiales (EGM) sont destinés à coloniser le cortex, l'hippocampe et le striatum. Les interneurones corticaux issus des EGM sont majoritairement de type parvalbumine (PV) et somatostatine (SS).
Les interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires latérales (EGL) sont destinés à coloniser l'hippocampe, le striatum, les bulbes olfactifs et le cortex. Les interneurones hippocampiques issus des EGL sont majoritairement de type somatostatine (SS) et neuropeptide Y (NPY).
Les interneurones générés au niveau des éminences ganglionnaires caudales (EGC) sont destinés à coloniser le cortex, l'hippocampe, le striatum, l'amygdale et le noyau accumbens. Les interneurones corticaux générés sont majoritairement de type calrétinine (CR).
L'ordre de citation des structures reflète de l'abondance des interneurones générés par structure.

structure en fonction de leurs origines germinatives est présenté Figure 13.

1.3.2 Les voies de migration tangentielle des interneurones.

L'étude des voies de migration tangentielle des interneurones au niveau du néocortex en développement a permis de distinguer trois phases :

1) Une phase précoce (E11.5), durant laquelle les interneurones, générés majoritairement au niveau des éminences ganglionnaires médiales, migrent superficiellement au sein du néocortex (alors au stade de pré-plaque / plaque corticale précoce).

2) Une phase intermédiaire (E12.5-E14.5), correspondant au pic de migration, durant laquelle les interneurones, générés majoritairement au niveau des éminences ganglionnaires médiales, migrent au sein du cortex en naviguant principalement au niveau de la zone intermédiaire, mais également superficiellement.

3) Une phase tardive (à partir de E15.5), durant laquelle les interneurones, générés majoritairement au niveau des éminences ganglionnaires latérales, migrent au sein du cortex en développement, en naviguant au niveau des zones intermédiaire et sous-ventriculaire.

Phase précoce (E11.5) :

Les premières vagues migratoires interneuronales sont majoritairement issues des éminences ganglionnaires médiales. Elles ont pu être décrites grâce à des dépôts de cristaux de DiI au niveau des EGM (Lavdas et al., 1999 ; Anderson et al., 2001 ; Jimenez et al., 2002), des greffes d'éminences ganglionnaires issues de souris GFP (Marin et al., 2001) ou marquées au BrdU (Anderson et al., 2001). Elles ont été confirmées grâce à l'utilisation de lignées de souris transgéniques GAD67-EGFP, exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la GAD67, l'enzyme de synthèse majoritaire du GABA (Tanaka et al., 2003). Les interneurones générés précocement au niveau des EGM migrent superficiellement, envahissant la pré-plaque du néocortex en développement (Figure 14A).

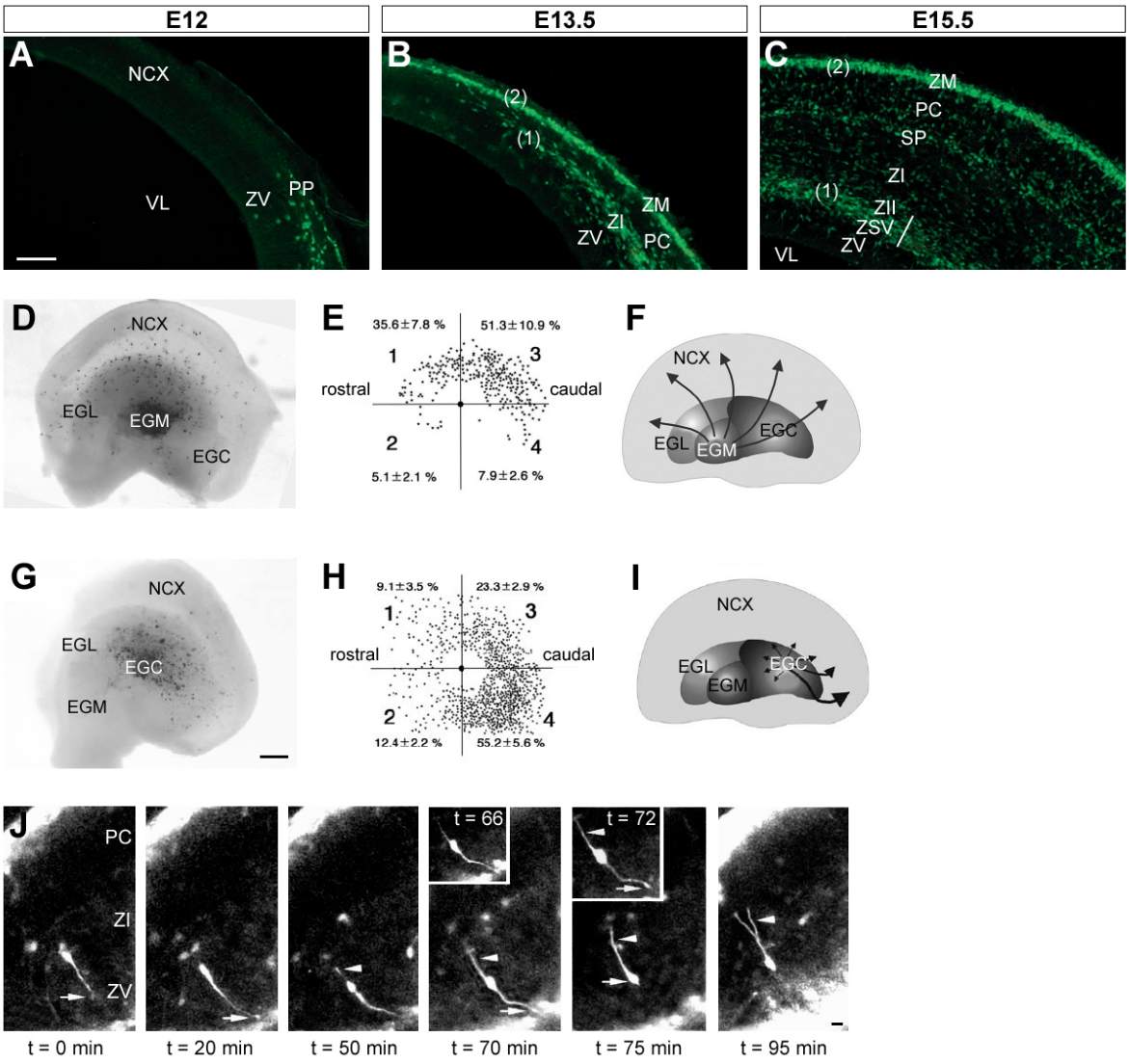


Figure 14. Voies de migration tangentielle des interneurones.
A-C) Interneurones GFP+ au niveau du néocortex dorsal de souris GAD67-EGFP. Aux stades précoces (A), les interneurones migrent au sein de la pré-plaque (PP). Aux stades intermédiaires, les interneurones migrent selon 2 voies, une voie profonde (1), au niveau de la zone intermédiaire (ZI) et une voie superficielle (2), au niveau de la zone marginale (ZM). Aux stades tardifs, les interneurones migrent selon 2 voies, une voie profonde (1), au niveau des zones sous-ventriculaire (ZSV) et intermédiaire inférieure (ZII) et une voie superficielle (2), au niveau de la zone marginale (ZM). Aux stades tardifs, les interneurones ont envahi la plaque corticale (PC) et migrent également le long de la sous-plaque (SP). Echelle, 100 µm. [D'après (Tanaka et al., 2003)]
D-I) Expériences d'électroporations focales à E13.5 au niveau des éminences ganglionnaires médiales (EGM, D-F) et caudales (EGC, G-I), à l'aide d'oligonucléotides marqués FITC. Après 40h, les hémisphères sont étalés (D et G) et la position des interneurones ayant migré est repérée sur un axe rostro-caudal (E et H), permettant de schématiser les voies migratoires à partir des EGM (F) et des EGC (I). Les interneurones FITC+ issus des EGM migrent latéralement et de façon centrifuge pour coloniser largement le néocortex, alors que ceux issus des EGC migrent caudalement. Echelle, 400 µm. [D'après (Yozu et al., 2005)]
J) Interneurone migrant radialement vers le ventricule latéral, avant de changer de direction vers la plaque corticale. Echelle, 20 µm. [D'après (Nadarajah et al., 2002)]

Phase intermédiaire (E12.5-E14.5) :

Les vagues migratoires suivantes, décrites dans les études citées précédemment, proviennent essentiellement des éminences ganglionnaires médiales, à partir desquelles l'expansion des interneurones est latérale et centrifuge (Figure 14D-F). Grâce à l'utilisation de souris GAD67-EGFP, Tanaka et collaborateurs (Tanaka et al., 2003) ont montré qu'à partir d'E13.5, les interneurones migrent au sein du néocortex en développement en empruntant deux voies (Figure 14B) : 1) une voie profonde, au niveau de la zone intermédiaire et 2) une voie superficielle, au niveau de la zone marginale à présent constituée.
Au cours de cette phase, les interneurones migrant au niveau de la zone intermédiaire, zone où ils sont également les plus dynamiques, peuvent changer de direction et obliquer vers la zone marginale (Tanaka et al., 2003). La vitesse de migration des interneurones issus des EGM est de l'ordre de 60 µm / h (Polleux et al., 2002).
A la même période, les interneurones issus des EGM colonisent également le striatum (Marin et al., 2001) et ceux issus des EGL migrent de manière rostrale, à destination du bulbe olfactif (Wichterle et al., 2001).
Pour finir, les interneurones issus des EGC migrent à destination de la portion la plus caudale du cortex cérébral, mais également à destination de l'hippocampe (Figure 14G-I). Cette migration est extrêmement rapide, de l'ordre de 110 µm / h (Yozu et al., 2005).

Phase tardive (à partir de E15.5) :

Aux stades les plus tardifs du développement cortical, les interneurones sont générés à la fois au niveau des EGM et des EGL (Anderson et al., 2001). Ils migrent à présent selon deux voies majoritaires (Figure 14C) (Tanaka et al., 2003) : 1) une voie profonde, au niveau de la zone sous-ventriculaire et de la zone intermédiaire inférieure (ZSV-ZII) et 2) une voie superficielle, au niveau de la zone marginale.
Au cours de cette phase, les interneurones migrant au niveau des ZSV-ZII peuvent changer de direction et migrer radialement à destination de la plaque corticale, où de très nombreux interneurones peuvent être détectés (Tanaka et al., 2003). Une voie migratoire annexe peut être également distinguée au

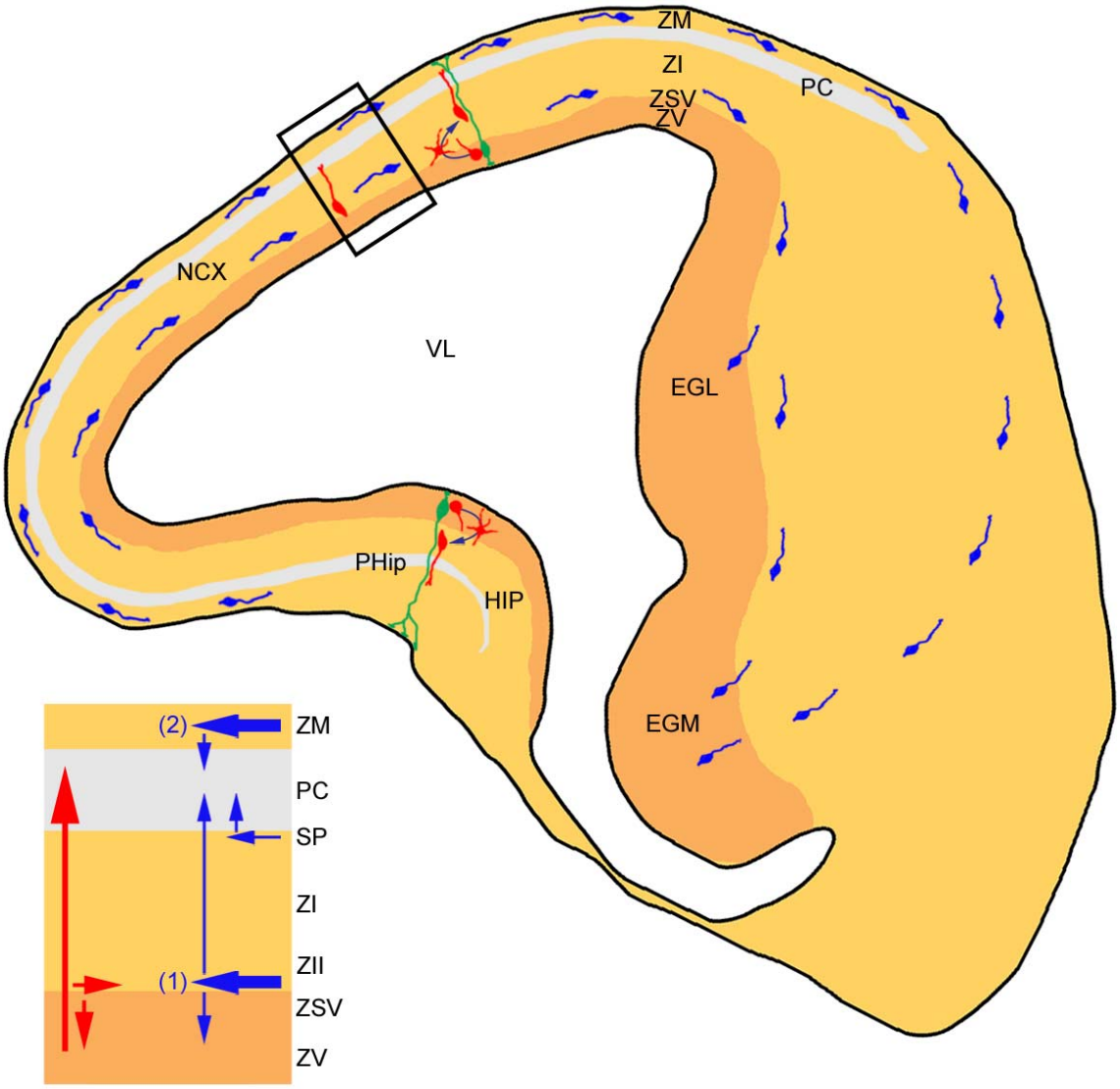


Figure 15. Modèle général : migrations radiales et tangentielles.
Les neurones excitateurs (en rouge) et les interneurones (en bleu) empruntent des voies migratoires complexes et largement coexistantes.
Les neurones excitateurs migrent majoritairement de façon radiale, du ventricule latéral (VL) vers la surface externe du cortex, mais peuvent également migrer en direction du ventricule et même tangentiellement, selon un mode multipolaire, au niveau des zones sous-ventriculaire et intermédiaire inférieure (ZSV-ZII).
Les interneurones migrent majoritairement de façon tangentielle, en empruntant une voie profonde, au niveau des zones sous-ventriculaire et intermédiaire inférieure (ZSV-ZII), et une voie superficielle, au niveau de la zone marginale (ZM). Ils migrent également tangentiellement au niveau d'une voie migratoire annexe, au niveau de la sous-plaque (SP).
Afin de s'établir au niveau de leur couche de destination, ils peuvent également migrer de façon radiale, à partir des voies migratoires principales, en direction du ventricule ou de la plaque corticale. Une migration oblique à partir de la zone intermédiaire (non représentée) a également été décrite.
Les zones sous-ventriculaire et intermédiaire inférieure représentent une zone de convergence entre les 2 types neuronaux en migration.

niveau de la sous-plaque (Figure 14C).
Grâce à des approches par vidéo-microscopie, Nadarajah et collaborateurs (Nadarajah et al., 2002) ont également montré que des interneurones en migration tangentielle au niveau de la plaque corticale, peuvent migrer radialement en direction du ventricule (Figure 14J). Arrivés au contact de la zone ventriculaire, certains d'entre eux séjournent quelques temps au niveau de cette zone germinative, avant de changer de direction et d'entreprendre une nouvelle migration radiale à destination de la plaque corticale. Ces observations ont été confirmées par Ang et collaborateurs (Ang, Jr. et al., 2003), qui ont également rapporté des phases d'extension de prolongements orientés radialement en direction du ventricule, avant rétraction et reprise de la migration tangentielle.
Les mouvements tardifs des interneurones, modifiant leurs modes de migration tangentielle pour entreprendre des migrations multidirectionnelles, recherchant le contact avec les zones germinatives ou la plaque corticale, seraient nécessaires au positionnement définitif au sein de la couche corticale de destination [proposé par (Nadarajah et al., 2002 ; Ang, Jr. et al., 2003)].

1.4 Modèle général.

Les découvertes récentes ont révélé la complexité des modes et voies migratoires des neurones excitateurs et des interneurones. Les neurones excitateurs migrent majoritairement de façon radiale, en un trajet relativement direct vers leur couche de destination au sein de la plaque corticale, alors que les interneurones migrent majoritairement de façon tangentielle, sur des distances beaucoup plus importantes. Chacun de ces types neuronaux peut utiliser différents modes migratoires : les interneurones peuvent également migrer radialement et les neurones excitateurs tangentiellement. L'existence d'une telle diversité de modes migratoires est encore inexpliquée, mais pourrait être liée à une hétérogénéité au sein même des populations de neurones excitateurs et d'interneurones, déjà en partie révélée pour certaines populations d'interneurones (voir plus haut). La Figure 15 résume les voies migratoires identifiées à l'heure actuelle.

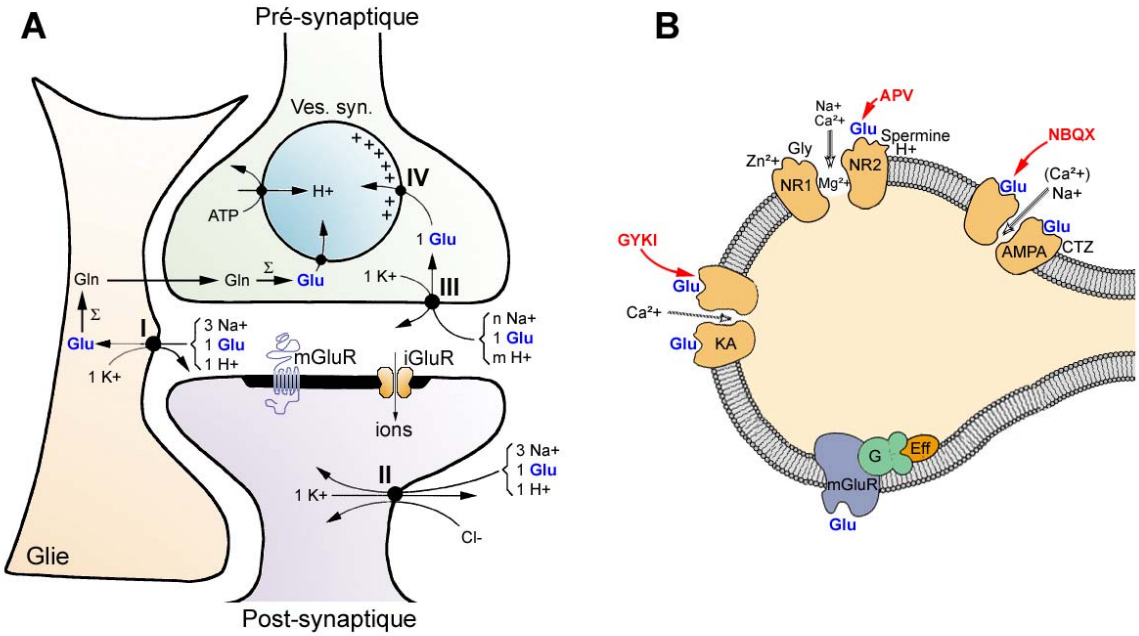


Figure 16. Les récepteurs et transporteurs du glutamate, schéma général.
A) Représentation schématique d'une synapse glutamatergique. Le glutamate est synthétisé au niveau cytoplasmique par la glutaminase, puis chargé au sein des vésicules synaptiques (Ves. syn.) grâce aux transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT en IV). Une fois libéré dans l'espace synaptique, le glutamate agit au niveau de récepteurs ionotropiques (iGluR) ou métabotropiques (mGluR). Il est capté par les cellules gliales adjacentes, l'élément pré- ou postsynaptique grâce à des transporteurs membranaires spécifiques : EAAT1 (GLAST) et EAAT2 (GLT-1) en I, EAAT3 (EAAC1) en II, EAAT2 et EAAT5 en III. Au niveau glial, le glutamate capté est dégradé en glutamine par la glutamine synthase. [D'après (Danbolt, 2001;Shigeri et al., 2004)]
B) Différents types de récepteurs du glutamate. Les récepteurs ionotropiques sont représentés sous forme de canaux et les récepteurs métabotropiques sous forme de complexes moléculaires. La sélectivité ionique, les antagonistes spécifiques et agents modulateurs sont indiqués. [D'après Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular et Medical Aspects, Lippincott Williams and Wilkins 1999]

Chapitre 2. Récepteurs et transporteurs des neurotransmetteurs : types et expression précoce.

Le glutamate et le GABA sont les principaux neurotransmetteurs, respectivement excitateurs et inhibiteurs chez l'adulte, mais ils jouent également des rôles fondamentaux dès les stades précoces du développement du Système Nerveux Central. Ces deux neurotransmetteurs agissent par l'intermédiaire d'une grande variété de récepteurs spécifiques, ionotropiques (récepteurs canaux) et métabotropiques (récepteurs couplés à des voies de transduction intracellulaire via des protéines G), dont les différentes sous-unités constitutives sont exprimées très précocement. L'action de ces transmetteurs est limitée par capture (ou uptake), liés à l'action de transporteurs spécifiques, dont l'expression varie également au cours du développement.

2.1 Les récepteurs et transporteurs du glutamate.

Le glutamate, synthétisé au niveau cytoplasmique grâce à la glutaminase (Figure 16A), est stocké dans les vésicules synaptiques via des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs), dont le fonctionnement est dépendant du gradient de protons. Une fois libéré dans l'espace extracellulaire, par libération synaptique classique (Rizo and Sudhof, 2002) ou non conventionnelle (voir plus loin), le glutamate va activer des récepteurs spécifiques. Le glutamate agit par l'intermédiaire de trois sous-classes de récepteurs ionotropiques (iGluRs ; Figure 16B), identifiées par le nom de leur agoniste sélectif (AMPA, kaïnate et NMDA) (Ozawa et al., 1998) et de trois groupes (I-III) de récepteurs métabotropiques (mGluR ; Figure 16B) qui ne seront pas présentés ici. Le glutamate est ensuite lié à des transporteurs de haute affinité dépendant du sodium (EAATs), portés par les membranes des neurones et des cellules gliales, afin de terminer et limiter son action (Danbolt, 2001 ; Shigeri et al., 2004) (Figure 16A).

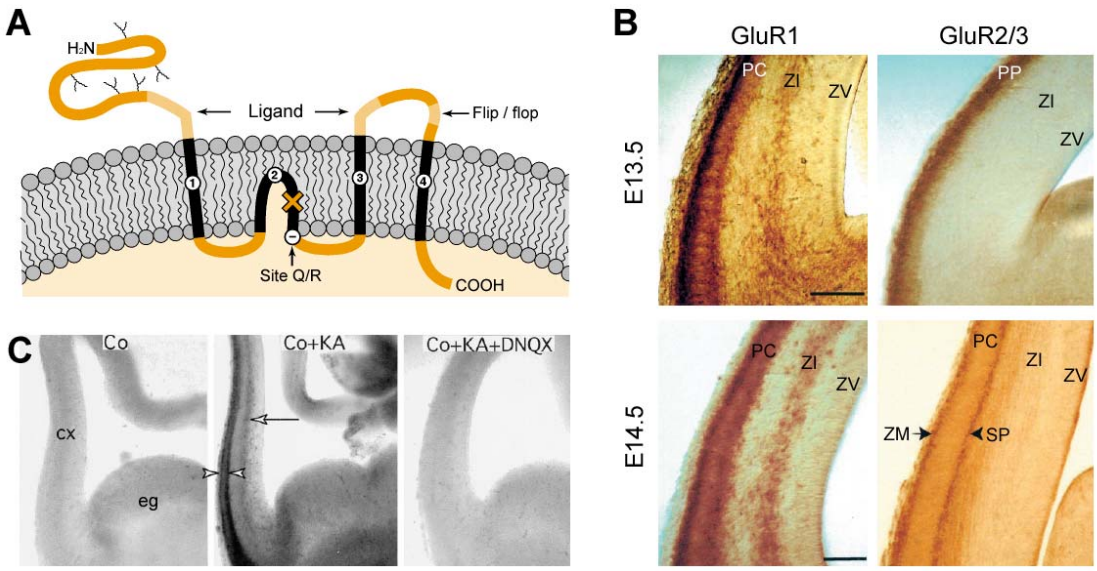


Figure 17. Structure et expression précoce des récepteurs AMPA.
A) Représentation schématique de la structure d'une sous-unité du récepteur AMPA. L'extrémité N-terminale (H2N) est extracellulaire et présente des sites de glycosylation, l'extrémité C-terminale (COOH) est intracellulaire. Le site de liaison du ligand est extracellulaire, porté par deux domaines. Le site Q/R et le domaine flip/flop sont indiqués. [D'après Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular et Medical Aspects, Lippincott Williams and Wilkins 1999]
B) Expression précoce des sous-unités GluR1 et GluR2/3. GluR1 est exprimée dès E13.5 au niveau de la zone intermédiaire (ZI) et de la plaque corticale (PC). GluR2 est exprimé au niveau de la pré-plaque (PP) dès E13.5, puis de la sous-plaque (SP) et de la zone marginale (ZM) à E14.5. Echelle 150 µm. [D'après (Metin et al., 2000)]
C) Accumulation de cobalt (Co) suite à l'application de kaïnate (KA), par les interneurones en migration [zone intermédiaire (flèche) et zone marginale et sous-plaque (têtes de flèche)]. Cette accumulation est bloquée par le DNQX, un antagoniste non sélectif des récepteurs AMPA/KA. [D'après (Metin et al., 2000)]

2.1.1 Les récepteurs AMPA.

Nature des récepteurs AMPA :

Les récepteurs AMPA sont fonctionnels sous forme de complexes homo- ou hétéro-tétramériques, composés des sous-unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4. Les récepteurs AMPA sont responsables de la neurotransmission excitatrice rapide. Ils sont perméables aux ions sodium et potassium et ceux ne comportant pas de sous-unités GluR2 sont perméables au calcium et ont des conductances plus importantes. L'α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) est l'agoniste sélectif des récepteurs de type AMPA, qui peuvent être également activés de manière non spécifique par le kaïnate. Le NBQX (2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide) est un antagoniste compétitif du récepteur AMPA. Le CNQX (6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline) est un antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs AMPA et kaïnate. (Ozawa et al., 1998 ; Johansen et al., 2003) (Figure 16B).

Expression précoce des récepteurs AMPA :

La sous-unité GluR1 est détectée au niveau de la zone intermédiaire inférieure et de la pré-plaque dès E13.5, puis de la zone marginale et de la sous-plaque dès E14.5 (Figure 17B) (Metin et al., 2000). Son niveau d'expression augmente ensuite progressivement aux stades embryonnaires tardifs (E20), et postnatals précoces. A P0-P5, la sous-unité GluR1 est exprimée au niveau de la couche I, puis son expression s'étend à l'ensemble des couches corticales au cours de la deuxième semaine de vie postnatale (Durand and Zukin, 1993 ; Martin et al., 1998). Au niveau hippocampique, l'expression de GluR1 augmente progressivement à la fin de la période embryonnaire (Durand and Zukin, 1993) et à P0-P3, des clusters de cellules pyramidales immunopositifs pour GluR1 sont observés, particulièrement au niveau de CA3 (Martin et al., 1998). Les sous-unités GluR2 et GluR3 sont également détectées aux stades embryonnaires : au niveau de la pré-plaque dès E13.5 et au niveau de la zone marginale et de la sous-plaque dès E14.5 (Figure 17B) (Metin et al., 2000). Les niveaux d'expression de GluR2/3 au niveau cortical et hippocampique continuent d'augmenter aux stades embryonnaires tardifs, jusqu'à atteindre les niveaux

adultes (Durand and Zukin, 1993 ; Hall and Bahr, 1994). Les sous-unités GluR4 sont exprimées très tardivement, devenant détectables à partir de P14 et chez l'adulte (Hall and Bahr, 1994).

Expression de récepteurs AMPA fonctionnels :

Du fait d'un épissage alternatif, chaque sous-unité constitutive des récepteurs AMPA existe sous une forme flip, prédominante chez l'embryon, et une forme flop, apparaissant au cours de la maturation postnatale (Figure 17A). Ces deux formes diffèrent par leurs propriétés cinétiques (Sommer et al., 1990 ; Sommer et al., 1991). Chaque sous-unité possède également dans sa séquence un site Q/R (Figure 17A) : par une édition de l'ARN, la glutamine (Q) peut être substituée par une arginine (R) au niveau des sous-unités GluR2. Les sous-unités GluR2 ainsi éditées deviennent imperméables au calcium, alors que les sous-unités GluR2 non éditées sont perméables au calcium. Le site Q/R est également impliqué dans la conductance du canal et la sensibilité du récepteur aux toxines. Les formes adultes de GluR2 sont majoritairement éditées, alors que les formes embryonnaires ne le sont pas (Burnashev et al., 1992), suggérant que les récepteurs AMPA présents au cours du développement sont perméables au calcium (Ozawa et al., 1998). Les interneurones en migration au niveau de la zone intermédiaire corticale à E13.5 – E15.5 expriment des récepteurs AMPA ayant les caractéristiques de récepteurs AMPA perméables au calcium (Metin et al., 2000). Ces récepteurs sont très perméables au cobalt et l'accumulent suite à l'application de kaïnate (agoniste non sélectif des récepteurs AMPA/kaïnate), cette accumulation étant bloquée par l'application concomitante de DNQX (antagoniste non sélectif des récepteurs AMPA/KA) (Figure 17C) (Metin et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres laboratoires (Poluch et al., 2001 ; Poluch et al., 2003). Des influx de calcium visualisés grâce à des indicateurs calciques sont également enregistrés suite à l'application de kaïnate, au niveau de cellules en migration au niveau de la zone intermédiaire. Ces influx calciques sont bloqués par l'application concomitante de CNQX (Soria and Valdeolmillos, 2002). Enfin, des courants évoqués par l'application d'AMPA sont enregistrables dès E16 au niveau de la zone ventriculaire corticale (LoTurco et al., 1995).

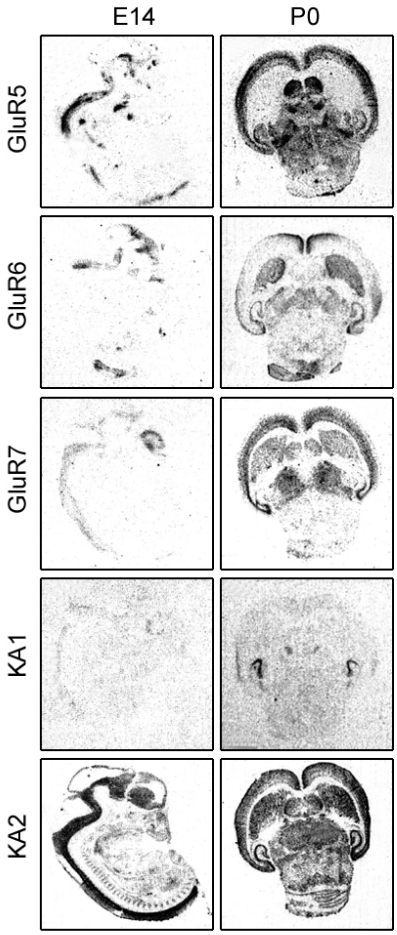


Figure 18. Expression précoce des récepteurs kaïnate.
Distribution des ARNm codant pour les différentes sous-unités des récepteurs kaïnate chez le rat, à 14 jours de développement embryonnaire (E14), sur coupes sagittales d'embryon entier et à la naissance (P0), sur coupes horizontales de cerveau. [D'après (Bahn et al., 1994)

2.1.2 Les récepteurs kaïnate.

Nature des récepteurs kaïnate :

Les récepteurs kaïnate sont fonctionnels sous forme de complexes homo- ou hétéro-tétramériques, composés des sous-unités GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2. L'activation des récepteurs kaïnate, perméables au calcium, se caractérise par une réponse ample et soutenue. Le GYKI53655 est un antagoniste non compétitif des récepteurs AMPA qui permet de différencier efficacement les récepteurs AMPA et kaïnate. A l'inverse, le CNQX est un antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs AMPA et kaïnate (Ozawa et al., 1998).

Expression précoce des récepteurs kaïnate :

Les ARNm de toutes les sous-unités des récepteurs kaïnate, à l'exception de la sous-unité KA1, sont détectés dès E12, mais la présence de sites de haute affinité pour le kaïnate, reflet de la présence de récepteurs, n'est observée qu'à partir d'E14 (Figure 18). Toutes les sous-unités montrent une expression croissante au cours des stades embryonnaires tardifs et postnatals précoces (Bahn et al., 1994). Au niveau cortical, la sous-unité GluR5 est modérément exprimée dès E17 et son niveau d'expression est croissant jusqu'à la fin de la gestation. Aux stades postnatals précoces (P0-P5), l'expression est forte au niveau de la couche II, puis décroît (P12) jusqu'à atteindre des niveaux faibles chez l'adulte. La sous-unité GluR5 est détectable au niveau hippocampique dès E15. Elle devient observable au niveau de la couche pyramidale des régions CA1 et CA3 dès la naissance, pour atteindre des niveaux modérés à P5-P12 pour CA1 et faibles chez l'adulte (Bahn et al., 1994). Au niveau cortical, les sous-unités GluR6 et GluR7 ont des patrons d'expression similaires, elles sont modérément puis fortement exprimées dès E17 puis E19. Un pic d'expression est observé aux stades périnatals (P0-P5) au niveau des cortex cingulaire et entorhinal, puis les niveaux d'expression des sous-unités diminuent pour atteindre des niveaux faibles à modérés à l'âge adulte. Au niveau hippocampique, GluR6 est modérément exprimé dès E17, plus particulièrement au niveau des couches pyramidales de CA1 et CA3 aux stades périnatals (E19-P0). L'expression de GluR6 est détectable au niveau du gyrus denté à la naissance et devient

modérée (P12) puis forte chez l'adulte. GluR7 est faiblement détectable au niveau de CA1 et CA3 à partir des stades postnatals (P0-P5) et chez l'adulte (Bahn et al., 1994). Les sous-unités KA1 et KA2 sont détectables dès E14 au niveau cortical et hippocampique, même si KA1 est très faiblement exprimée. KA2 est fortement exprimée au niveau cortical dès E17, et plus particulièrement au niveau des couches II et VI dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte. Au niveau hippocampique, KA2 est fortement exprimée dès E17, et plus particulièrement au niveau du gyrus denté et des couches pyramidales de CA1 et CA3 dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte. L'expression de la sous-unité KA1, restreinte à la région CA3, est détectable dès E17 et persiste à des niveaux élevés chez l'adulte (Bahn et al., 1994).

Expression de récepteurs kaïnate fonctionnels :

Peu d'études ont examiné la fonctionnalité des récepteurs kaïnate au cours du développement, même si l'expression de ces récepteurs semble être très précoce (Bahn et al., 1994). Des courants synaptiques portés par l'activation de récepteurs kaïnate ont été enregistrés au cours des premiers jours de développement postnatal au niveau de la couche IV du cortex somato-sensoriel. Ces courants seraient majoritaires à cette période (Kidd and Isaac, 1999).

2.1.3 Les récepteurs NMDA.

Nature des récepteurs NMDA :

Les récepteurs NMDA sont fonctionnels sous forme de complexes hétéro-tétramériques, composés de plusieurs sous-unités NR1 combinées avec au moins un type de sous-unités NR2 (NR2A – NR2D), qui lient le glutamate. Les sous-unités de type NR3 ne semblent pas former de récepteurs fonctionnels entre-elles, mais peuvent être co-assemblées avec des complexes NR1/NR2. Les récepteurs NMDA sont responsables d'une neurotransmission excitatrice différente de celle liée aux récepteurs AMPA. Ils sont caractérisés par un blocage voltage-dépendant par les ions magnésium, une forte perméabilité aux ions calcium et par des cinétiques d'activation / dé-activation lentes. Les récepteurs NMDA sont également sensibles à de nombreux facteurs modulateurs : le co-

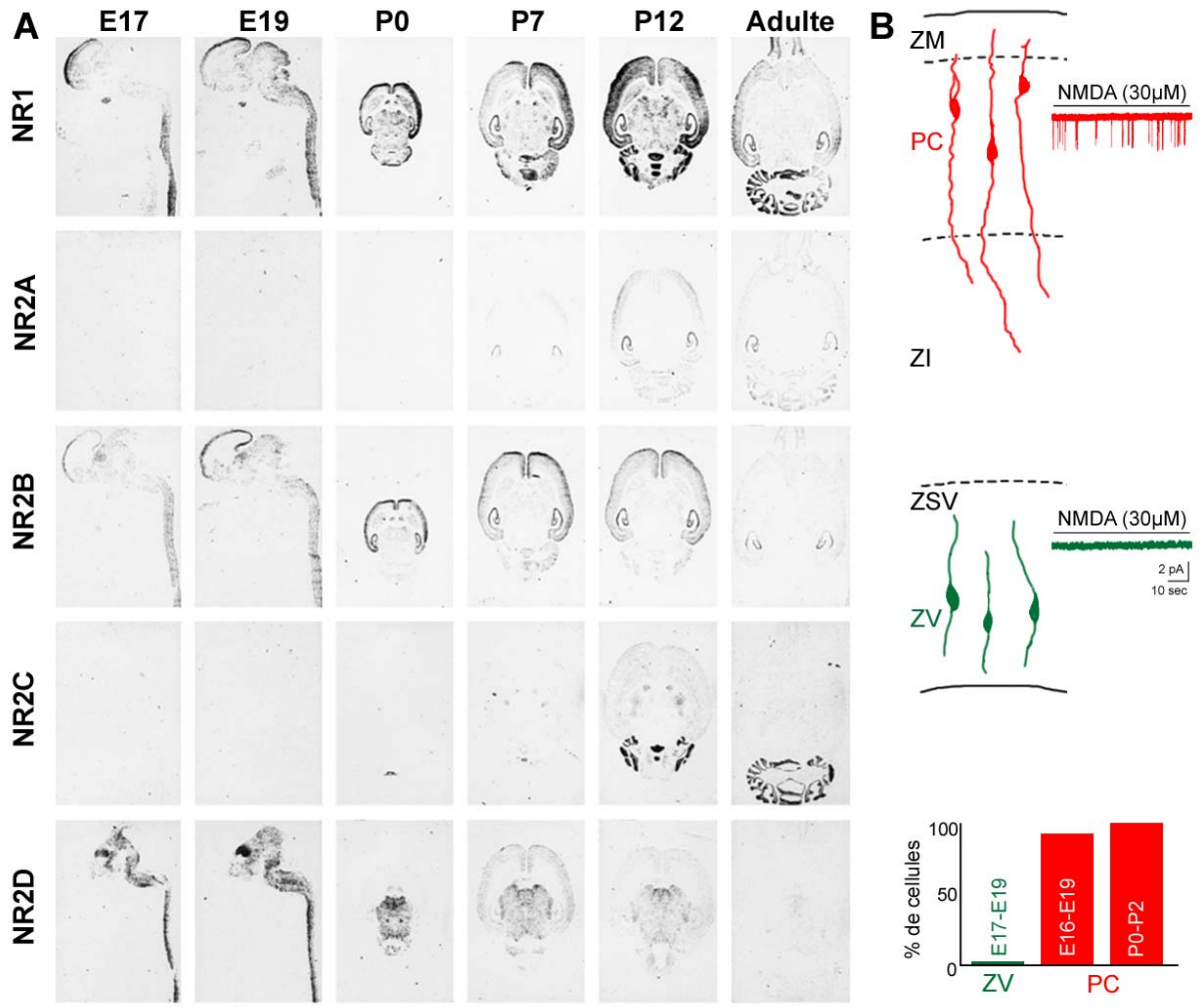


Figure 19. Expression précoce des récepteurs NMDA.
A) Distribution des ARNm codant pour les sous-unités NR1, NR2A-NR2D des récepteurs NMDA chez le rat, aux stades embryonnaires (E17-19, coupes sagittales), postnatals précoces (P0-12) et chez l'adulte (coupes horizontales). [D'après (Monyer et al., 1994)]
B) Reconstruction de 6 neurones enregistrés au niveau de la zone ventriculaire (ZV en vert) et de la plaque corticale (PC en rouge) de coupes de cerveaux d'embryons de rat (E17-18). L'application de NMDA (30µM) évoque l'ouverture de canaux au niveau des neurones de la plaque corticale (en haut à droite, en rouge), mais pas au niveau des neurones enregistrés au niveau de la zone ventriculaire (en bas à droite, en vert). L'histogramme (au milieu à droite) illustre le pourcentage de neurones présentant cette activité. [D'après (LoTurco et al., 1991)]

agoniste glycine (ou D-sérine) doit être lié au récepteur (sous-unité NR1) avant que celui-ci ne puisse être activé, le pH, le zinc et les polyamines peuvent modifier son fonctionnement. Le D-APV est un antagoniste compétitif du récepteur NMDA. Le MK-801 exerce un blocage voltage-dépendant du canal NMDA (Ozawa et al., 1998 ; Cull-Candy et al., 2001).

Expression précoce des récepteurs NMDA :

Les ARNm des sous-unités NR1, NR2B et NR2D sont faiblement détectables dès E14, alors que les ARNm des sous-unités NR2A et NR2C ne sont pas détectées au cours de la période embryonnaire (Figure 19A) (Monyer et al., 1994). A partir de E17 et tout au long de la période embryonnaire, NR1 est la sous-unité la plus fortement exprimée au niveau cortical et hippocampique. Une expression au niveau du cervelet en développement est observable dès E19. Cette distribution persiste chez l'adulte (Monyer et al., 1994). La sous-unité NR2A, non exprimée au cours de la période embryonnaire et à la naissance, devient détectable dès P7 au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet. Cette distribution persiste chez l'adulte (Monyer et al., 1994). La sous-unité NR2B est fortement exprimée au niveau cortical, principalement au niveau de la couche I, et plus faiblement au niveau hippocampique, dès E17. Son niveau d'expression augmente après la naissance, devenant détectable au niveau du cervelet à P7. Cette distribution persiste chez l'adulte, à l'exception du cervelet, où la sous-unité NR2B n'est plus détectable (Monyer et al., 1994). Les sous-unités NR1, NR2A et NR2B sont particulièrement exprimées au niveau des couches pyramidales des régions CA1 et CA3, ainsi qu'au niveau de la couche granulaire du gyrus denté, dès la fin de la première semaine de vie postnatale (Monyer et al., 1994). La sous-unité NR2C n'est pas exprimée au cours des périodes embryonnaire et post-natales précoces, et devient détectable à P7 au niveau des interneurones hippocampiques des strata *oriens* et *radiatum*. Elle est détectée dès P12 au niveau des noyaux thalamiques et très fortement au niveau du cervelet, où l'expression persiste chez l'adulte (Monyer et al., 1994). La sous-unité NR2D est principalement exprimée au niveau du diencéphale, du mésencéphale et de la moelle épinière, dès E17. NR2D devient détectable au niveau des noyaux thalamiques, mais également au niveau cortical à P7. Cette expression maximale à P7 est transitoire, NR2D n'étant que très faiblement exprimée par la suite et

chez l'adulte (Monyer et al., 1994). Les sous-unités NR3 sont détectées dès E15 et leurs niveaux d'expression augmentent à la fin de la gestation et aux stades périnatals, pour atteindre un pic d'expression à la fin de la première semaine postnatale (P7). Les niveaux d'expression s'effondrent alors rapidement, pour atteindre des niveaux très faibles dès la fin de la deuxième semaine de vie postnatale (Sun et al., 1998).

Expression de récepteurs NMDA fonctionnels :

Des courants portés par l'activation des récepteurs NMDA sont enregistrés dès E16 au niveau des neurones de la plaque corticale, mais pas au niveau de la zone ventriculaire (Figure 19B) (LoTurco et al., 1991). Sur des neurones dissociés à partir des zones ventriculaire et sous-ventriculaire (et une partie de la zone intermédiaire), des influx calciques portés par l'activation de récepteurs NMDA sont enregistrés, grâce à l'utilisation d'indicateurs calciques, chez moins de 20% des cellules à la fin de la gestation. Des courants portés par l'activation des récepteurs NMDA sont également enregistrables (Behar et al., 1999). Enfin, des influx calciques portés par l'activation de récepteurs NMDA sont enregistrés au niveau des cellules en migration au niveau de la zone intermédiaire, bloqués par l'application d'APV (Soria and Valdeolmillos, 2002). Ces observations n'ont pas été confirmées par des enregistrements électrophysiologiques, Métin et collaborateurs ayant rapporté une absence de réponse NMDA au niveau de ces cellules (Metin et al., 2000). Ainsi, les observations de Soria et Valdeolmillos pourraient correspondre aux réponses de neurones corticaux et non à celles d'interneurones en migration tangentielle (voir plus loin).

2.1.5 Les transporteurs du glutamate.

Les transporteurs vésiculaires du glutamate :

Trois types de transporteurs vésiculaires du glutamate ont été identifiés (Fremeau, Jr. et al., 2004). VGLUT1 et VGLUT2 sont exprimés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones glutamatergiques, avec une distribution variable. VGLUT1 est particulièrement enrichi au niveau cortical et hippocampique (*stratum pyramidale* et gyrus denté) alors que VGLUT2 est

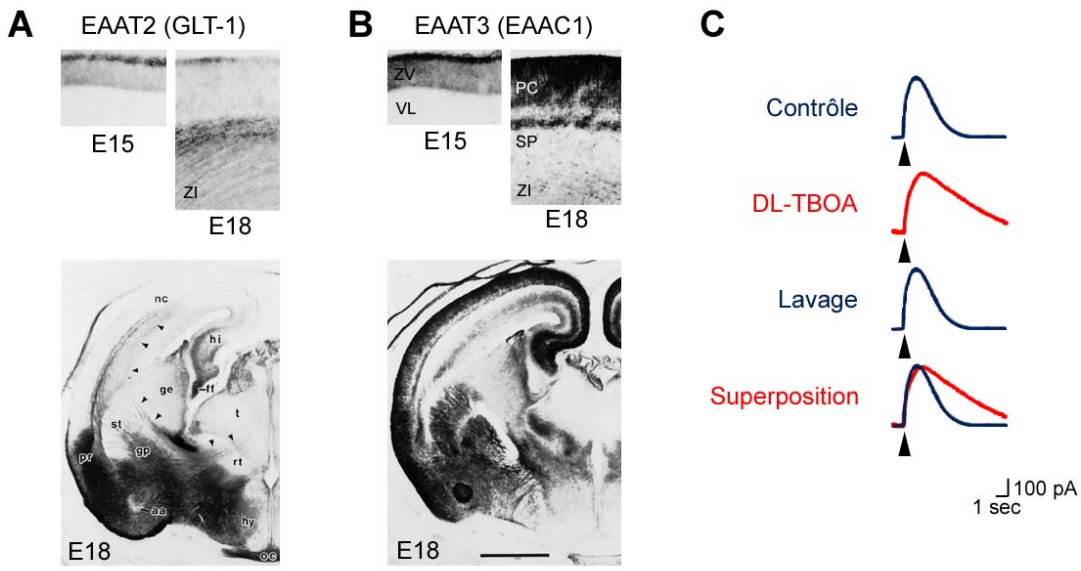


Figure 20. Expression précoce des transporteurs du glutamate EAAT2 et EAAT3.
Expression des transporteurs EAAT2 (A) et EAAT3 (B) au niveau du néocortex (panneaux du haut) et du cerveau antérieur (panneaux du bas). L'expression d'EAAT3 est plus importante que celle d'EAAT2, au niveau de la zone marginale corticale à E15 comme de l'ensemble de la plaque corticale et hippocampique aux stades ultérieurs [D'après (Furuta et al., 1997)]
B) L'application de DL-TBOA, un bloqueur des transporteurs EAAT1-3 allonge la durée des courants évoqués par l'application de glutamate (flèche), comme montré sur la superposition des deux traces. L'expérience est réalisée en présence de TTX et de bicuculline. [D'après (Demarque et al., 2002)]

restreint à la couche IV du cortex et au thalamus (Fremeau, Jr. et al., 2004). VLGUT1 est faiblement détecté dès E15 et VGLUT2 dès E18, VGLUT2 étant le transporteur vésiculaire prédominant chez l'embryon (Boulland et al., 2004). Le niveau d'expression des deux transporteurs vésiculaires augmente lors du développement postnatal (Gras et al., 2005). VGLUT3 est exprimé par les neurones glutamatergiques corticaux (particulièrement au niveau de la couche II) et hippocampiques, mais est également détecté au niveau d'une sous-population d'interneurones hippocampiques (Fremeau, Jr. et al., 2004 ; Somogyi et al., 2004). VGLUT3 est peu détectable chez l'embryon, même si une expression peut être observée au niveau de l'hippocampe à E18 (Boulland et al., 2004). Son niveau d'expression augmente au cours du développement postnatal (Gras et al., 2005).

Les transporteurs membranaires du glutamate :

Cinq types de transporteurs membranaires du glutamate ont été identifiés (Danbolt, 2001 ; Shigeri et al., 2004). EAAT1 (GLAST), est un transporteur glial particulièrement exprimé au niveau du cervelet, où son expression débute dès P10 (Furuta et al., 1997). EAAT1 est également détecté au niveau des zones prolifératives du télencéphale et du mésencéphale aux stades embryonnaires (Sutherland et al., 1996). EAAT2 (GLT-1) est un transporteur glial dont l'expression est faible au cours du développement embryonnaire, à l'exception de la zone marginale (où il est détectable dès E15, Figure 20A), de la sous-plaque et de la zone intermédiaire (où il est détecté de façon transitoire à E18, Figure 20A). L'expression d'EAAT2 est au contraire très importante chez l'adulte, où il est exprimé dans la quasi-totalité des structures cérébrales (Furuta et al., 1997 ; Ullensvang et al., 1997). EAAT3 (EAAC1) est un transporteur neuronal dont l'expression est précoce et intense au cours de la période embryonnaire (dès E15, Figure 20B), particulièrement au niveau cortical, hippocampique, striatal et amygdalien, et devient plus modérée aux stades postnatals et faible chez l'adulte (Furuta et al., 1997). EAAT4 est exprimé par les cellules de Purkinje du cervelet à partir de la deuxième semaine de vie postnatale (Furuta et al., 1997). EAAT5 est exprimé dans la rétine (Arriza et al., 1997).

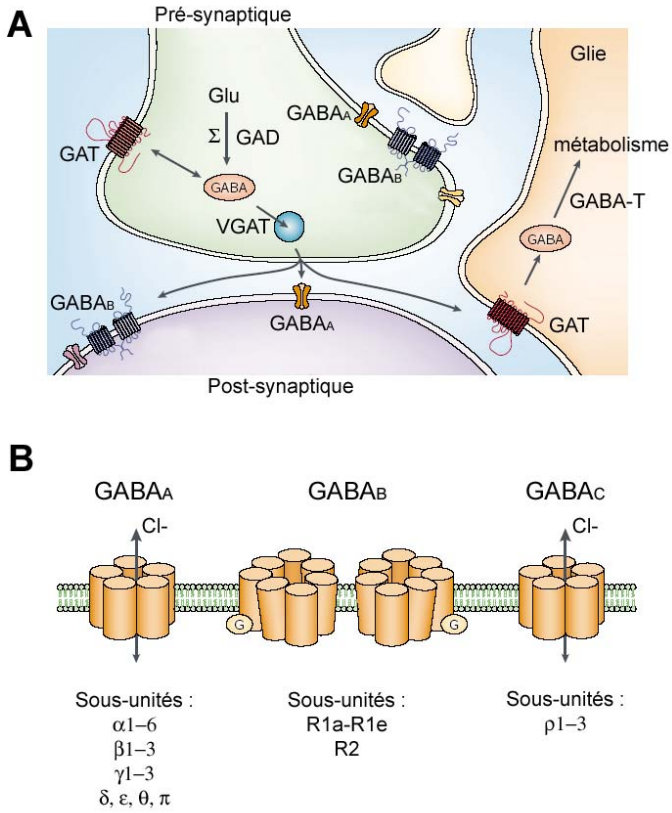


Figure 21. Les récepteurs et transporteurs du GABA, schéma général.
A) Représentation schématique d'une synapse GABAergique. Le GABA est synthétisé au niveau cytoplasmique grâce à la glutamic acid décarboxylase (GAD), puis chargé dans les vésicules synaptiques grâce aux transporteurs vésiculaires du GABA (VGAT). Une fois libéré dans l'espace synaptique, le GABA agit au niveau de récepteurs ionotropiques ($GABA_A$) ou métabotropiques ($GABA_B$), avant d'être capté au niveau des cellules gliales adjacentes grâce aux transporteurs membranaires du GABA (GAT). Le GABA est ensuite dégradé par la GABA transaminase (GABA-T).
B) Différents types de récepteurs au GABA. Les récepteurs ionotropiques ($GABA_A$ et $GABA_C$) sont représentés sous forme de complexes pentamériques composés de 5 sous-unités. Les récepteurs métabotropiques ($GABA_B$) sont fonctionnels à l'état de dimères, composés de deux sous-unités $GABA_B$, dont chacune possède 7 segments transmembranaires. [A et B, D'après (Owens and Kriegstein, 2002)]

Expression de transporteurs membranaires fonctionnels :

Les principaux transporteurs membranaires du glutamate semblent fonctionnels aux stades périnatals. En effet, l'application de DL-TBOA (DL-threo-beta-benzoloxyaspartate), un bloqueur des transporteurs EEAT1-3, prolonge la durée des courants évoqués par l'application exogène de glutamate sur tranches d'hippocampe préparées aux stades périnatals (Figure 20C) (Demarque et al., 2002). Ainsi, dès les stades précoces du développement, la présence de transporteurs fonctionnels permet de limiter l'action du glutamate. Cette action des transporteurs est cruciale, puisque le dysfonctionnement de ces transporteurs peut conduire à des crises d'épilepsie. Ainsi, le blocage des transporteurs par injection intra-cérébro-ventriculaire de DL-TBOA provoque l'apparition de crises caractérisées par un patron de décharge de type "*suppression burst*", associée à des myoclonies (Demarque et al., 2004) (Milh et al Epilepsia 2006 in press).

2.2 Les récepteurs et transporteurs du GABA.

Le GABA est synthétisé à partir du glutamate grâce aux deux isoformes de la glutamic acid decarboxylase (GAD), GAD65 et GAD67. Il est ensuite stocké dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires (VGAT). Après libération synaptique classique (Rizo and Sudhof, 2002) ou non conventionnelle (voir plus loin), il va agir par l'intermédiaire de récepteurs ionotropiques, les récepteurs de type $GABA_A$ et $GABA_C$ (Sieghart, 2000) et métabotropiques, les récepteurs de type $GABA_B$ (Bowery et al., 2002). L'action du GABA est terminée grâce à sa capture par des transporteurs membranaires spécifiques (GATs) portés par les neurones et cellules gliales voisines du site de libération (Conti et al., 2004). Le GABA est alors métabolisé par la GABA transaminase (GABA-T) (voir schéma récapitulatif Figure 21).

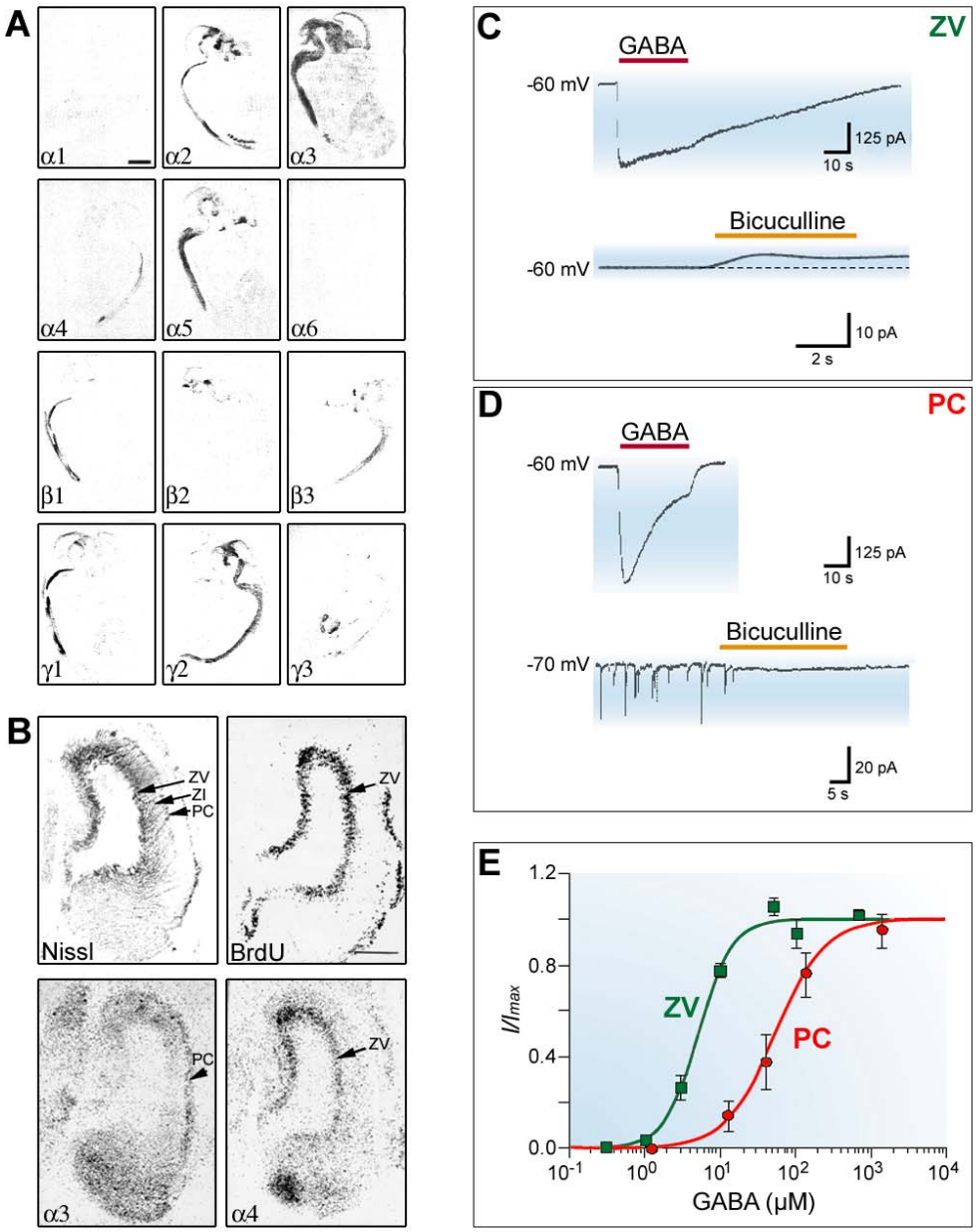


Figure 22. Expression précoce des récepteurs $GABA_A$.
A) Distribution des ARNm codant pour les sous-unités α1-α6, β1-β3, γ1-γ3, sur coupes sagittales d'embryons de rat à E14. [D'après (Laurie et al., 1992)]
B) Distribution des ARNm codant pour les sous-unités α3 et α4 sur coupes coronales de néocortex de rat à E17. La sous-unité α4 est exprimée au niveau des cellules en prolifération (BrdU+) de la zone ventriculaire, alors que la sous-unité α3 est exprimée au niveau de la plaque corticale. [D'après (Ma and Barker, 1995)]
C-D) Les courants évoqués par l'application de GABA (trace du haut) au niveau des cellules de la zone ventriculaire (C) sont amples et de cinétique lente, ne présentant pas de désensibilisation, alors que les courants évoqués au niveau des jeunes neurones de la plaque corticale (D) sont plus rapides et font l'objet d'une désensibilisation. L'application de bicuculline démasque un courant tonique au niveau des cellules la zone ventriculaire (trace du bas en D). [D'après (Owens and Kriegstein, 2002)]
E) Les récepteurs $GABA_A$ portés par les cellules de la zone ventriculaire sont activés à concentrations de GABA inférieures à celles nécessaires à l'activation de ceux portés par les jeunes neurones de la plaque corticale. [D'après (Owens and Kriegstein, 2002)]

2.2.1 Les récepteurs $GABA_A$.

Nature des récepteurs $GABA_A$:

Les récepteurs $GABA_A$ sont fonctionnels sous formes de complexes hétéro-pentamériques. On distingue de nombreux types de sous-unités des récepteurs $GABA_A$ (α1 – α6, β1 – β3, γ1 – γ3, δ, ε, θ, π) dont l'assemblage forme un canal pour les ions chlorure (Figure 21B). Les possibilités combinatoires sont multiples, mais théoriques, le sous-type de récepteur $GABA_A$ le plus exprimé étant composé des sous-unités α1, β2 et γ2. La stoechiométrie respecte le plus souvent la proportion de deux sous-unités α et deux sous-unités β pour une seule sous-unité γ, cette dernière pouvant être remplacée par une sous-unité ε, δ ou π. La bicuculline est un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ (Sieghart, 2000).

Sous-unités alpha :

Les sous-unités α2, α3, α4 et α5 sont les sous-unités dont l'expression est dominante aux stades embryonnaires (Figure 22A-B). La sous-unité α3 est exprimée dès E14 au niveau cortical et thalamique. Les sous-unités α2 et α5 sont exprimées dès E15 au niveau des zones germinatives corticales et hippocampiques, suivie de la sous-unité α4 dès E17. Leurs niveaux d'expression s'intensifient dès E19 et chez l'adulte (Killisch et al., 1991 ; Poulter et al., 1992 ; Laurie et al., 1992 ; Ma and Barker, 1995). L'expression de la sous-unité α4 est essentiellement postnatale au niveau de l'hippocampe, et présente au niveau hippocampique comme au niveau cortical, un pic centré sur la deuxième semaine de vie (Laurie et al., 1992). La sous-unité α1 est exprimée essentiellement aux stades néonatals (dès E19 pour le cortex et dès la naissance pour l'hippocampe) et son niveau expression augmente au cours du développement postnatal pour devenir très intense chez l'adulte au niveau de la grande majorité des structures cérébrales (Laurie et al., 1992 ; Poulter et al., 1992).
La sous-unité α6 a essentiellement une expression postnatale tardive (P6) et restreinte au cervelet (Laurie et al., 1992), même si une expression à des niveaux très faibles est détectable aux stades embryonnaires au niveau de quelques structures (Poulter et al., 1992).

Sous-unités béta :

La sous-unité β1 est exprimée au niveau de la zone ventriculaire corticale dès E17 (Ma and Barker, 1995). L'expression est essentiellement postnatale au niveau hippocampique, et plus transitoire au niveau cortical, disparaissant chez l'adulte (Laurie et al., 1992). Les sous-unités β2 et β3 sont exprimées dès les stades embryonnaires (E17) au niveau du cortex, de l'hippocampe (où β2 n'est exprimé qu'à partir de la naissance) et du cervelet (où β2 n'est exprimée qu'à la fin de la deuxième semaine de vie postnatale) (Laurie et al., 1992).

Sous-unités gamma :

La sous-unité γ1 est exprimée dès E17 au niveau de la zone ventriculaire corticale (Ma and Barker, 1995). Son expression corticale reste ensuite modérée jusqu'à l'âge adulte. Au niveau hippocampique, γ1 est fortement exprimée aux stades postnatals précoces, puis son expression devient modérée jusqu'à disparaître chez l'adulte (Laurie et al., 1992). La sous-unité γ2 est exprimée dès E17 au niveau du cortex et de l'hippocampe et son expression se maintient au niveau cortical jusqu'à l'âge adulte, devenant même intense chez l'adulte au niveau hippocampique. La sous-unité γ3 possède une expression postnatale, montrant un pic d'expression au cours de la deuxième semaine de vie pour disparaître chez l'adulte, au niveau cortical comme hippocampique (Laurie et al., 1992).

Expression de récepteurs $GABA_A$ fonctionnels :

Des récepteurs $GABA_A$ fonctionnels sont exprimés par les cellules précurseurs des de la zone ventriculaire corticale dès E16 (LoTurco et al., 1995). A ce stade, l'action du GABA est dépolarisante (voir plus bas). Les récepteurs $GABA_A$ exprimés ont des caractéristiques électrophysiologiques variables au cours du développement (Owens et al., 1999). Ainsi, les récepteurs exprimés par les cellules précurseurs de la zone ventriculaire corticale ont des affinités importantes pour le GABA et ne font pas l'objet de désensibilisation (Figure 22D-E). De plus, ces cellules sont activées de façon tonique par le GABA, comme démontré par l'application d'antagonistes des récepteurs $GABA_A$ (Figure 22D). A

l'inverse, les récepteurs exprimés par les neurones de la plaque corticale au même stade présentent des affinités plus faibles pour le GABA et font l'objet d'une désensibilisation rapide (Figures 22C, 22E). Les courants toniques ne sont plus observés (Owens et al., 1999). Les différentes propriétés des récepteurs $GABA_A$ sont liées à des compositions en sous-unités différentes selon les structures cérébrales (Serafini et al., 1998), et selon les types cellulaires. Ainsi, les sous-unités α4, β1 et γ1 seraient prédominantes au niveau des zones germinatives corticales, alors que α3, β2/3 et γ3 seraient prédominantes au niveau des jeunes neurones de la plaque corticale (Figure 22B) [(Ma and Barker, 1995) et voir plus haut].

2.2.2 Les récepteurs $GABA_C$.

Les récepteurs $GABA_C$ sont fonctionnels sous formes de complexes homo- ou hétéro-pentamériques composés d'un ou de plusieurs types de sous-unités ρ, dont l'assemblage forme un canal chlore insensible à la bicuculline, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ (Figure 21B). En raison des fortes homologies de séquence des sous-unités ρ avec les sous-unités des récepteurs $GABA_A$, les récepteurs $GABA_C$ peuvent être considérés comme une sous-classe de récepteurs $GABA_A$ (Bormann, 2000).

2.2.3 Les récepteurs $GABA_B$.

Nature des récepteurs $GABA_B$:

Les récepteurs $GABA_B$ sont des récepteurs couplés aux protéines G, de la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires. Ils sont fonctionnels sous formes de complexes hétéro-dimériques composés de deux sous-unités : $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$ (Figure 21B). La sous-unité $GABA_{B1}$ existe sous plusieurs variants du fait d'un épissage alternatif ($GABA_{B1a}$ – $GABA_{B1e}$) (Bowery et al., 2002). Les récepteurs $GABA_B$ sont principalement responsables de la modulation de l'excitabilité neuronale, du fait de leur localisation pré et post-synaptique (Bormann, 2000), mais ils jouent également des rôles importants au cours du développement (voir plus loin).

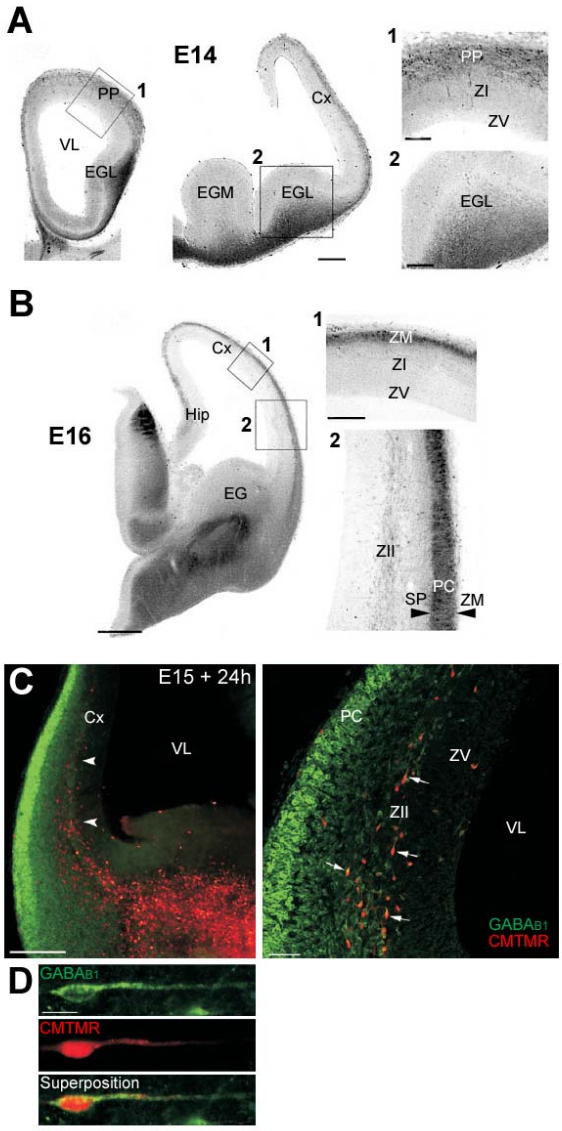


Figure 23. Expression précoce des récepteurs $GABA_{B1}$.
A-B) Expression des récepteurs $GABA_{B1}$ sur coupes coronales de cerveaux d'embryons de rat à E14 (A) et E16 (B). L'expression est d'abord détectée au niveau de la pré-plaque (PP), puis de la zone marginale (ZM) (panneau 1 en A) et de la zone intermédiaire inférieure (ZII) (panneau 2 en B). [D'après (Lopez-Bendito et al., 2002)]
C) Les cellules exprimant $GABA_{B1}$ (vert) au niveau de la zone intermédiaire inférieure sont des interneurones en migration, issus des éminences ganglionnaires. Leur migration est visualisée 24h après dépôt de particules imbibées de CMTMR (rouge) au niveau des éminences ganglionnaires. Echelles, 200 µm à gauche, 50 µm à droite.
D) Grossissement d'un interneurone exprimant $GABA_{B1}$ (vert) et ayant incorporé du CMTMR (rouge). Echelle, 10 µm. [C et D, d'après (Lopez-Bendito et al., 2003)]

Expression précoce des récepteurs $GABA_B$:

Les sous-unités $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$ sont exprimées dès E11 au niveau des zones germinatives hippocampiques et corticales (Kim et al., 2003), $GABA_{B1}$ étant exprimée à des niveaux plus importants que $GABA_{B2}$ (Martin et al., 2004). Dès E14, $GABA_{B1a/b}$ est exprimée au niveau des éminences ganglionnaires et de la pré-plaque, puis de la sous-plaque et de la zone marginale à E16, et de la zone intermédiaire inférieure à E18, suggérant une expression par les interneurones en migration tangentielle (Figure 23A-C) (Lopez-Bendito et al., 2002 ; Lopez-Bendito et al., 2004). L'expression de $GABA_{B2}$ est sur le modèle de celle de $GABA_{B1a/b}$, mais plus modérée. La co-expression de $GABA_{B1a/b}$ et $GABA_{B2}$ concerne près de 95% des cellules, à l'exception des interneurones en migration tangentielle au niveau de la zone intermédiaire, qui n'expriment que $GABA_{B1a/b}$ (Lopez-Bendito et al., 2002 ; Lopez-Bendito et al., 2003).

2.2.4 Les transporteurs du GABA.

Expression précoce du transporteur vésiculaire du GABA :

L'ARNm du transporteur vésiculaire du GABA (VGAT) est détecté dès E10.5 au niveau du télencéphale ventral et son expression devient plus précisément localisée au niveau des éminences ganglionnaires dès E11.5 (Oh et al., 2005). A la naissance, VGAT est détecté au niveau de la couche I du cortex, puis le marquage devient plus intense au cours des deux premières semaines de vie postnatale, s'étendant à la majorité des couches corticales dès P10 (Minelli et al., 2003). Au niveau hippocampique, un marquage punctiforme est détecté dès E18 (Boulland et al., 2004).

Expression précoce des transporteurs membranaires du GABA :

Quatre classes de transporteurs membranaires du GABA ont été identifiées (Conti et al., 2004). GAT1 est exprimé dès E14 au niveau des éminences ganglionnaires. Une expression modérée est ensuite observée dès E16 au niveau de la zone sous-ventriculaire (Evans et al., 1996 ; Jursky and Nelson, 1996). A la naissance, GAT1 est détecté au niveau de la zone marginale corticale et de

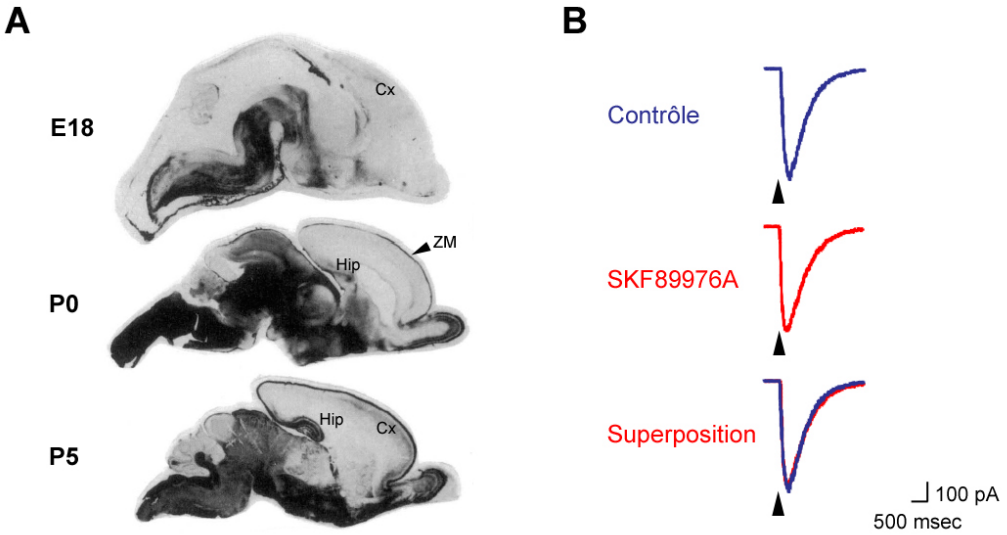


Figure 24. GAT-1 est exprimé mais n'est pas efficace aux stades périnatals.
A) Expression de GAT-1 sur coupes sagittales de cerveaux de rat (E14-P5). Le marquage est faible au niveau cortical à E18, plutôt localisé au niveau de la zone ventriculaire. Un marquage au niveau de la zone marginale et de l'hippocampe est détectable à la naissance. [D'après (Jursky and Nelson, 1996)]
B) L'application de SKF89976A, un bloqueur des transporteurs GAT-1 n'a pas d'effet sur les courants évoqués par l'application de GABA (flèche), comme montré sur la superposition des deux traces. L'expérience est réalisée en présence de TTX, de MK801 et de CNQX. [D'après (Demarque et al., 2002)]

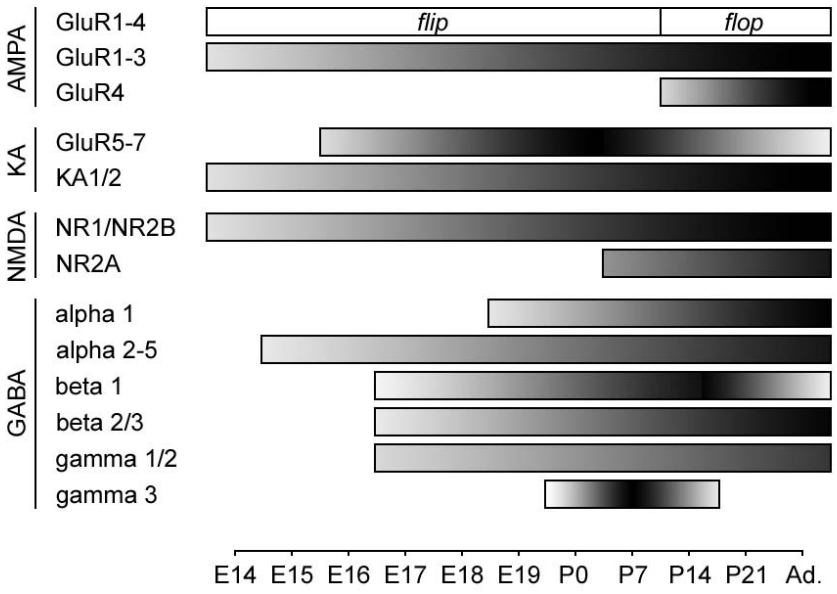


Figure 25. Expression précoce des récepteurs des neurotransmetteurs : schéma récapitulatif.
Expression précoce des principales sous-unités constitutives des récepteurs ionotropiques du glutamate et du GABA. Les gradients reflètent l'abondance des sous-unités.

l'hippocampe (Figure 24A) (Jursky and Nelson, 1996 ; Yan et al., 1997). GAT2 et GAT3 sont exprimés au niveau des méninges aux stades embryonnaires (E14-E16) (Evans et al., 1996). GAT4 est faiblement exprimé au niveau de la zone sous-ventriculaire et du bulbe olfactif à E14 et de l'hippocampe à E16, puis n'est plus détectable au niveau cortical et hippocampique jusqu'à P5 (Evans et al., 1996 ; Jursky and Nelson, 1996).

Expression de transporteurs membranaires fonctionnels :

Si le transporteur GAT-1 est exprimé aux stades périnatals, il ne semble pas efficace, puisque les courants générés par l'application pulsatile de GABA sont insensibles à l'application concomitante de SKF899756A, un bloqueur spécifique de GAT-1 (Figure 24B) (Demarque et al., 2002).

2.3 Schéma récapitulatif : expression précoce des récepteurs des neurotransmetteurs.

La Figure 25 présente un résumé des expressions précoces des principales sous-unités des récepteurs ionotropiques du glutamate et du GABA au cours du développement.

2.4 Action dépolarisante du GABA et synergie GABA / NMDA.

2.4.1 Le GABA est dépolarisant aux stades précoces du développement.

Si l'activation des récepteurs $GABA_A$ chez l'adulte est généralement associée à une inhibition synaptique, la situation est différente au cours du développement. Chez les neurones immatures, l'activation des récepteurs $GABA_A$ provoque une dépolarisation membranaire et peut conduire au déclenchement d'un potentiel d'action (Ben Ari et al., 1989 ; Owens et al., 1996 ; Chen et al., 1996 ; Owens et al., 1999 ; Gao and van den Pol, 2001). Cette action dépolarisante (ou

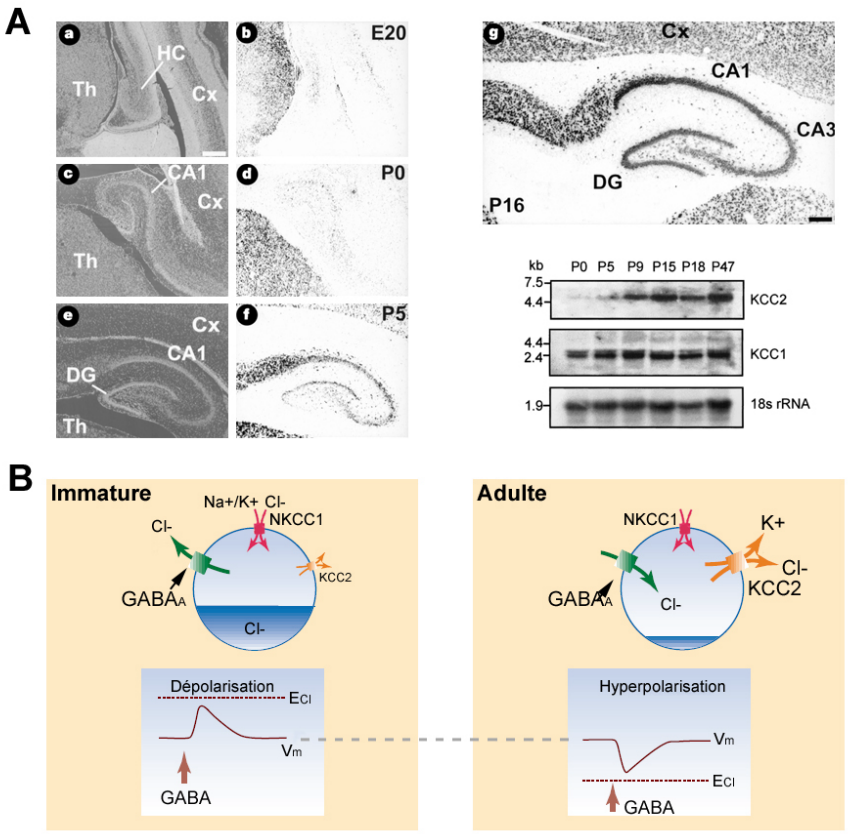


Figure 26. Action dépolarisante du GABA.
A) a-g. Distribution des ARNm de KCC2 (b, d, f, g ; champ clair en a, c, e) sur coupes sagittales de rats E20 et postnatals précoces (P0-P5) et sur Northern blot. [D'après (Rivera et al., 1999)]
B) Chez un neurone immature, les concentrations intracellulaires en ions chlorure sont plus élevées que les concentrations extracellulaires, du fait de l'immaturité de KCC2. Le potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) est plus dépolarisé que le potentiel de repos. L'activation des récepteurs $GABA_A$ provoque une sortie d'ions chlorure et amène le potentiel de repos (Vm) vers des valeurs plus dépolarisées, pouvant atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action. Chez un neurone adulte, KCC2 est fonctionnel et les concentrations intracellulaires en ions chlorure sont plus faibles que les concentrations extracellulaires. ECl est plus hyperpolarisé que le potentiel de repos. L'activation des récepteurs $GABA_A$ provoque une entrée d'ions chlorure et amène le potentiel de repos vers des valeurs plus hyperpolarisées, s'éloignant du seuil de déclenchement du potentiel d'action. [D'après (Miles, 1999)]

« excitatrice ») du GABA est due à une concentration intracellulaire élevée en ions chlorure chez les neurones immatures et à un potentiel de repos plus hyperpolarisé que le potentiel d'équilibre du chlore (ECl) chez ces neurones. En effet, aux stades précoces, les concentrations intracellulaires en ions chlorure sont plus élevées que les concentrations extracellulaires (Owens et al., 1996). Cette propriété s'explique la différence de maturité entre les systèmes d'extrusion du chlore (co-transporteur potassium-chlore KCC2) et les systèmes responsables de son accumulation (co-transporteur sodium-potassium-chlore NKCC1). Alors que NKCC1 est présent dès les stades embryonnaires, KCC2 n'est exprimé qu'aux stades périnatals et voit son niveau d'expression s'accroître au cours de la première semaine de vie postnatale (Figure 26 A) (Clayton et al., 1998 ; Rivera et al., 1999). La maturation des systèmes d'extrusion du chlore provoque une baisse progressive des concentrations intracellulaires en ions chlorure, qui deviennent plus faibles que les concentrations extracellulaires. Ainsi, la valeur du potentiel d'équilibre du chlore est différente selon le stade de maturation : aux stades précoces, ECl est plus dépolarisé que le potentiel de repos, alors qu'aux stades ultérieurs il est plus hyperpolarisé (Figure 26B). En conséquence, l'ouverture du canal du récepteur $GABA_A$ provoque un flux sortant d'ions chlorure aux stades immatures, déplaçant le potentiel de membrane vers une valeur plus dépolarisée et pouvant atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action sodique (Ben Ari et al., 1989). La dépolarisation provoquée par l'activation des récepteurs $GABA_A$ peut également activer des canaux calciques sensibles au voltage et ainsi induire une augmentation des taux de calcium intracellulaire (Figure 27A-C) (Leinekugel et al., 1995 ; Leinekugel et al., 1997). Chez l'adulte, l'ouverture du canal provoque un flux entrant d'ions chlorure, déplaçant le potentiel de membrane vers une valeur plus hyperpolarisée, et l'éloignant du seuil de déclenchement d'un potentiel d'action (Figure 26B).

2.4.2 Synergie GABA / NMDA.

Chez les neurones immatures, la dépolarisation membranaire provoquée par l'activation des récepteurs $GABA_A$ peut lever le blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA par les ions magnésium. En présence d'un bloqueur des canaux calciques dépendant du voltage, l'activation concomitante des récepteurs $GABA_A$ et NMDA provoque une augmentation des taux de calcium intracellulaire. Cette

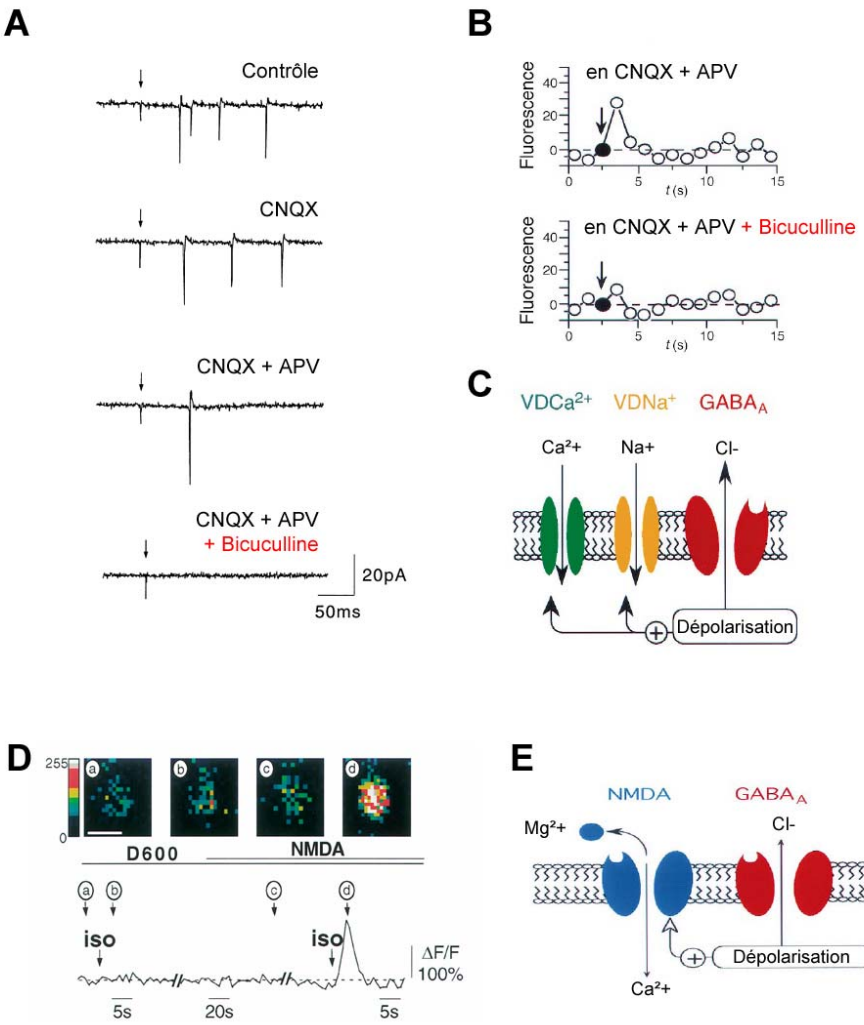


Figure 27. Action dépolarisante du GABA et synergie GABA / NMDA.
A) Réponses synaptiques enregistrées d'une cellule pyramidale de CA3 (enregistrement mode cellule attachée), obtenues après stimulation (flèche) au niveau du *stratum radiatum*. La stimulation en contrôle évoque une série de potentiels d'action, progressivement bloqués par l'application successive d'antagonistes glutamatergiques (CNQX puis APV), la composante GABAergique restante étant bloquée par la bicuculline.
B) Même expérience en présence d'indicateurs calciques, chargés dans une cellule pyramidale de CA3. La stimulation électrique provoque un influx calcique en présence de CNQX et APV. L'influx calcique n'est plus observable après ajout de bicuculline.
C) Schéma explicatif des résultats des expériences A et B : la dépolarisation induite par l'activation des récepteurs $GABA_A$ active des canaux sodiques voltage-dépendants (VDNa+ : potentiel d'action) et des canaux calciques voltage-dépendants ($VDCa^{2+}$: influx calcique).
D) En présence d'un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants (D600), l'application d'un agoniste des récepteurs $GABA_A$ (isoguvacine, iso) n'a pas d'effet sur les niveaux de calcium intracellulaire (visualisés grâce à un indicateur calcique). L'application concomitante d'isoguvacine et de NMDA provoque une augmentation des taux de calcium intracellulaire.
E) Schéma explicatif des résultats de l'expérience D : la dépolarisation induite par l'activation des récepteurs $GABA_A$ lève le blocage voltage-dépendant par le magnésium des récepteurs NMDA. L'ouverture des canaux NMDA provoque une entrée de calcium. [D'après (Ben Ari et al., 1997;Leinekugel et al., 1997)]

augmentation de calcium intracellulaire est liée à l'activation des récepteurs NMDA, dont le blocage par les ions magnésium a été levé par la dépolarisation induite par l'activation des récepteurs $GABA_A$ (Figure 27D-E) (Leinekugel et al., 1997). Ainsi, l'une des conséquences potentielles de l'activation précoce des récepteurs $GABA_A$ est la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation des voies de signalisation intracellulaire, dont de nombreux intermédiaires sont dépendants du calcium.

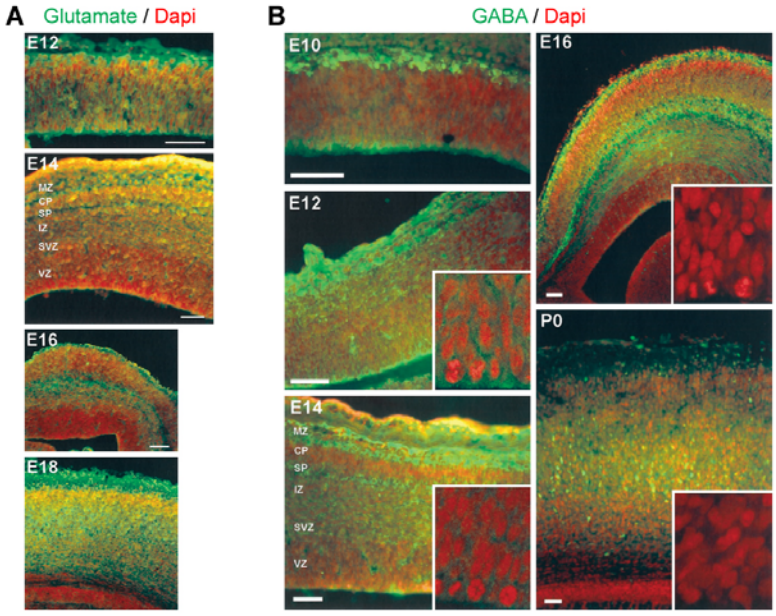


Figure 28. Distribution des neurotransmetteurs GABA et glutamate au sein du néocortex en développement.
A) Immuno-marquages anti-glutamate (vert) sur coupes coronales de néocortex embryonnaire de souris (E12-E18), contre-coloration au Dapi (rouge). Le marquage est diffus aux stades précoces et se restreint aux zones intermédiaire, marginale et à la sous-plaque dès E16. B) Immuno-marquages anti-GABA (vert) sur coupes coronales de néocortex embryonnaire de souris (E10-E16) et à la naissance, contre-coloration au Dapi (rouge). Le marquage est présent dès les stades précoces, à travers l'ensemble de la paroi corticale. Les forts grossissements présentés en inserts illustrent la diminution progressive du marquage GABA au niveau des zones de prolifération. Echelles, 50 µm. [D'après (Haydar et al., 2000)]

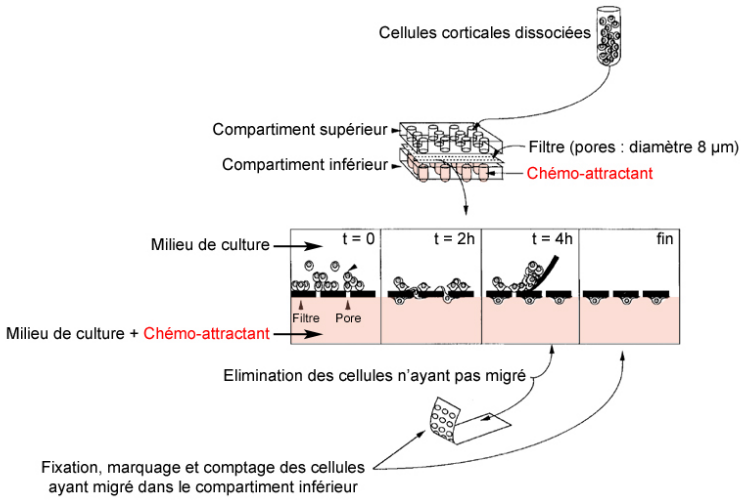


Figure 29. Description d'une chambre de Boyden.
Des cellules dissociées à partir de cortex embryonnaire sont déposées dans le compartiment supérieur de la chambre, séparé du compartiment inférieur par un filtre percé de pores (diamètre 8 µm). Les cellules sont attirées vers le compartiment inférieur contenant le chémo-attractant et migrent dans sa direction (chémotaxie), passant à travers les pores. Les cellules ayant migré sont comptées après fixation et marquage. [D'après (Behar et al., 1994)]

Chapitre 3. Modulation de la migration neuronale par les neurotransmetteurs

Les différentes sous-unités constitutives des récepteurs ionotropiques des neurotransmetteurs sont exprimées dès les stades précoces du développement embryonnaire. Des récepteurs ionotropiques fonctionnels pour le glutamate et le GABA sont exprimés par de nombreux types cellulaires du cerveau en développement : progéniteurs, neurones en migration, neurones immatures et cellules gliales (voir chapitre précédent). Le glutamate et le GABA sont détectés dans le micro-environnement neuronal très tôt au cours du développement cortical (Figure 28) (Behar et al., 1999 ; Behar et al., 2001 ; Haydar et al., 2000 ; Benitez-Diaz et al., 2003). L'action de ces neurotransmetteurs est donc possible très précocement et va influencer chacune des différentes étapes de la construction cérébrale. Dès les étapes de prolifération, le glutamate et le GABA sont capables de contrôler et de moduler le cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux du néocortex (Antonopoulos et al., 1997 ; Haydar et al., 2000 ; LoTurco et al., 1995), du striatum (Sadikot et al., 1998 ; Nguyen et al., 2003) et du cervelet (Fiszman et al., 1999). Au cours de chacune des étapes de migration, le GABA et le glutamate vont moduler la navigation des jeunes neurones. Ces actions modulatrices seront présentées au cours de ce chapitre.

3.1 Actions modulatrices du GABA au cours de la migration neuronale.

3.1.1 Modulation de la migration des neurones corticaux par le GABA.

Les actions chémotropes[4] du GABA ont été initialement mises en évidence grâce à l'utilisation de chambres de Boyden (Figure 29). Dans ce contexte expérimental, le GABA induit la motilité de neurones dissociés à partir du néocortex d'embryons de rat, exerçant une action dose-dépendante. Des concentrations femto-molaires de GABA induisent une chémotaxie (migration

[4] Induisant un mouvement cellulaire.

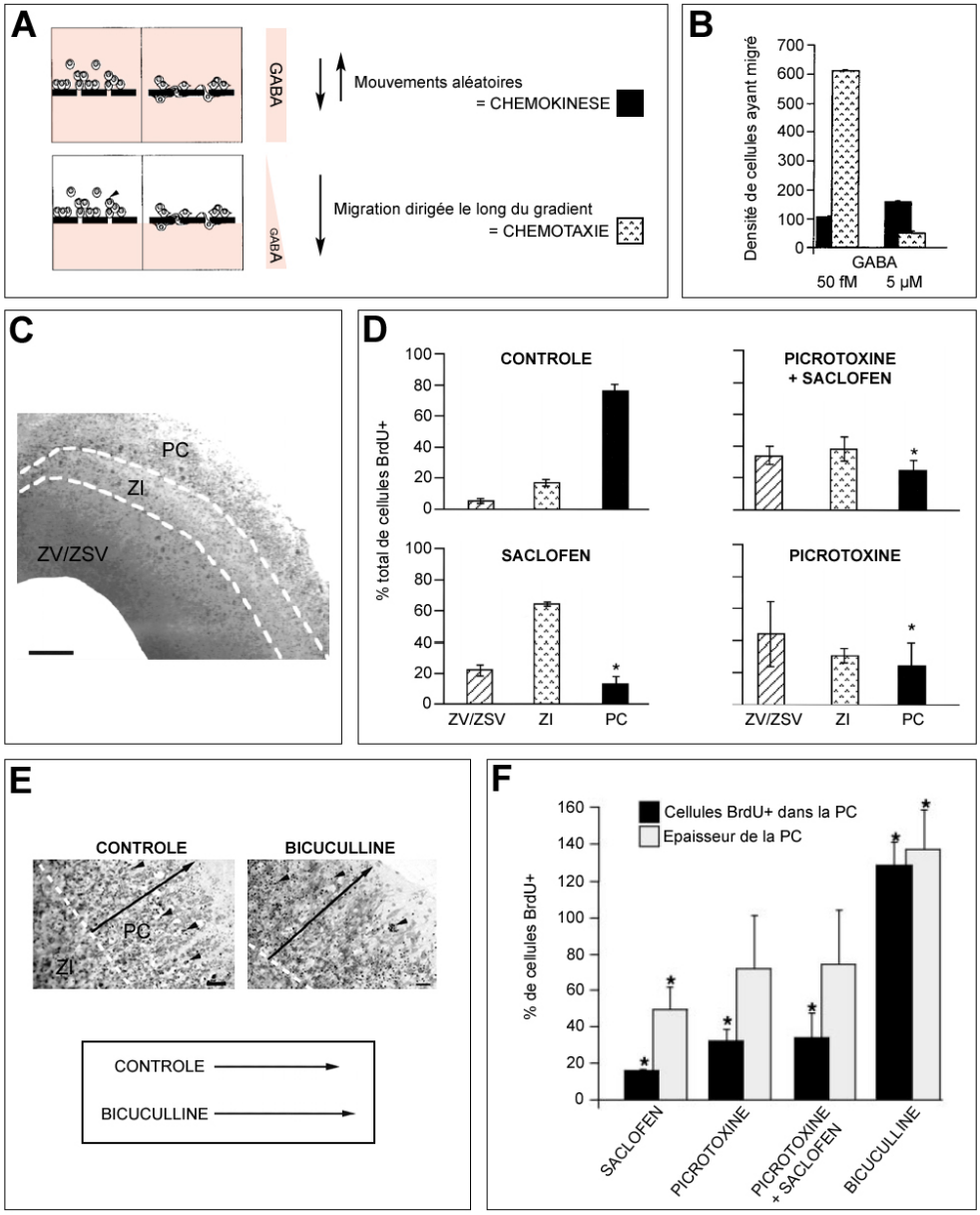


Figure 30. Actions modulatrices du GABA.

A-B) Mouvements des jeunes neurones corticaux dans une chambre Boyden. En l'absence de gradient (GABA présent dans les deux compartiments), le GABA induit des mouvements aléatoires d'un compartiment à l'autre (chémokinèse, panneau du haut en A). La présence d'un gradient de GABA induit une migration dirigée dans le sens du gradient (chémotaxie, panneau du bas en A). La motilité induite par le GABA est dose-dépendante : des concentrations femto-molaires de GABA (pointillés en B) induisent la chémotaxie, des concentrations micro-molaires induisant la chémokinèse (noir en B) [D'après (Behar et al., 1996)]

C-D) Migration de jeunes neurones marqués au BrdU sur cultures organotypiques de néocortex embryonnaire (C). Les jeunes neurones marqués au BrdU atteignent la plaque corticale en condition contrôle (D). Le traitement au saclofen empêche l'entrée au sein de la plaque corticale et provoque une accumulation de cellules dans la zone intermédiaire. Le traitement à la picrotoxine empêche la sortie des zones ventriculaire et sous-ventriculaire. Echelle, 80 µm. |D'après (Behar et al., 2000)]

E-F) L'épaisseur de la plaque corticale (flèche en E, en gris en F) et le pourcentage de cellules BrdU+ y ayant migré (en noir en F) sont augmentées après traitement à la bicuculline. [D'après (Behar et al., 2000)]

dirigée le long d'un gradient chimique), alors que des concentrations micro-molaires induisent une chémokinèse (mouvements aléatoires) (Figure 30A-B) (Behar et al., 1996). L'analyse plus fine des rôles modulateurs du GABA a été permise grâce à l'utilisation de cultures organotypiques de néocortex embryonnaire (Figure 30C). Ces préparations plus intégrées ont permis de montrer que le GABA module chacune des étapes de migration radiale des jeunes neurones corticaux. Tout d'abord, le GABA module la sortie des zones de prolifération (zones ventriculaire et sous-ventriculaire), induisant la migration des neurones nouvellement générés à destination de la zone intermédiaire. Cette action pro-migratoire serait liée à l'activation à une classe particulière de récepteurs de type $GABA_C$, sensibles à la picrotoxine (antagoniste des récepteurs de type $GABA_A$ et $GABA_C$) et couplés à l'activation de protéines G (Figure 30D) (Behar et al., 1998 ; Behar et al., 2000). Ensuite, le GABA permet l'entrée des jeunes neurones, alors en migration au niveau de la zone intermédiaire, au sein de la plaque corticale (Figure 30D) (Behar et al., 2000). Les neurones de la plaque corticale sont responsables de cette libération de GABA et l'action de celui-ci s'effectue grâce à des récepteurs $GABA_B$ portés par les neurones en migration (Behar et al., 2001). Enfin, le GABA fournit un signal d'arrêt de migration, lorsque les jeunes neurones ont atteint leur destination finale au sein de la plaque corticale (Figure 30E-F) (Behar et al., 2000). Ce signal stop est lié à l'activation de récepteurs de type $GABA_A$, faisant l'objet d'une désensibilisation rapide, portés par les neurones en migration (Behar et al., 2000 ; Heck et al., 2006). Ainsi, l'expression de différents types de récepteurs du GABA est associée à un comportement migratoire spécifique, et leur fonction permettrait une modulation fine de la migration neuronale tout au long du trajet migratoire.
Une activation excessive des récepteurs $GABA_A$ par le muscimol provoque les mêmes effets que leur antagonisme par la bicuculline, induisant la formation d'hétérotopies des couches superficielles, *in vivo* comme *in vitro* (Heck et al., 2006). Ces effets pourraient être liés à une désensibilisation des récepteurs $GABA_A$ suite à leur stimulation excessive, provoquant la perte du signal stop et conduisant à une migration excessive des jeunes neurones corticaux.

3.1.2 Modulation de la migration interneuronale par le GABA.

Le GABA module l'entrée des jeunes interneurones au sein des voies de

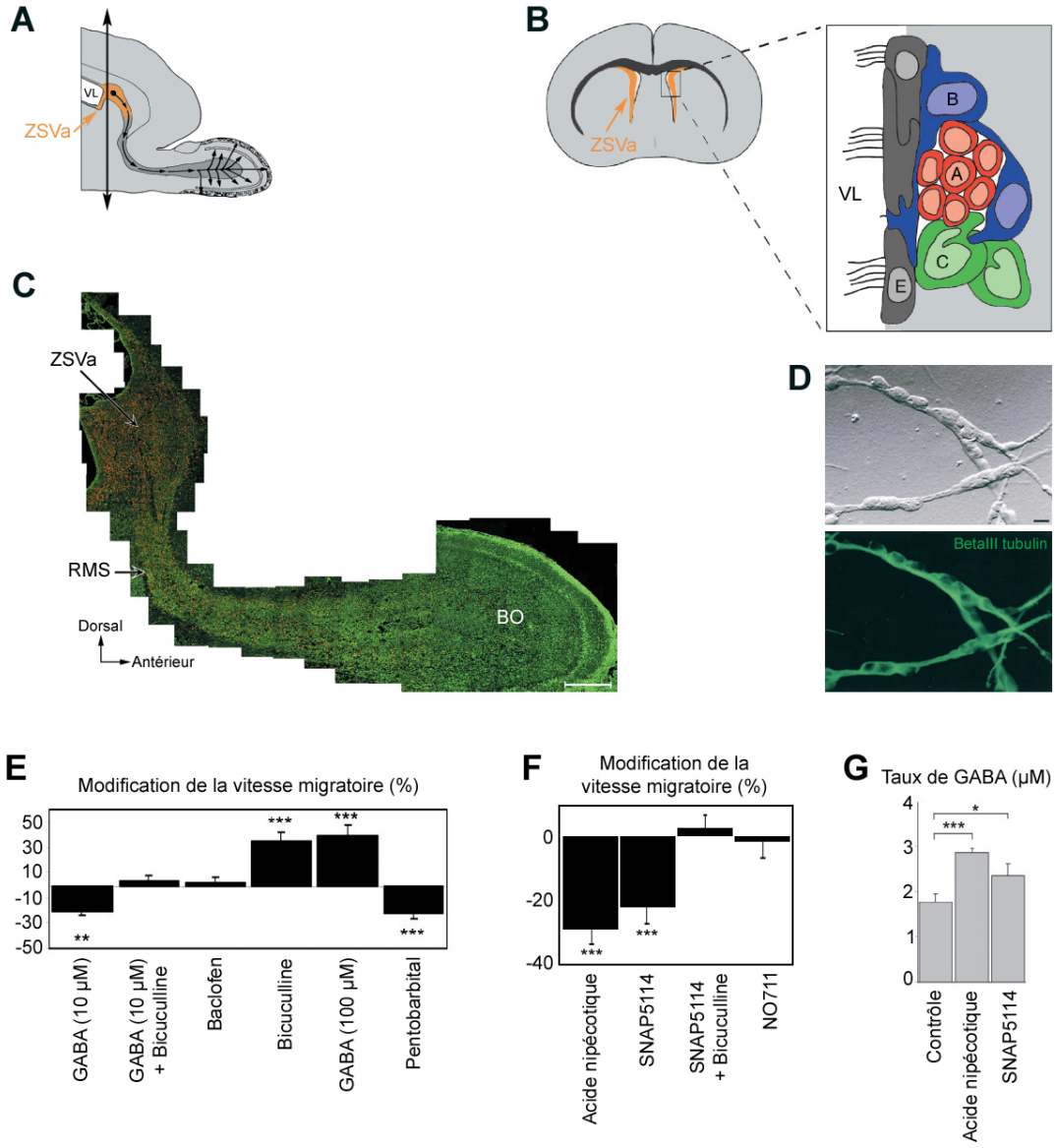


Figure 31. Modulation de la migration rostrale par le GABA.
A-D) La zone sous-ventriculaire antérieure (ZSVa, en orange en A et B) bordant la paroi antérieure du ventricule latéral (VL) est la zone de neurogenèse des neurones du bulbe olfactif (BO en C), qu'ils rejoignent en migrant tangentiellement le long du courant migratoire rostal (RMS). Les jeunes neurones olfactifs (cellules rouges en B) migrent en chaînes de neurones (visualisées en culture en D), enserrés dans un fourreau glial (cellules bleues en B). Arrivés au sein du bulbe olfactif, les jeunes neurones se détachent des chaînes pour migrer radialement (A). [A, d'après (Coskun and Luskin, 2002) ; B, d'après (Doetsch, 2003) ; C, d'après (Wichterle et al., 1997)]
E) La migration des jeunes neurones olfactifs le long du RMS est modulée par le GABA, qui réduit la vitesse migratoire en activant les récepteurs $GABA_A$ (E). L'activation excessive des récepteurs par des concentrations élevées de GABA produit les mêmes effets que leur antagonisme par la bicuculline, augmentant les vitesses de migration (E). L'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofen n'a pas d'effet sur la migration (E).
F-G) Les cellules gliales contrôlent étroitement la migration des jeunes neurones olfactifs grâce à la capture de GABA par les transporteurs. L'augmentation des taux de GABA ambiant induit par le blocage des transporteurs par l'acide nipécotique (GAT1, 3 et 4) ou SNAP5114 (GAT3 et 4), provoque une réduction des vitesses migratoires (F) et une élévation des taux de GABA (G). Le blocage de GAT1 par NO711 n'a pas d'effet. [E-G, d'après (Bolteus and Bordey, 2004)]

migration tangentielle corticale (Cuzon et al., 2005). De plus, une action modulatrice liée à l'activation de récepteurs $GABA_B$ a été mise en évidence le long des voies migratoires. Ainsi, le traitement à l'aide d'antagonistes des récepteurs de type $GABA_B$ provoque une accumulation d'interneurones au niveau des zones ventriculaire et sous-ventriculaire et un raccourcissement de leurs prolongements de guidage (Lopez-Bendito et al., 2003). Des courants évoqués par l'application de GABA ou d'isoguvacine, un agoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, sont enregistrables au niveau des neurones en migration au niveau de la zone intermédiaire (Metin et al., 2000), mais leurs rôles au cours de la migration n'ont pas été étudiés.

3.1.3 Modulation de la migration rostrale par le GABA.

La zone sous-ventriculaire bordant la paroi antérieure des ventricules latéraux est une zone germinative responsable de la genèse des neurones destinés au bulbe olfactif (Figure 31A-B). La neurogenèse au niveau de cette région débute aux stades embryonnaires et se poursuit chez l'adulte (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Les jeunes neurones destinés au bulbe olfactif migrent en sa direction au sein d'un courant migratoire rostral (rostral migratory stream ou RMS, Figure 31A-C) selon un mode de migration tangentiel particulier, qualifié de migration en chaînes (Figure 31D). Les neurones organisés en chaînes migrent enserrés dans un fourreau glial (Figure 31B) (Lois et al., 1996 ; Wichterle et al., 1997). Arrivés au sein du bulbe, les jeunes neurones changent de mode migratoire, se détachant des chaînes pour adopter un mode de migration radiaire en direction de leur couche de destination.

Les jeunes neurones en migration au sein du courant migratoire rostral expriment des récepteurs $GABA_A$ (Carleton et al., 2003 ; Wang et al., 2003), dont l'activation provoque une réduction de la vitesse de migration (Figure 31E) (Bolteus and Bordey, 2004). Cette modulation de la migration est réalisée par les cellules gliales environnantes, qui contrôlent étroitement les niveaux de GABA ambiant grâce aux transporteurs du GABA (Figure 31F-G) (Bolteus and Bordey, 2004).

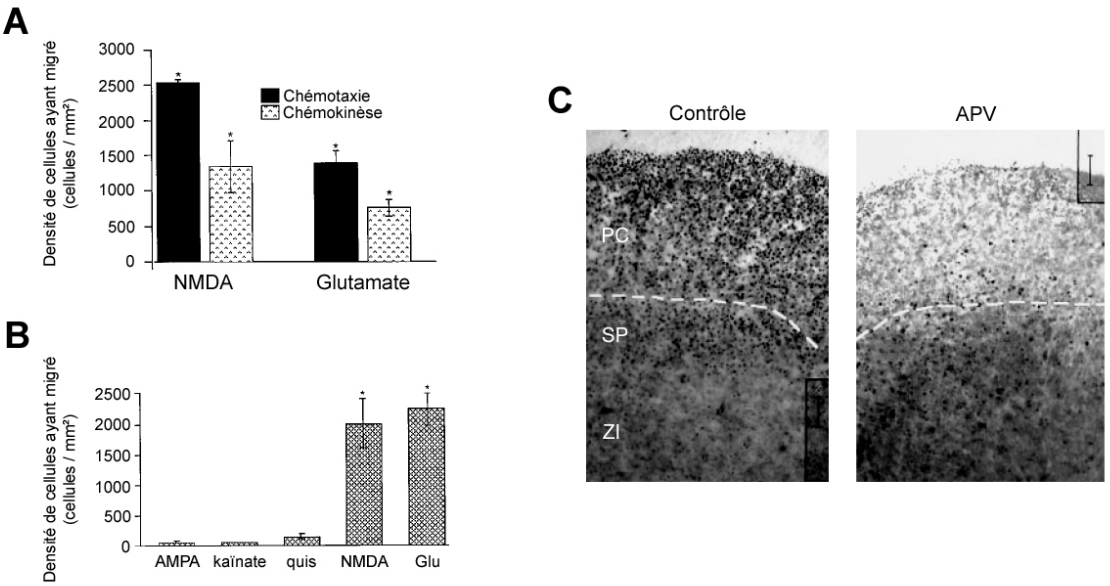


Figure 32. Actions modulatrices du glutamate.
A) Le glutamate agissant majoritairement par le biais de récepteurs NMDA induit la motilité (chémotaxie et chémokinèse) de jeunes neurones dissociés à partir du néocortex embryonnaire et placés dans une chambre de Boyden.
B) La motilité induite par le glutamate en chambre de Boyden est obtenue via activation des récepteurs NMDA, mais pas via l'activation d'autres récepteurs ionotropiques du glutamate (AMPA, kaïnate).
C) La migration de jeunes neurones marqués au BrdU sur cultures organotypiques de néocortex embryonnaire est perturbée après traitement à l'APV, un antagoniste des récepteurs de type NMDA. Les neurones BrdU+ atteignent la plaque corticale en contrôle, alors qu'ils persistent au niveau de la zone intermédiaire après traitement à l'APV. [D'après (Behar et al., 1999)]

3.2 Actions modulatrices du glutamate au cours de la migration neuronale.

3.2.1 Modulation de la migration des neurones corticaux par le glutamate.

Les actions modulatrices du glutamate, comme celles du GABA, ont été initialement mises en évidence grâce à l'utilisation de chambres de Boyden (Figure 29). Dans cette préparation, le glutamate induit la motilité de cellules corticales dissociées à partir de la zone ventriculaire du néocortex embryonnaire (Figure 32A). Les mêmes résultats sont obtenus après application de NMDA, mais pas après application d'autres agonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate (Figure 32B) (Behar et al., 1999). Ces résultats ont été confirmés sur cultures organotypiques de néocortex embryonnaire, où la migration des jeunes neurones corticaux est bloquée par le traitement à l'APV (Figure 32C) (Behar et al., 1999) et au MK801 (Hirai et al., 1999), deux antagonistes des récepteurs NMDA.

Toute altération de la signalisation liée au récepteur NMDA perturbe la migration neuronale. Ainsi, une activation excessive des récepteurs NMDA par l'ibotenate injecté *in vivo* (Marret et al., 1996) ou appliqué sur tranches (Kihara et al., 2002) provoque des défauts de migration. De plus, les défauts migratoires observés chez un modèle murin du syndrome de Zellweger sont partiellement compensés par l'application *in utero* de NMDA, réduisant le nombre de neurones ectopiques. L'analyse de ce mutant a également montré une déficience des récepteurs NMDA présents à mobiliser le calcium intracellulaire (Gressens et al., 2000).

3.2.2 Modulation de la migration interneuronale par le glutamate.

Les rôles du glutamate au cours de la migration tangentielle des interneurones sont peu connus. Les interneurones en migration au niveau de la zone intermédiaire corticale n'expriment pas de récepteurs NMDA fonctionnels, mais expriment des récepteurs AMPA (Metin et al., 2000). L'activation de ces

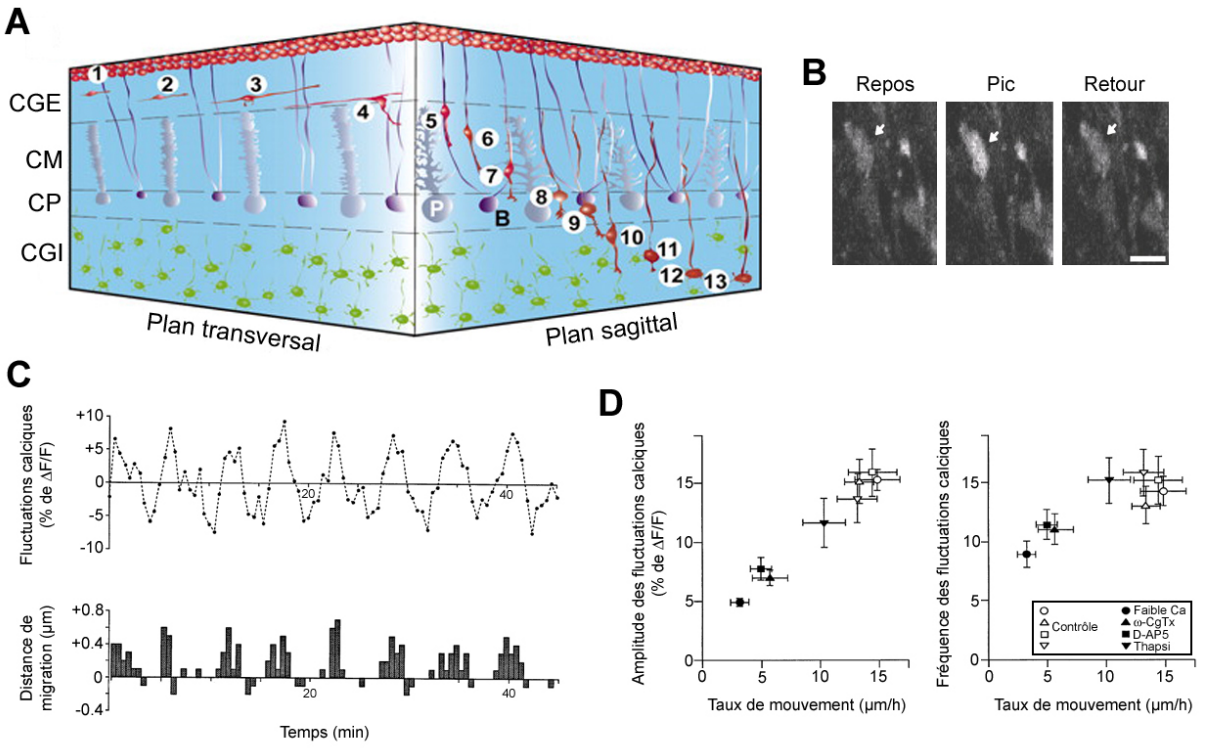


Figure 33. Modulation de la migration des cellules granulaires du cervelet.
A) Séquence de migration des futures cellules granulaires du cervelet. Ces cellules sont générées (1) au niveau de la zone germinative de la couche granulaire externe (CGE), migrent tangentiellement au sein de cette couche (2-3) avant d'atteindre la bordure de la couche moléculaire (CM). A ce niveau, elles émettent un prolongement (4) descendant le long des fibres radiaires de la glie de Bergman (marquée par B). Les futures cellules granulaires migrent alors de façon radiaire le long de ces fibres (5-7), avant d'atteindre la couche des cellules de Purkinje (CP). Elles font une pause au niveau de cette couche (8), avant de poursuivre leur migration (10-11) jusqu'à leur destination au niveau de la couche granulaire interne (CGI), où elles vont se différencier (12-13).
B) Exemple de fluctuation calcique visualisée grâce à un indicateur calcique au niveau d'une future cellule granulaire migrant au sein de la couche moléculaire, avant, après et au pic de calcium intracellulaire. [A et B, d'après (Kumada and Komuro, 2004)]
C) Chaque fluctuation calcique, visualisée grâce à un indicateur calcique (courbe du haut), est étroitement corrélée avec un pic de mouvement de la future cellule granulaire en migration (courbe du bas).
D) La manipulation des fluctuations calciques (diminution de leur amplitude et de leur fréquence) par diminution des taux de calcium ambiant (faible calcium), par blocage des canaux calciques voltage-dépendants de type N (ω-conotoxine, ω-CgTx), par blocage des récepteurs NMDA (D-AP5) ou par déplétion des stocks intracellulaires de calcium (thapsigargine, Thapsi), affecte le taux de mouvement des futures cellules granulaires du cervelet [C et D, d'après (Komuro and Rakic, 1996)]

récepteurs par leur agoniste induit une accumulation cytoplasmique de cobalt, confirmant leur perméabilité calcique (Metin et al., 2000 ; Poluch et al., 2001). Cette activation des récepteurs AMPA est associée à une rétraction du prolongement de guidage (Poluch et al., 2001). Néanmoins, l'augmentation des taux de calcium intracellulaire induite par l'application de kaïnate à proximité d'un neurone en migration au niveau de la zone intermédiaire ne semble pas être associée à un mouvement du neurone (Moya and Valdeolmillos, 2004).

3.2.3 Modulation de la migration des cellules granulaires du cervelet.

La migration des cellules granulaires du cervelet est complexe, faisant intervenir différents modes migratoires. Les futures cellules granulaires sont générées au niveau de la zone germinative de la couche granulaire externe, puis migrent tangentiellement au sein de cette couche. Arrivées à proximité de la couche moléculaire, elles émettent un prolongement descendant le long des fibres de la glie de Bergman, le long desquelles elles vont migrer selon un mode de migration radiale, jusqu'à atteindre la couche des cellules de Purkinje. Au sein de cette couche, les futures cellules granulaires marquent une pause, rétractant leurs prolongements de guidage, avant d'en émettre de nouveaux et rejoindre la couche granulaire interne où elles vont achever leur migration (Figure 33A) (Komuro et al., 2001 ; Yacubova and Komuro, 2002). Chacune des différentes étapes est caractérisée par des vagues calciques spécifiques (Figure 33B) (Kumada and Komuro, 2004 ; Komuro and Kumada, 2005). La migration des futures cellules granulaires est très sensible aux modifications des taux de calcium intracellulaire (Figure 33D), liées à l'activation des canaux calciques de type N (Komuro and Rakic, 1992) et des récepteurs NMDA (Komuro and Rakic, 1993). En particulier, chaque pic de calcium intracellulaire est corrélé avec un mouvement saltatoire des futures cellules granulaires (Figure 33C) (Komuro and Rakic, 1996), l'arrêt des fluctuations calciques étant associé à une pause migratoire ou à la fin de la migration (Kumada and Komuro, 2004).

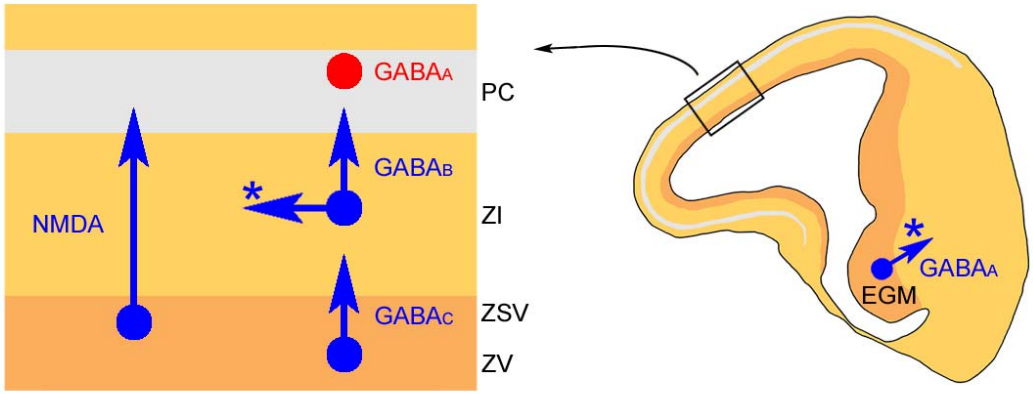


Figure 34. Modulation de la migration des jeunes neurones excitateurs et des interneurones corticaux par le GABA et le glutamate.
Neurones excitateurs. Le GABA agissant par l'intermédiaire des récepteurs $GABA_C$ et $GABA_B$ exerce une action pro-migratoire (en bleu) sur les neurones excitateurs en migration, leur permettant de quitter leurs zones de neurogenèse au niveau des zones ventriculaire et sous-ventriculaire ($GABA_C$) et d'entrer au sein de la plaque corticale ($GABA_B$). Au niveau de la plaque corticale, le GABA agissant par l'intermédiaire des récepteurs $GABA_A$ fournit un signal stop (en rouge). Le glutamate agissant par l'intermédiaire des récepteurs NMDA exerce également une action pro-migratoire sur les neurones excitateurs en migration.
Interneurones. Le GABA agissant par l'intermédiaire des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ exerce une action pro-migratoire (en bleu, astérisques) sur les interneurones en migration, leur permettant de quitter leurs zones de neurogenèse au niveau des éminences ganglionnaires médiales ($GABA_A$) et de naviguer au sein des voies migratoires ($GABA_B$). [D'après (Behar et al., 1998, 1999, 2000, 2001;Cuzon et al., 2005;Hirai et al., 1999;Lopez-Bendito et al., 2003)]

3.3 Modulation de la migration neuronale par le GABA et le glutamate, modèle général.

La Figure 34 résume les actions modulatrices du GABA et du glutamate au cours de la migration des jeunes neurones excitateurs et des interneurones corticaux.

3.4 Actions paracrines des neurotransmetteurs.

Ainsi qu'illustré dans les paragraphes précédents, le GABA et glutamate sont particulièrement impliqués dans la modulation des étapes de migration neuronale. Leurs actions modulatrices s'effectuant à un stade de développement où la proportion de synapses fonctionnelles est faible, ces neurotransmetteurs sont susceptibles d'agir en partie selon un mode de communication non synaptique ou paracrine.

3.4.1 Etat de la synaptogenèse aux stades périnatals.

A la naissance chez le rongeur, la majorité des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe est synaptiquement silencieuse, ne présentant ni courant post-synaptique spontané, ni évoqué (Tyzio et al., 1999). Ces cellules « silencieuses », représentant 80% de la proportion totale de neurones pyramidaux à ce stade, possèdent un corps cellulaire de taille réduite, un axone, mais ne possèdent que l'ébauche d'une dendrite apicale (Figure 35). Si ces cellules sont synaptiquement silencieuses, elles expriment néanmoins des récepteurs $GABA_A$, NMDA et AMPA fonctionnels (Figure 36C). Les 20% restants correspondent d'une part (10%) à des cellules « GABA », qui présentent des courants post-synaptiques portés par l'activation des récepteurs $GABA_A$ et d'autre part (10%) à des cellules « GABA + glutamate », qui présentent des courants post-synaptiques portés par l'activation des récepteurs $GABA_A$ et des récepteurs du glutamate. Les cellules « GABA » sont plus développées que les cellules « silencieuses », possédant un corps cellulaire de taille plus importante, une dendrite apicale plus longue, restreinte au *stratum radiatum*, mais pas de dendrite basilaire. Les cellules « GABA + glutamate » sont les plus développées, possédant une dendrite apicale atteignant le *stratum lacunosum moleculare* et

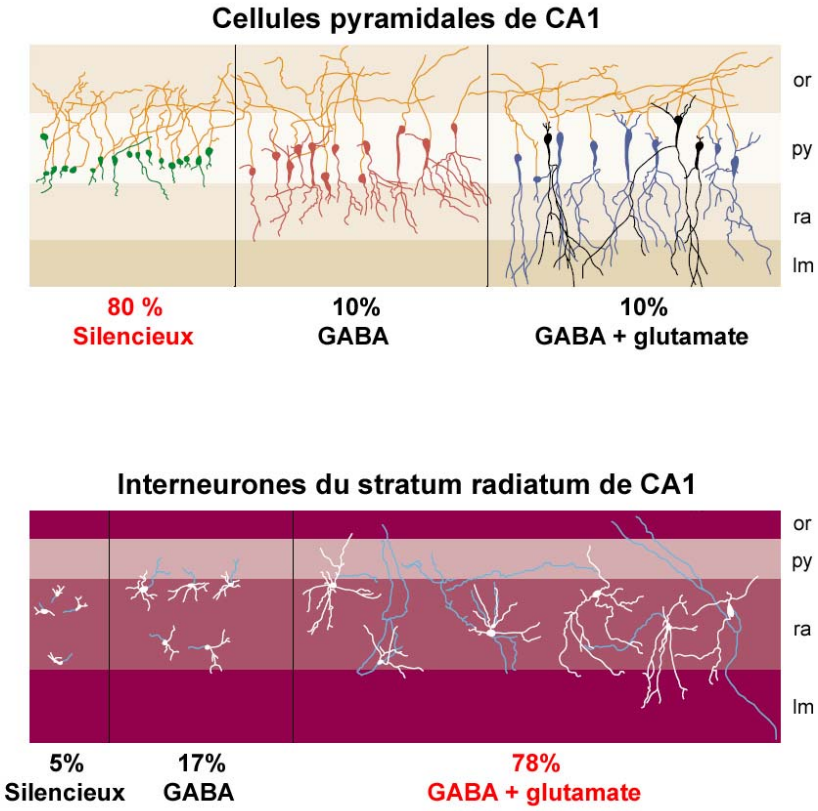


Figure 35. Formation séquentielle des synapses GABA et glutamate au niveau de la région CA1 de l'hippocampe de rongeur.
Aux stades périnatals, on distingue trois types de neurones : 1) des neurones silencieux, ne présentant pas de courant post-synaptique, 2) des neurones présentant des courants post-synaptiques portés uniquement par l'activation des récepteurs $GABA_A$ (neurones GABA), 3) des neurones présentant des courants post-synaptiques portés par l'activation des récepteurs $GABA_A$ et des récepteurs du glutamate (neurones GABA + glutamate). La proportion de ces différents types varie : les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe sont majoritairement de type silencieux, alors que les interneurones du *stratum radiatum* sont majoritairement de type GABA + glutamate [D'après (Tyzio et al., 1999;Hennou et al., 2002;Ben Ari, 2002)]

une dendrite basilaire (Figure 35). Il existe ainsi une séquence dans l'établissement des premières synapses, les synapses GABA étant formées avant les synapses glutamate.

Cette séquence est également observée pour les interneurones hippocampiques du *stratum radiatum*, mais avec des proportions opposées (Hennou et al., 2002) : à la naissance, la majorité (78%) des interneurones est de type « GABA + glutamate », 17% sont « GABA » et 5% sont « silencieux ». Aux stades embryonnaires tardifs (E18-E20), alors que la quasi-totalité des cellules pyramidales est silencieuse (90%), la majorité des interneurones (65%) possède des synapses fonctionnelles (Figure 35). L'activité à ce stade est donc portée majoritairement par les synapses GABA. Des résultats similaires ont été obtenus sur des enregistrements réalisés *in utero* chez le primate, illustrant l'universalité de ce principe (Khazipov et al., 2001).

3.4.2 Communication intercellulaire avant la formation de synapses.

Si la proportion de synapses fonctionnelles est réduite aux stades embryonnaires tardifs, du moins pour les neurones pyramidaux, les fibres afférentes sont présentes très précocement. Ainsi, des fibres GABAergiques (Rozenberg et al., 1989 ; Dupuy and Houser, 1996) et glutamatergiques (Super and Soriano, 1994 ; Super et al., 1998) sont présentes avant la naissance, représentant une source potentielle de neurotransmetteurs. De plus, les jeunes neurones en migration sont capables de libérer des neurotransmetteurs au niveau de leurs cônes de croissance (Taylor and Gordon-Weeks, 1991 ; Soeda et al., 1997 ; Gao and van den Pol, 2000). Enfin, les astrocytes sont capables de libérer du GABA et du glutamate pouvant diffuser et activer les neurones (Liu et al., 2000 ; Parri et al., 2001). En conséquence, avant la formation de synapses, des neurotransmetteurs sont libérés, peuvent diffuser et agir au niveau des récepteurs présents sur les neurones en cours de maturation (voir chapitre précédent).

Cette libération de neurotransmetteurs, qui possède des caractéristiques particulières, permet une communication précoce entre neurones, portée majoritairement par l'activation de récepteurs $GABA_A$ (Demarque et al., 2002).

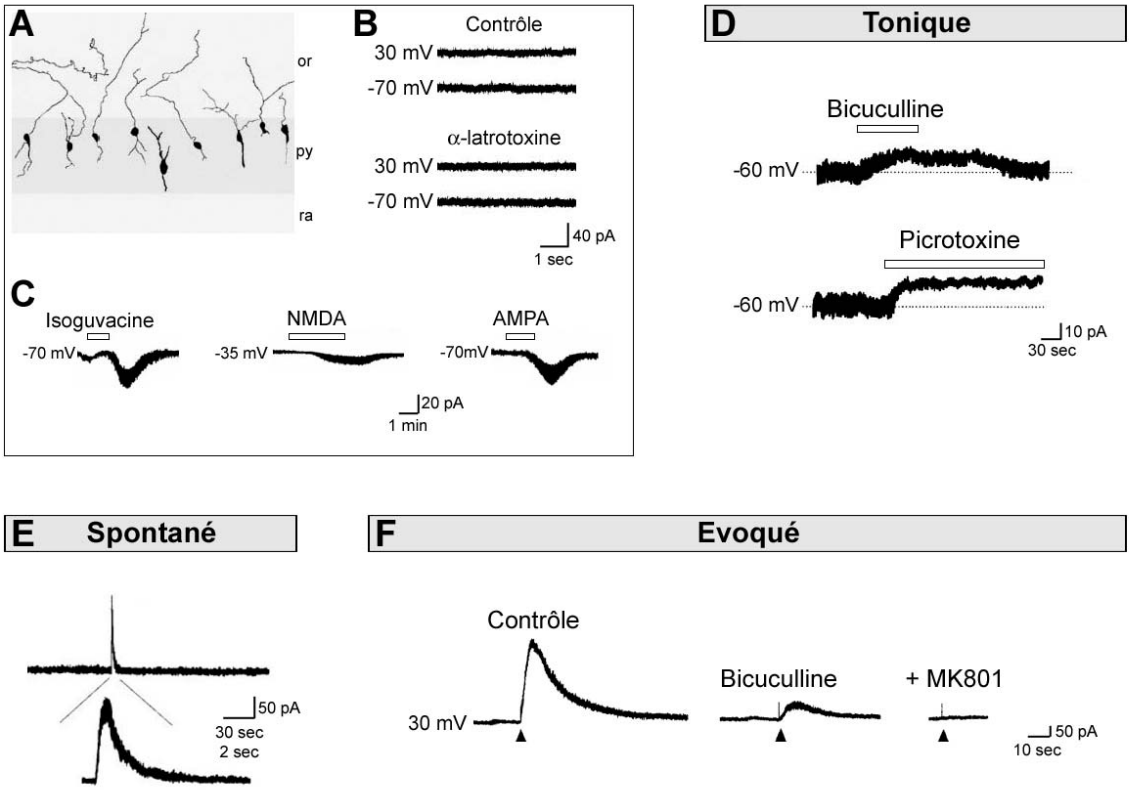


Figure 36. Communication paracrine avant la formation des synapses.
Les cellules pyramidales de la région CA1 (reconstruites en A) sont synaptiquement silencieuses aux stades périnatals, comme révélé par application d'α-latrotoxine, qui stimule la libération des neurotransmetteurs (B). Elles expriment des récepteurs $GABA_A$, NMDA et AMPA, comme révélé par l'application d'isoguvacine, de NMDA et d'AMPA, respectivement agonistes des récepteurs $GABA_A$, NMDA et AMPA (C). Les cellules pyramidales silencieuses sont activées par les transmetteurs selon deux modes : elles présentent des courants toniques portés par l'activation de récepteurs $GABA_A$, démasqués par l'application d'antagonistes spécifiques des récepteurs $GABA_A$ (bicuculline et picrotoxine, D). Elles présentent des courants de cinétique lente, spontanément (E) ou après stimulation du *stratum radiatum* (F), portés par l'activation de récepteurs $GABA_A$ et, à moindre mesure, de récepteurs NMDA, comme démasqué par l'application successive de bicuculline et de MK801 (antagoniste des récepteurs NMDA). [A-B, D-F d'après (Demarque et al., 2002) ; C, d'après (Tyzio et al., 1999)]

Cette communication, qualifiée de communication paracrine[5], implique principalement une libération de GABA et, à moindre mesure, de glutamate, libérés selon un mode indépendant du calcium et de la machinerie SNARE[6]. Ainsi, les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, qui sont synaptiquement silencieux aux stades périnatals (Figure 36A, 36B), sont activés par les transmetteurs selon deux modes : 1) une activation tonique portée par l'activation des récepteurs $GABA_A$ (Figure 36D) et 2) des courants de cinétique lente, spontanément (Figure 36E) ou après stimulation du *stratum radiatum*, portés par l'activation de récepteurs $GABA_A$ et, à moindre mesure, de récepteurs NMDA (Figure 36F) (Demarque et al., 2002). La diffusion du GABA libéré est facilitée par la présence d'un espace extracellulaire large et peu cohésif, lié à l'immaturité du cerveau en développement, mais également à une mauvaise efficacité des mécanismes de capture. En effet, si les transporteurs du glutamate sont efficaces aux stades périnatals, les transporteurs du GABA ne le sont pas (voir plus haut et Figure 24), facilitant ainsi les actions du GABA, le messager paracrine majeur à ces stades.

[5] Egalement qualifiée de transmission non synaptique par certains auteurs (Owens and Kriegstein, 2002).
[6] Complexe protéique responsable de l'exocytose synaptique des neurotransmetteurs (Rizo and Sudhof, 2002).

Chapitre 4. Perturbation de la construction cérébrale par des facteurs environnementaux : l'éthanol et de la cocaïne.

Compte tenu des rôles cruciaux joués par les neurotransmetteurs au cours de la construction du cerveau fœtal, tout composé pharmacologique interférant avec leurs actions représente un risque tératogène potentiel. De nombreuses études ont montré que l'exposition anténatale à de nombreux facteurs environnementaux peut être extrêmement délétère pour le cerveau fœtal [revue dans (Gressens et al., 2001)]. Ces facteurs viennent interférer avec la construction cérébrale, agissant au niveau de cibles variées, dont les systèmes de neurotransmission. Ce chapitre présente l'exemple de l'alcool (éthanol) et de la cocaïne, dont la consommation par la femme enceinte provoque des séquelles neurologiques majeures chez le nouveau-né.

4.1 Ethanol.

4.1.1 Syndrome d'alcoolisation fœtale.

L'exposition à l'éthanol au cours de la grossesse conduit au syndrome d'alcoolisation fœtale (Jones and Smith, 1973), caractérisé par une dysmorphie faciale, un retard de croissance et une microcéphalie, ainsi que des lésions cérébrales associées à des déficits cognitifs et à un retard mental. Les lésions cérébrales les plus caractéristiques sont des défauts d'organisation des couches corticales, la présence de neurones ectopiques et une réduction de l'épaisseur de la paroi corticale.

La présence de telles anomalies du cerveau fœtal est observée chez 100% des mères ayant eu une forte consommation d'éthanol pendant la grossesse (100 – 500 mL par jour, 4 – 7 fois par semaine), chez 80 – 90% des mères ayant eu une consommation modérée (100 – 200 mL par jour, 1 – 4 fois par semaine) et chez 30% des mères ayant eu une consommation occasionnelle d'éthanol (35 – 100 mL, 3 fois pendant la grossesse) (Konovalov et al., 1997).

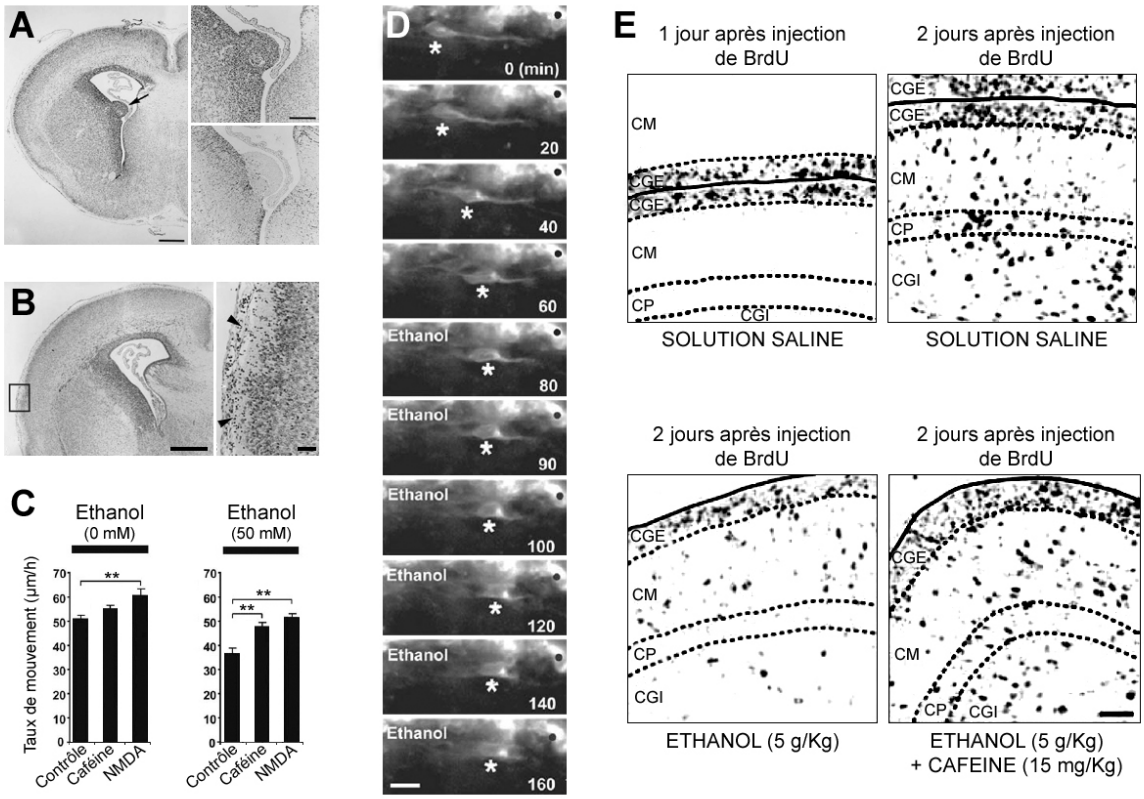


Figure 37. L'exposition fœtale à l'éthanol provoque des défauts migratoires.
A-B) L'administration d'éthanol chez la rate au cours de la gestation provoque la survenue d'hétérotopies périventriculaires (A) ou lepto-méningées (B) chez le rat adulte. Echelles, 500 µm et 200 µm en A ; 500 µm et 50 µm en B. [D'après (Komatsu et al., 2001;Sakata-Haga et al., 2002)]
C-D) La migration des cellules granulaires du cervelet, visualisée en vidéomicroscopie, est perturbée par l'administration d'éthanol in vitro (D). L'augmentation des taux de calcium intracellulaire par l'application concomitante de caféine ou de NMDA restaure la migration (C). Echelle, 12 µm.
E) L'exposition de ratons de 10 jours à l'éthanol provoque une altération des cellules granulaires marquées au BrdU, qui peut être restaurée par l'application concomitante de caféine. [C-E, d'après (Kumada et al., 2006)]

4.1.2 Mécanismes impliqués.

Les effets délétères de l'éthanol au cours de la construction cérébrale fœtale sont liés à son action sur les récepteurs NMDA et $GABA_A$. En effet, l'éthanol joue le rôle d'agoniste des récepteurs $GABA_A$ (Wafford et al., 1991 ; Harris et al., 1995) et d'antagoniste des récepteurs NMDA (Lovinger et al., 1989 ; Hoffman et al., 1989).

L'administration d'éthanol chez des ratons de 7 jours provoque une mort neuronale importante au niveau du néocortex, provoquée par la combinaison de 2 mécanismes : une activation excessive des récepteurs $GABA_A$ et une inhibition des récepteurs NMDA. En effet, l'administration de phénobarbital, qui potentialise l'activation des récepteurs $GABA_A$, comme l'administration de MK801, un antagoniste des récepteurs NMDA, provoquent chez des ratons de même âge une mort neuronale d'étendue moins importante, la combinaison des 2 correspondant à l'étendue des lésions provoquées par l'éthanol (Ikonomidou et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris (Olney et al., 2002).

La consommation d'éthanol par des rates gestantes provoque de nombreux types de malformations corticales chez les embryons, suggérant de défauts de migration (Figure 37A-B) (Komatsu et al., 2001 ; Sakata-Haga et al., 2002). L'observation de défauts migratoires associées à l'administration d'éthanol a également été rapportée par Miller (Miller, 1986 ; Miller, 1993).

La migration des cellules granulaires du cervelet est perturbée par l'éthanol *in vitro* (Figure 37C), réduisant les fluctuations calciques associées à la migration (voir chapitre précédent). Ces fluctuations calciques peuvent être rétablies par application concomitante de NMDA (dont l'activation des récepteurs induit une entrée de calcium) ou de caféine (qui augmente les taux de calcium intracellulaire par mobilisation des stocks calciques) (Figure 37D). Les altérations de la migration des cellules granulaires induites par l'administration intra-péritonéale d'éthanol chez un raton de 10 jours peuvent également être corrigés par l'administration concomitante de caféine (Figure 37E) (Kumada et al., 2006).

Enfin, l'éthanol perturbe la neurogenèse et la gliogenèse corticale (Miller, 1986 ; Gressens et al., 1992b ; Miller and Robertson, 1993).

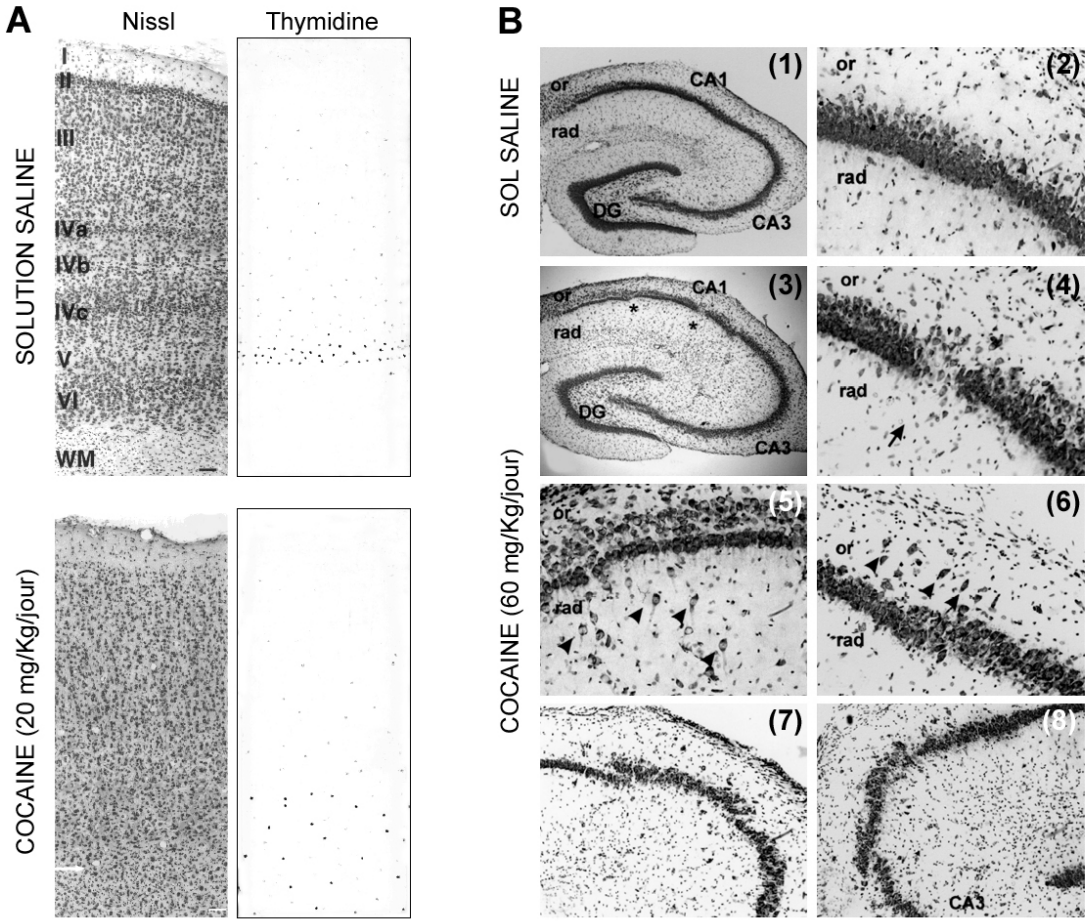


Figure 38. L'exposition fœtale à la cocaïne provoque des défauts migratoires.
A) L'administration de cocaïne chez la femelle singe rhésus lors de la gestation provoque une altération de l'organisation des couches corticales, visualisée grâce à la coloration de Nissl, caractérisée notamment par des dispersions cellulaires. Ainsi, les cellules marquées à la thymidine tritiée, organisées en couche compacte chez les animaux contrôle (couche V), sont dispersées chez les animaux ayant été exposés à la cocaïne lors de la gestation. Echelles, 400 µm. [D'après (Lidow and Song, 2001)]
B) L'administration de cocaïne chez la rate lors de la gestation provoque des interruptions de la couche pyramidale de CA1 (3-4), des ectopies neuronales (5-6) et des anomalies de compaction de la couche (7-8) chez le rat adulte. [D'après (Baraban et al., 1999)]

4.2 Cocaïne.

4.2.1 Exposition fœtale à la cocaïne.

La prise de cocaïne pendant la grossesse provoque de sévères malformations cérébrales fœtales. La microcéphalie est la malformation cérébrale la plus fréquemment rencontrée (pouvant atteindre jusqu'à 16% des cas dans certaines études). Des défauts d'organisation des couches corticales et des hétérotopies sont également rencontrés, ainsi que des agénésies du corps calleux. Enfin, la survenue d'hémorragies cérébrales fœtales et d'épisodes ischémiques a été rapportée. Ces anomalies du développement cérébral sont associées à des déficits cognitifs et comportementaux, comme des déficits attentionnels.

4.2.2 Mécanismes impliqués.

Les effets délétères de la cocaïne au cours de la construction cérébrale fœtale sont liés à la perturbation de la neurogenèse et de la migration neuronale. L'administration de cocaïne chez des femelles singe rhésus au cours de la gestation provoque une baisse importante de la densité de cellules marquées à la thymidine tritiée (Lidow and Song, 2001a), associée à une réduction importante de la densité neuronale et du volume du néocortex (Lidow and Song, 2001b). Ces réductions sont associées à des perturbations importantes de l'organisation des couches corticales (Figure 38A) (Lidow et al., 2001).

Des déficits similaires sont observés chez la souris, chez lesquelles l'administration de cocaïne pendant la gestation provoque également une perturbation de l'organisation en couches corticales (Gressens et al., 1992a ; Kosofsky et al., 1994 ; Nassogne et al., 1998) et de la maturation neuronale et gliale (Gressens et al., 1992a ; Nassogne et al., 1998 ; Morrow et al., 2003). Chez le rat, l'administration de cocaïne pendant la gestation provoque la survenue de dysplasies hippocampiques, caractérisées par des interruptions de la couche pyramidale de la région CA1 et la présence de neurones ectopiques (Figure 38B) (Baraban et al., 1999).

Enfin, l'administration de cocaïne pendant la gestation chez la souris provoque une réduction de la migration des interneurones corticaux, *in vitro* comme *in*

vivo, conduisant à une réduction de leur densité au niveau du néocortex (Crandall et al., 2004).

4.3 Autres facteurs tératogènes potentiels.

Des agonistes des récepteurs $GABA_A$ sont fréquemment utilisés comme sédatifs, tranquillisants, anesthésiques ou anti-épileptiques. Ces substances, d'usage courant en pédiatrie et en médecine obstétrique, pourraient exercer des effets délétères sur la construction cérébrale fœtale, perturbant l'organisation des couches corticales ou conduire à la formation d'hétérotopies. Leurs effets n'ont été que peu étudiés.

Résultats

Article 1

A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates Neuronal Migration

Jean-Bernard Manent, Michaël Demarque, Isabel Jorquera, Christophe Pellegrino, Yehezkel Ben-Ari, Laurent Aniksztejn, and Alfonso Represa

Article 1, problématique.

Les neurotransmetteurs GABA et glutamate jouent un rôle modulateur crucial lors de la construction cérébrale fœtale, modulant chacune de ses étapes. Une vaste littérature est consacrée à l'étude de leurs effets stimulateurs ou inhibiteurs, variables selon les types cellulaires considérés et envisagés grâce à différents modèles expérimentaux (voir chapitre 3). Néanmoins, l'absence de sécrétion vésiculaire des neurotransmetteurs chez différentes lignées de souris transgéniques ne provoque aucun déficit d'organisation en couches corticales [munc 18-1 ; (Verhage et al., 2000)], ni de formation de synapses [munc 13; (Varoqueaux et al., 2002)], les raisons de cette absence de phénotype demeurant obscures. Un élément de réponse essentiel provient de l'étude réalisée par Demarque et collaborateurs (Demarque et al., 2002), démontrant l'existence d'une communication précoce par les neurotransmetteurs, possédant des caractéristiques particulières (voir chapitre 3). En effet, cette communication paracrine est sous-tendue d'une part, par l'existence de mécanismes non vésiculaires de libération des neurotransmetteurs et, d'autre part, par une inefficacité des systèmes de capture du GABA. La première propriété de cette communication permettrait d'expliquer l'absence de phénotype neurodéveloppemental chez les mutants de la sécrétion vésiculaire, puisqu'une libération non vésiculaire de neurotransmetteurs pourrait moduler la construction cérébrale fœtale. Nous avons étudié cette hypothèse grâce à la mise au point et l'utilisation de modèles de migration neuronale *in vitro*.

Grâce à des co-cultures organotypiques d'explants d'hippocampe embryonnaire préparés à partir de souris GFP et sauvages, nous avons pu visualiser des jeunes neurones pyramidaux en migration et réaliser leur caractérisation électrophysiologique. Ces neurones expriment des récepteurs $GABA_A$ et NMDA, dont l'activation est indispensable à leur migration à destination de la couche pyramidale, ainsi que révélé après traitement à l'aide d'antagonistes de ces récepteurs. L'origine du GABA et du glutamate impliqué dans la modulation de la migration de ces neurones est non vésiculaire puisque la migration se produit chez le mutant de la sécrétion vésiculaire munc18-1 et que les effets des antagonistes persistent chez ce mutant.

Development/Plasticity/Repair

A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates Neuronal Migration

Jean-Bernard Manent, Michaël Demarque, Isabel Jorquera, Christophe Pellegrino, Yehezkel Ben-Ari, Laurent Aniksztejn, and Alfonso Represa

Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U29, Campus de Luminy BP13, 13273 Marseille, France

Immature neurons express GABA and glutamate receptors before synapse formation, and both transmitters are released at an early developmental stage. We have now tested the hypothesis that the ongoing release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. Using 5-bromo-2′-deoxyuridine labeling and cocultures of hippocampal slices obtained from naive and green fluorescent protein-transgenic mice, we report that migration is severely affected by $GABA_A$ or NMDA receptor antagonist treatments. These effects were also present in munc18-1 knock-out slices in which soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)-dependent vesicular secretion of transmitters has been deleted. $GABA_A$ antagonists were more efficient than NMDA antagonists to reduce cell migration, in keeping with the earlier maturation of GABAergic mechanisms. We conclude that GABA and, to a lesser degree, glutamate released in a SNARE-independent mechanism exert a paracrine action on neuronal migration.

Key words: **neuron; migration; neurotransmitter; GABA; glutamate; hippocampus**

Introduction

Neuronal migration is one of the critical steps of the CNS construction. Once generated in the germinal layers where they become postmitotic, immature neurons (or neuroblasts) start to migrate to reach their target fields. In the cerebral cortex, this process is well documented, with the presence of two modes of migration: (1) a radial, glial-guided mode of migration for the principal cells, identified by the early pioneering studies conducted by Rakic and colleagues (Rakic, 1971, 1972; Rakic et al., 1974), and (2) a tangential mode of migration for the interneurons, proposed by O'Rourke et al. (1992) and confirmed by Anderson et al. (1997) [for a review on both modes of migration, see Nadarajah and Parnavelas (2002)]. In the hippocampus, the process has been less investigated, but the same modes of migration likely proceed. The early birthdating studies from Bayer (1980) identified the timing of genesis of the pyramidal cells of the CA1 region between embryonic day 16 (E16) and E18 in rats [birthdates corrected according to Paxinos et al. (1991), the morning after mating being considered as E0]. Once generated, these cells start their migration toward the stratum pyramidale between E17 and E19–E20. In mice, this process occurs slightly earlier, with cells being generated between E14 and E16 (Stanfield and Cowan, 1979) and migrating afterward.

Received Sept. 7, 2004; revised March 25, 2005; accepted March 30, 2005.

This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (J.-B.M. and M.D.), the Fondation de la Recherche Médicale (M.D.), and the Fondation Cino and Simone Del Duca. We are grateful to Drs. M. Okabe and T. C. Südhof for the gift of GFP and munc18-1 mutant mice. We also thank Sophie Menet for technical assistance in the early immunohistochemical analysis of the mutant mice.

Correspondence should be addressed to Dr. Alfonso Represa, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U29, Campus de Luminy BP13, 13273 Marseille, France. E-mail: represa@inmed.univ-mrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0553-05.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/254755-11$15.00/0

As they migrate throughout the cerebral tissue, immature neurons are influenced by several factors that modulate their journey. Among these factors, transmitters have been shown to play an important role. Indeed, several studies that focused on various brain structures (cerebellar cortex, cerebral cortex, olfactory epithelium, basal forebrain) and neuronal subtypes (granule cells, cortical neuroblasts, tangentially migrating interneurons, luteinizing hormone-releasing hormone neuroblasts, gonadotropin-releasing hormone neuroblasts) have been performed using different protocols (dissociated cells in microchemotaxis chambers, slice preparation). These studies have led to the conclusion that transmitters, GABA and glutamate, acting on several receptor subtypes ($GABA_A$, $GABA_B$, $GABA_C$, NMDA, AMPA) have a crucial modulatory effect on migrating neuroblasts, acting as motility-promoting signals (Behar et al., 1998, 1999, 2000, 2001; Hirai et al., 1999; Simonian and Herbison, 2001; Lopez-Bendito et al., 2003), acceleratory signals (Komuro and Rakic, 1993), or stop signals (Behar et al., 1998, 2000; Fueshko et al., 1998; Bless et al., 2000; Simonian and Herbison, 2001; Kihara et al., 2002). However, in contrast to these observations, there is no deficit in cortical layering and synapse formation in mice in which vesicular release has been deleted: munc18-1 mutant mice (Verhage et al., 2000) or munc13-1/2 double knock-out (KO) mice (Varoqueaux et al., 2002). The reasons for this contradiction have not been elucidated.

In a recent study, we showed that in the prenatal (E18–E20) and postnatal [postnatal day 0 (P0) to P3] hippocampus of rats and mice (Demarque et al., 2002), there is a calcium- and soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)-independent release of GABA and glutamate. These transmitters generated large slow currents in maturing neurons, including neurons that have no functional synapses. This paracrine mode of communication, which is mediated by the activa-

tion of $GABA_A$ and NMDA receptors, is restricted to an early developmental stage. Interestingly, this release is present in munc18-1 mutant mice (Demarque et al., 2002), suggesting that a SNARE-independent release of GABA and glutamate may contribute to the construction of brain structures.

To investigate this issue, we designed a hippocampal organotypic slice coculture assay in which fluorescent migrating pyramidal neurons can be observed easily. Using this technique, patch-clamp recordings of migrating cells indicated that these cells expressed functional $GABA_A$ and sometimes NMDA receptors. Applications of antagonists of $GABA_A$ (bicuculline) or NMDA [(5*S*,10*R*)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801)] receptors led to a strong impairment of neuronal migration, including in slices of munc18-1-deficient mice. Our results suggest that a paracrine, SNARE-independent release of GABA and glutamate may modulate neuronal migration.

Materials and Methods

Animals. Experiments were performed on E17–E18 rats and E16–E17 mice embryos. Wistar rats were obtained from Janvier (Janvier, France). We also used Swiss mice (Janvier), green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice (a gift from Dr. M. Okabe, Osaka University, Osaka, Japan) (Okabe et al., 1997), or munc18-1 mutant mice (a gift from Dr. T. C. Südhof, University of Texas, Dallas, TX) (Verhage et al., 2000) deficient for the brain-specific isoform of the mammalian homolog of UNC18, also called nSec1 or RbSec1 [for a review on SNAREs and Munc18, see Hata et al. (1993) and Rizo and Sudhof (2002)]. The GFP embryos were selected from the wild-type nonfluorescent littermates under UV light. The munc18-1-deficient embryos were selected from normal or heterozygous littermates because they have a smaller size and exhibit a peculiar tucked posture and edematous appearance. Furthermore, they are paralyzed and display neither spontaneous nor reflex movement after mechanical stimulation. The absence of the Munc18-1 protein in selected embryos was confirmed *post hoc* as described previously (Demarque et al., 2002). All experimental procedures were performed in agreement with the European Union and French legislation concerning the care and use of animals.

Pharmacological agents and antibodies. The pharmacological agents used in culture and for electrophysiology were as follows: NMDA, isoguvacine, D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-APV), MK801, and bicuculline (all obtained from Tocris, Bristol, UK); and GABA and glutamate (both obtained from Sigma, St. Louis, MO).

The primary antibodies were as follows: rat anti-5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU; 1:50; Harlan Sera-Lab, Loughbourough, UK), mouse monoclonal anti-GFP (1:2000; Molecular Probes, Eugene, OR), anti-βIII-tubulin (1:500; Sigma), anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2; 1:500; Sigma), anti-$GABA_A$ β chain (1:200; Chemicon, Temecula, CA), rabbit polyclonal anti-GFP (1:3000; Molecular Probes), anti-NMDA receptor subunit NR1 (anti-NR1) (1:200; Chemicon), anti-AMPA/KA receptor subunits 2/3 (GluR2/3; 1:200; Chemicon), anti-GFAP (1:200; Sigma), and anti-GABA (1:500; Sigma).

The secondary antibodies were as follows: donkey anti-rat conjugated with FITC (1:200), donkey anti-mouse conjugated with FITC (1:200), goat anti-mouse conjugated with Texas Red (1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), goat anti-rabbit conjugated with Cy3 (1:200; Molecular Probes), and goat anti-rabbit conjugated with Alexa 488 (1:200; Molecular Probes).

Hippocampal organotypic slice culture. Pregnant animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (7%; Sigma) or killed by cerebral dislocation. Briefly, embryos were removed by cesarean section, and their brains were placed into Petri dishes containing cold PBS supplemented with glucose (30%; Sigma) and penicillin–streptomycin (50 mg/ml; both from Invitrogen, San Diego, CA). The brains were cut into 350–400 μm coronal slices using a tissue chopper (McIlwain; Campden Instruments, Leicester, UK), and slices were collected into 35 mm Petri dishes containing culture medium (MEM, 10% horse serum, and 25 μg/ml insulin). Meninges were removed gently, and hippocampal slices were prepared under a dissecting microscope, with the help of micro-tweezers and a spatula. Hippocampal slices were cultivated onto the membrane of Millicell-CM inserts (Millipore, Bedford, MA) in a 6-well plate containing 1 ml of culture medium per well, according to the protocol developed by Stoppini et al. (1991), adapted to embryonic tissues. Three to four hippocampal slices per inserts were arranged flat onto the membrane, and the excess of culture medium was removed. The 6-well plates were kept for 1 d *in vitro* (DIV) at 37°C with 5% CO_2 and 95% air. During the first 2 h of the incubation period, BrdU (50 μg/ml; Sigma) was added to the culture medium. After replacing the BrdU-containing medium with fresh medium without BrdU, pharmacological agents were added (see above).

Hippocampal organotypic slice coculture assay. Time pregnant E16–E17 GFP mice were killed by cerebral dislocation, the embryos were removed, and hippocampal slices were prepared as described above. The slices were plated onto the membrane of a Millicell-CM insert in 1 drop of medium, allowing their gentle manipulations with the help of a thin spatula. Two hippocampal slices, prepared from wild-type or GFP embryos of the same littermates (or from age-related munc18-1-deficient embryos), were arranged flat, in very tight apposition at the level of the neuroepithelium of the CA1 region (see Fig. 1*A* for a schematic view of the coculture assay). The medium in excess was then removed, and the 6-well plates were kept for 1 DIV at 37°C with 5% CO_2 and 95% air, in the presence or in the absence of pharmacological agents.

The permissiveness of the host environment for migration was assessed using various experimental conditions [i.e., homotypic (mice vs mice, from the same littermates when possible) or heterotypic (mouse vs rat), homochronic (age-related slices) or heterochronic slices], revealing no differences in the amount and distribution of migrated cells. The majority of coculture assays presented here were performed using homotypic, homochronic slices. Concerning the "hippocampal" specificity of the migration substrate, fluorescent age-related cortical slices were cocultivated with wild-type hippocampal slices. In this condition, cortical cells migrated but failed to reach the pyramidal layer, suggesting that a hippocampal environment is specific for a normal hippocampal cell migration.

Electrophysiological recordings of migrating cells. Cocultured organotypic slices were placed in a recording chamber where they were fully submerged and superfused at a flow rate of 2–3 ml/min with an oxygenated artificial CSF of the following composition (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1.3 $MgCl_2$, 25 $NaHCO_3$ 1.2 $NaHPO_4$, and 10 glucose (95% O_2 and 5% CO_2, pH 7.4, 32–34°C). GFP migrating neuroblasts were visualized with a fluorescent upright microscope (Axioscope; Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an appropriate filter and recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Microelectrodes had a resistance of 8–10 MΩ and were filled with a solution containing either (in mM) 120 KCl, 10 KGlu, 0.1 $CaCl_2$, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg^{2+}ATP, and 0.3 Na^{+}GTP (KCl-filled pipette electrode) or 120 CsGlu, 10 CsCl, 0.1 $CaCl_2$, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg^{2+}ATP, and 0.3 Na^{+}GTP, pH 7.25, 270–280 mOsm (CsGlu-filled pipette electrode). In some experiments, rhodamine was added in the pipette electrode. Whole-cell measurements in voltage-clamp or current-clamp mode were filtered at 3 kHz using an EPC-9 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany). All data were digitized (1–2 kHz) with a digidata (Molecular Devices, Union City, CA) interface card to a personal computer.

BrdU incorporation into dividing cells. After undergoing their final division at the level of the neuroepithelium, postmitotic cells, presumptive neuroblasts, start to migrate to reach their target layers. BrdU is incorporated into those dividing cells during the S phase of their cell cycle and remains integrated into their DNA during their life span. Thus, BrdU allows the monitoring of age-related postmitotic migrating cells, from their birthplace to their target layer. The BrdU signal is, however, diluted if the cells undergo additional rounds of division, being distributed to the daughter cells.

BrdU was either administrated by an intraperitoneal injection of the pregnant animals with 50 mg of BrdU per kilogram of body weight 2 h before the preparation of the slices or applied in culture as described above. When injections were performed in pregnant animals for birth-

dating analysis (from E12 to E19), littermates were allowed to birth and to survive until P7–P8 and P14–P15. They were then perfused intracardially with the fixative solution (4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS), and the brains were cut coronally with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany).

Immunohistochemistry on slices and sections. After 1 DIV, cultures were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde and rinsed the next day. Fixed sections were rinsed three times in PBS. All processing was the same for both cases (cultures and sections) starting from this point. Slices were permeabilized for 10 min at room temperature in PBS–Triton X-100 (0.1%)–goat serum (5%). For BrdU staining, the permeabilization step was followed with a 20 min incubation in PBS–HCl 2N at 45°C. After permeabilization, slices were washed three times in PBS and incubated overnight at room temperature with primary antibodies diluted in PBS–Triton X-100 (0.1%)–goat serum (5%). The slices were rinsed three times in PBS and incubated for 2 h at room temperature in appropriated secondary antibodies, used separately for double immunolabeling. After three final washes in PBS, slices were mounted on glass slides and coverslipped in Gel Mount (Biomedia, Foster City, CA).

Slices were examined on an Olympus Fluoview confocal microscope using 20× and 40× objectives, and pictures were digitized in tiff format using the built-in software Fluoview.

Imaging of living slices was performed on a Nikon Diaphot inverted microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera, and pictures were digitized in tiff format using the built-in software Nikon ACT-1.

Quantitative analysis of migrated cells and birthdating studies. Once digitized, pictures were analyzed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA) using custom-made methods and/or the analysis software ImageJ 1.33d (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Slices containing BrdU-labeled cells or fluorescent migrating neuroblasts were divided into two areas: (1) the "migration area," from the neuroepithelium to the stratum oriens, virtually containing migrating cells; and (2) the "destination area," the stratum pyramidale, virtually containing cells that have reached their final destination. The number of cells was quantified in each area and expressed as a percentage of the total number of cells (±SEM). Data were then expressed as migration indices. The migration indices were calculated as the ratio between the percentage of cells that reached the stratum pyramidale after 1 DIV and the percentage of cells that were still in the migration area, with the average of the control values being set to 10. For the monitoring of age-related postmitotic migrating cells, only the round-shaped, heavy-stained, BrdU+ cells were included in the analysis, virtually corresponding to cells that underwent their final mitosis during the pulse of BrdU.

For fluorescent neuroblasts located in the migration area, the orientation of the leading processes was measured with respect to the "correct" direction of radial migration (i.e., perpendicular to the interface between the fluorescent and the nonfluorescent slice, linking the neuroepithelium to the stratum pyramidale and corresponding to an angular deviation of 0°). In this analysis, the leading process is considered as a vector, originating from the center of the soma and pointing to the tip of the growth cone. The angular deviation between the vector and the correct direction of migration is then measured, and migrated cells are distributed into three groups: (1) cells with leading process orientations that deviate from 0° to 70° of the correct direction of migration (these cells are referred to as "well oriented" migrating neuroblasts); (2) cells with leading process orientations that deviate from 70° to 110°; and (3) cells with leading process orientations that deviate from 110° to 180°.

All quantitative analyses were performed using stereological methods. The normality of the data distribution was checked using SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA). Statistical analyses were performed with Origin 7.0 (Origin Lab, Northampton, MA), and statistical significance was assessed using the *t* test and ANOVA.

Results

The hippocampal organotypic slice coculture assay allows the visualization of fluorescent migrating neuroblasts

Our first task was to design a preparation in which neurons can be visualized when migrating and patch-clamp recorded to determine the presence of functional receptors. For this purpose, we designed a hippocampal organotypic slice coculture assay in which E17–E18 hippocampal slices from GFP and wild-type mice were cocultured in tight apposition at the level of the neuroepithelium of the CA1 region (see Materials and Methods) (Fig. 1*A*,*B*). The embryonic age was chosen after reevaluation of the period of genesis of CA1 pyramidal cells in mice using BrdU (which goes from E14 to E18) (see supplemental data and Figs. S1*A* and S1*B*, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Under this condition, many GFP cells generated in the germinal layer of the CA1 region (i.e., the neuroepithelium) exit the GFP donor slice to migrate onto the nonfluorescent host slice. After 1 DIV, many fluorescent cells had migrated onto the wild-type slice, and some of them had reached the stratum pyramidale (Fig. 1*C*). These cells already expressed neuronal markers such as MAP2 (24.18 ± 3.12%, 149 of 649 cells) (Fig. 1*D*) or βIII-tubulin (32.54 ± 0.67%, 219 of 678 cells) (Fig. 1*D*) but not glial markers (GFAP; data not shown). Thus, the majority of fluorescent migrating cells were migrating neuroblasts expressing neuronal, but not glial, markers. These migrating neuroblasts were presumptive young CA1 pyramidal cells regarding their age of genesis (see supplemental data and Figs. S1*A* and S1*B*, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and the absence of GABA immunoreactivity in virtually all GFP-positive cells (Fig. 1*E*). In addition, most of these neuroblasts (72.99%, 916 cells, 24 experiments) migrated with a minimal deviation to their correct direction of migration according to the orientation of the leading processes (mean deviation, 30.21 ± 0.59°; see Materials and Methods). These migrating cells were referred to as well oriented migrating neuroblasts.

Migrating neuroblasts express functional $GABA_A$ and NMDA receptors

Parallel immunocytochemical experiments (Fig. 2) showed that migrating neuroblasts were immunoreactive to NMDA (Fig. 2*A–C*, NR1) and $GABA_A$ (Fig. 2*D–F*) receptors, suggesting that they could respond to ambient transmitters released from adjacent structures (see supplemental data and Fig. S1*C*, available at www.jneurosci.org as supplemental material). To determine the functionality of these receptors, we performed electrophysiological experiments in which migrating neuroblasts in the coculture assay were patch-clamp recorded after 1 DIV (Fig. 2*G*). Only the well oriented migrating neuroblasts were included in the electrophysiological analysis. These migrating cells had a mean capacitance of 6.0 ± 0.3 pF ($n = 25$), a resting membrane potential of −47 ± 8 mV (measured with a KCl-filled electrode; $n = 6$), and an input resistance of 3.3 ± 1.8 GΩ ($n = 6$). In some neuroblasts (4 of 10), a depolarizing pulse evoked a small action potential (or spikelet) of 10–20 mV amplitude (Fig. 2*H*), generated at a membrane threshold approximately −30 mV, suggesting that some of these cells are potentially excitable. We then determined whether these cells expressed functional GABA and glutamate receptors. Bath application of GABA (100 μM; $n = 2$) or isoguvacine (10 μM; $n = 7$), specific agonists of $GABA_A$ receptors, generated currents [37 ± 2 pA ($n = 2$) or 49 ± 12 pA ($n = 6$ of 7 cells), respectively] (Fig. 2*I*). These currents were blocked by bicuculline (20 μM), a specific antagonist of $GABA_A$ receptors (Fig. 2*I*). Bath application of glutamate (100 μM; $n = 4$) also generated a current of 20 ± 17 pA. In addition, NMDA (30–100 μM) generated currents of 54 ± 14 pA in 6 of 12 migrating cells (Fig. 2*I*). These currents were not observed when 50 μM D-APV (specific competitive antagonist of NMDA receptors) was coapplied with NMDA. Bath application of 3–30 μM AMPA (agonist of

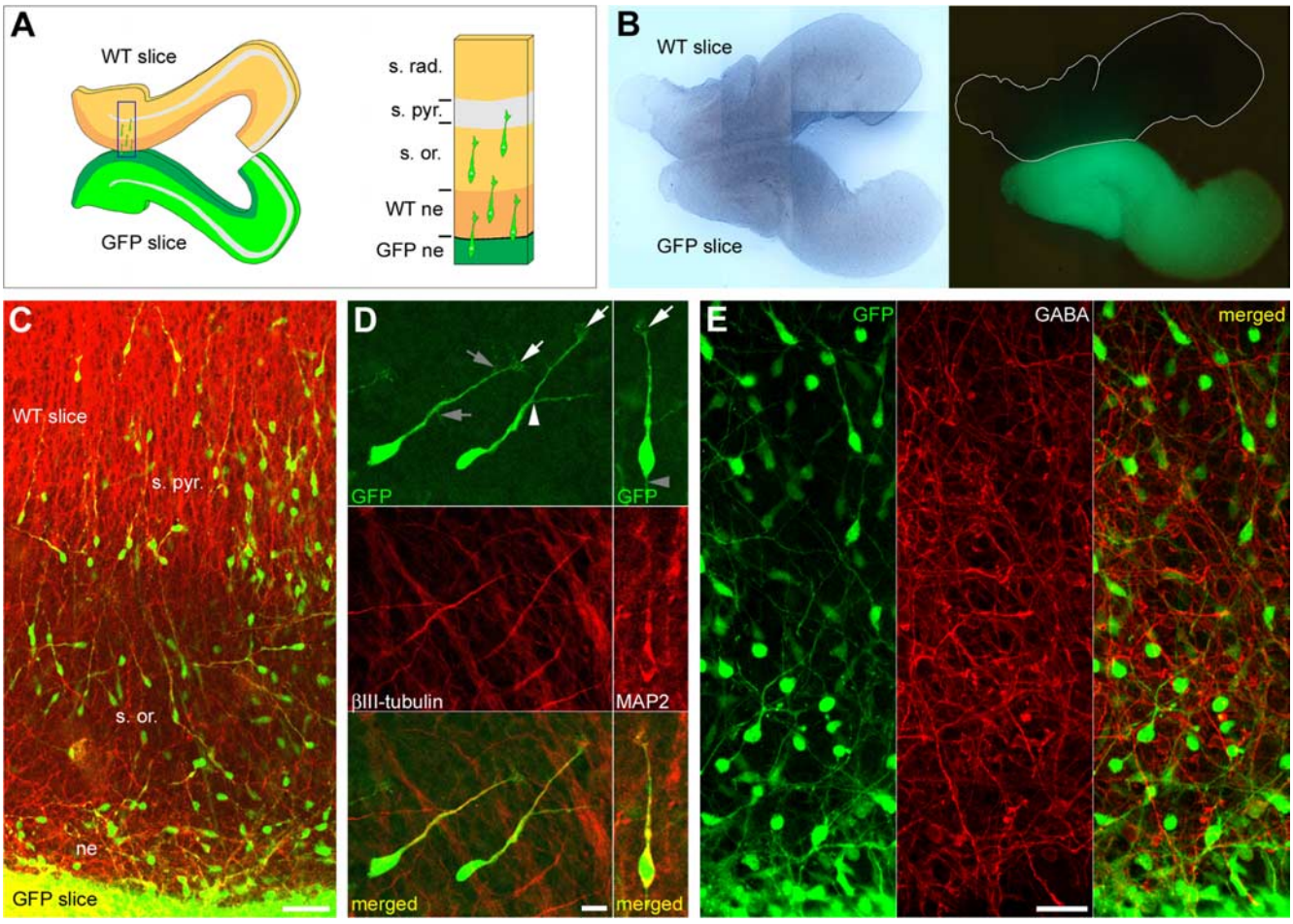


Figure 1. Migrating neuroblasts in the hippocampal organotypic slice coculture assay. ***A***, Left, Diagram depicting the two hippocampal organotypic slices as they are arranged in the coculture assay. The two slices, the fluorescent donor slice and the nonfluorescent host slice, are plated in very tight apposition one relative to another, at the level of the neuroepithelium of the CA1 region. Right, Higher magnification of the square shown in the left panel. Fluorescent (GFP) migrating neuroblasts, originated in the neuroepithelium of the GFP slice (GFP ne), are migrating onto the nonfluorescent slice to reach the stratum pyramidale (s. pyr.), crossing the migration area [i.e., the neuroepithelium of the nonfluorescent slice (WT ne) and the future stratum oriens (s. or.)]. s. rad., stratum radiatum. ***B***, Images of living cocultivated hippocampal slices, as they appear 1 h after plating onto the membrane of a Millicell-CM insert, in light transmission (left) and under UV light (right). The borders of the nonfluorescent slice are shown in white. ***C***, Immunostaining of E17 slices cocultured for 1 DIV showing migrating neuroblasts double-labeled with antibodies against GFP (green) and βIII-tubulin (red). Most neuroblasts originated in the fluorescent slice (GFP slice) are migrating radially onto the nonfluorescent slice (WT slice) toward the s. pyr., crossing the future s. or. ne, Neuroepithelium. ***D***, Immunostaining of E17 slices cocultured for 1 DIV, showing migrating neuroblasts at larger magnification, double-labeled with antibodies against GFP (green; top) and βIII-tubulin (red; left middle) or MAP2 (red; right middle). Green and red channels are merged in bottom panels. Migrating neuroblasts are either monopolar with a single leading process or bipolar with a branched leading process (white arrowhead in the left top panel). They often display a short trailing process (gray arrowhead in the right top panel). Lamellipodia are distinguishable at the tip of the leading process (white arrows in the top panels), and few filopodia are often present along the process (gray arrows in the left top panel). ***E***, Immunostaining of E17 slices cocultured for 1 DIV, showing GFP-positive migrating neuroblasts (green; left) and GABA-positive fibers (red; middle). Virtually all GFP-positive migrating neuroblasts are immunonegative to GABA (merged green and red channels on the right panel). Scale bars: ***C***, 50 μm; ***D***, 10 μm; ***E***, 25 μm.

AMPA/KA receptors) failed to evoke any currents in all migrating neuroblasts recorded (mean capacitance, 5.5 ± 0.6 pF; $n = 4$), suggesting that those cells do not express functional AMPA/KA receptors. When agonists for NMDA and $GABA_A$ receptors were sequentially applied, GABA- but not NMDA-evoked currents were observed in 4 of 10 cells, GABA- and NMDA-evoked currents were observed in 5 of 10 cells, and only NMDA-evoked currents were observed in only 1 of 10 cells. These data suggest that the majority of migrating neuroblasts expressed $GABA_A$ receptors (9 of 10 cells) and only a subset coexpressed NMDA receptors (5 of 10 cells). Therefore, functional $GABA_A$ receptors predominate in that they are present in almost all migrating neuroblasts.

As illustrated in our previous report, ambient GABA can activate maturing pyramidal cells in a tonic manner (Demarque et al., 2002). We therefore investigated whether migrating neuroblasts were also tonically activated by ambient GABA. When specific antagonists of the $GABA_A$ receptors (20 μM bicuculline plus 100 μM picrotoxin) were coapplied, a current associated with a decrease in the basal noise was unmasked in some migrating cells (2 of 10 cells) (Fig. 2*J*). The addition of glutamate receptor antagonists failed to generate any current. This suggests that ambient GABA can activate migrating neuroblasts in a tonic manner. However, only a subset of them would be concerned or alternatively would be tonically activated only during a transient period of their journey to the pyramidal cell layer.

$GABA_A$ and NMDA receptor antagonists perturb neuronal migration in the coculture assay

To determine the role of GABA and glutamate on migration, we tested the effects of the treatments with antagonists of the receptors functionally expressed by migrating neuroblasts (i.e., antag-

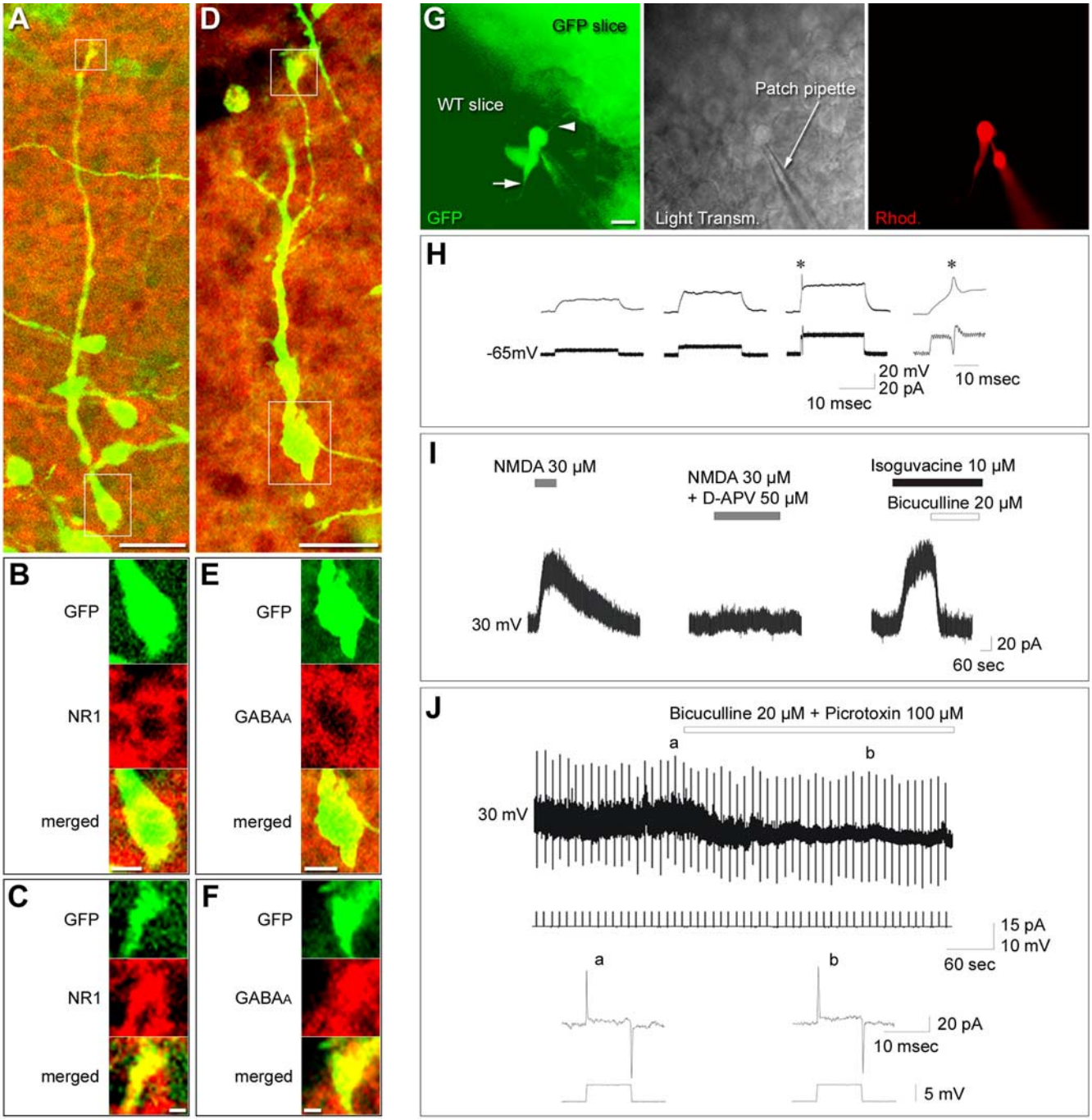


Figure 2. Receptor expression and electrophysiological properties of migrating neuroblasts. ***A–C***, Immunostaining of an E17 slice cocultured for 1 DIV showing a migrating neuroblast double-labeled with antibodies against GFP (green; ***A*** and top panels in ***B*** and ***C***) and NR1 subunit of the NMDA receptor (red; ***A*** and middle panels in ***B*** and ***C***). Squares surrounding the soma and the tip of the leading process are shown enlarged in ***B*** and ***C***. Green and red channels are merged in the bottom panels in ***B*** and ***C***. ***D–F***, Immunostaining of E17 slices cocultured for 1 DIV showing a migrating neuroblast double-labeled with antibodies against GFP (green; ***D*** and top panels in ***E*** and ***F***) and $GABA_A$ receptor (red; ***D*** and middle panels in ***E*** and ***F***). Squares surrounding the soma and the tip of the leading process are shown enlarged in ***E*** and ***F***. Green and red channels are merged in the bottom panels in ***E*** and ***F***. ***G***, Photomicrograph of a GFP-positive migrating neuroblast recorded with a pipette filled with rhodamine. Left, GFP-positive neuroblast originated into the fluorescent slice (GFP slice) migrating onto the nonfluorescent hippocampal slice (WT slice). The arrow points the leading process, and the arrowhead points to the trailing process. Middle, The same neuroblast shown in light transmission (Light Transm.), impaled with the patch pipette. Right, The same neuroblast filled with rhodamine (Rhod.). ***H***, Spikelet evoked by depolarizing pulses applied to a migrating neuroblast recorded with a KCl-filled pipette solution. The capacitance of the cell was 10 pF. The spikelet (indicated with an asterisk and shown at lower time scale on the right) is evoked at a membrane potential of −25 mV. ***I***, Currents mediated by bath application of NMDA and isoguvacine and recorded at 30 mV in the same cell (C_m, 6 pF) with a CsGlu-filled pipette solution. Both receptor-mediated currents are blocked by their respective antagonists. ***J***, Migrating neuroblast (C_m, 3 pF) recorded at 30 mV with a CsGlu-filled pipette solution. Bath application of $GABA_A$ receptor antagonists generates an inward current associated with a decrease of the basal noise. Depolarizing pulses (5 mV, 10 ms, applied every 10 s) show that these effects are not associated with changes in the serial resistance. The bottom traces show representative responses to the current pulse before (a) and at the plateau (b) of the tonic current. Scale bars: ***A***, ***D***, 20 μm; ***B***, ***E***, 5 μm; ***C***, ***F***, 2 μm; ***G***, 10 μm.

onists of $GABA_A$ and NMDA receptors). Cells in the hippocampal organotypic slices coculture assay were allowed to migrate in a culture medium supplemented with pharmacological agents. After 1 DIV, migrated cells were quantified, and results were expressed as migration indices (see Materials and Methods). After 1 DIV in the presence of 10 μM MK801, an antagonist of the NMDA receptors, the migration index was reduced by 2.8 units (from 10.05 ± 0.87 in the control condition to 7.19 ± 1.25 after MK801; $p = 0.090$; six experiments; 298 cells). After 1 DIV in the presence of 50 μM bicuculline, an antagonist of the $GABA_A$ receptors, the migration index was reduced by 3.1 units (from 10.05 ± 0.87 in the control condition to 6.92 ± 0.68 after bicuculline; $p = 0.018$; six experiments; 419 cells).

We also investigated the morphological characteristics of migrating neuroblasts located in the migration area (i.e., from the neuroepithelium to the stratum oriens). We first examined the orientation of the leading processes, considering this orientation as an index of the direction of migration (see Materials and Methods) (Fig. 3*A*). There were no significant differences between groups (control slices, MK801-treated slices, and bicuculline-treated slices), with the majority of cells (on average, 73.02 ± 4.32% for the three conditions) (Fig. 3*B*) migrating with a minimal deviation from the correct direction of migration (the majority of cells for the three conditions migrated with a mean deviation of 30.65 ± 0.93°). We then measured the length of the leading processes after treatment with MK801 and bicuculline. We noticed a significant reduction in the length of the leading processes, after 1 DIV in the presence of MK801 (49.64 ± 1.20 μm; $p = 0.004$; 8 experiments; 418 cells) (Fig. 3*C*,*D*) and after 1 DIV in the presence of bicuculline (46.09 ± 1.08 μm; $p = 3.50E\text{-}08$; 8 experiments; 404 cells) (Fig. 3*C*,*D*), compared with the control condition (53.46 ± 0.68 μm; 24 experiments; 1182 cells) (Fig. 3*C*,*D*).

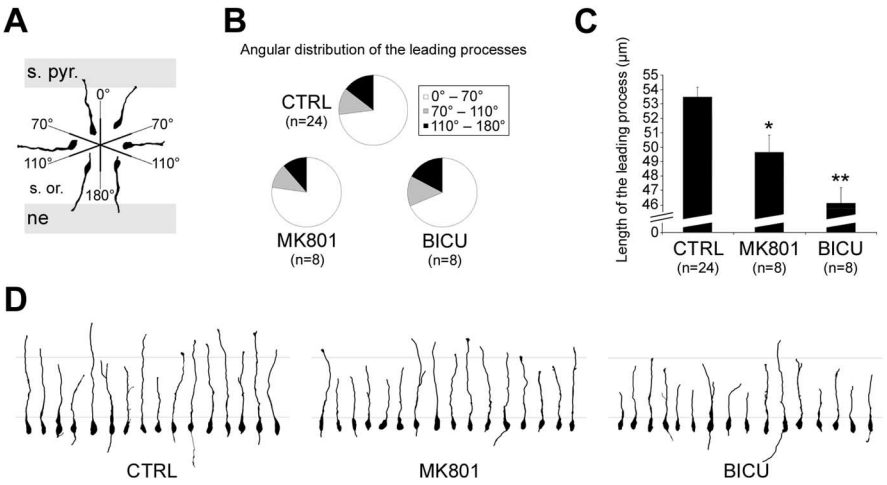


Figure 3. Treatment with receptor antagonists affects the length of the leading processes of migrating neuroblasts without affecting their orientation. ***A***, The orientation of the leading processes is evaluated with respect to the correct direction of migration (corresponding to an angular deviation of 0°). Migrating neuroblasts located in the migration area [i.e., the neuroepithelium (ne) and the stratum oriens (s. or.)] and on their way to the stratum pyramidale (s. pyr.) are distributed into three groups, depending on their leading processes orientation: (1) cells with leading process orientations that deviate from 0° to 70° of the correct direction of migration; (2) cells with leading process orientations that deviate from 70° to 110°; and (3) cells with leading process orientations that deviate from 110° to 180°. Six reconstructed migrating neuroblasts are shown (2 per group). ***B***, Distribution of the migrated cells into the three groups explained in ***A***, after culture for 1 DIV in the absence of any treatment, in the presence of MK801, or in the presence of bicuculline. The number of experiments is given in parentheses. ***C***, Length of the leading processes evaluated after 1 DIV in the absence of any treatment, in the presence of MK801, or in the presence of bicuculline. Data are expressed as ±SEM, and the number of experiments is given in parentheses. *$p < 0.005$; **$p < 0.001$. ***D***, Length of the leading processes evaluated after 1 DIV in the absence of any treatment, in the presence of MK801, or in the presence of bicuculline. Sixteen reconstructed migrating neuroblasts are shown per condition. The distance between the gray horizontal bars is 50 μm. CTRL, Control, absence of any treatment; BICU, bicuculline.

Thus, antagonizing the effects of GABA and glutamate impaired neuronal migration in the coculture assay, affecting the length of the leading processes but without affecting the orientation of the migration, suggesting a motility defect rather than a guidance deficit. However, the amplitude of the effects of treatments with antagonists was slightly blurred by the fact that migrating neuroblasts in the coculture assay are likely to represent a heterogeneous population of cells, being generated at different time periods, resulting in successive waves of migration. To be able to investigate the effect of antagonist application on a single age-related population of migrating cells, we shifted to label premigratory cells by using BrdU incorporation into dividing cells on isolated hippocampal organotypic slices.

$GABA_A$ and NMDA receptor antagonists perturb the migration of BrdU-labeled cells in hippocampal organotypic slices culture

The effects of the application of receptor antagonists were evaluated on a population of age-related premigratory cells labeled with BrdU. Cells in isolated hippocampal organotypic slices were pulse-labeled with BrdU for 2 h and allowed to migrate in a culture medium supplemented with pharmacological agents. After 1 DIV, BrdU-labeled migrating cells were quantified, and the results are shown in Fig. 4, as explained previously. Under these conditions, we were able to investigate the migration of a virtually unique and homogenous wave of BrdU+ migrating cells, those generated during the pulse of BrdU. The migration of this homogenous population of cells was then only influenced by factors (and supplemental pharmacological agents) that were present in their own environment. After 1 DIV in the presence of 10 μM MK801, the migration index was reduced by 8 units (from 10.00 ± 2.09 in the control condition to 1.96 ± 0.26 after MK801; $p = 0.0003$; 12 experiments; 1519 cells) (Fig. 4*B*). After 1 DIV in the presence of 50 μM bicuculline, the migration index was reduced by 9 units (from 10.00 ± 2.09 in the control condition to 1.15 ± 0.26 after bicuculline; $p = 0.0002$; 11 experiments; 1129 cells) (Fig. 4*B*). Importantly, the pharmacological treatments had no effects on the total number of BrdU-labeled cells (data not shown), suggesting that the proliferation rate and cell survival were not affected by the treatments. Thus, antagonizing the effects of GABA and glutamate acting through $GABA_A$ and NMDA receptors, respectively, reduced the number of neuroblasts that migrated to their correct target layer. We next investigated whether a nonconventional SNARE-independent release of transmitters mediates these effects (Demarque et al., 2002).

Hippocampal cytoarchitecture and receptor expression are not altered in munc18-1 mice

In agreement with a previous study (Verhage et al., 2000), the general architecture of the cortex was not altered in munc18-1 KO mice. Thus, in E17 hippocampal slices from munc18-1 mu-

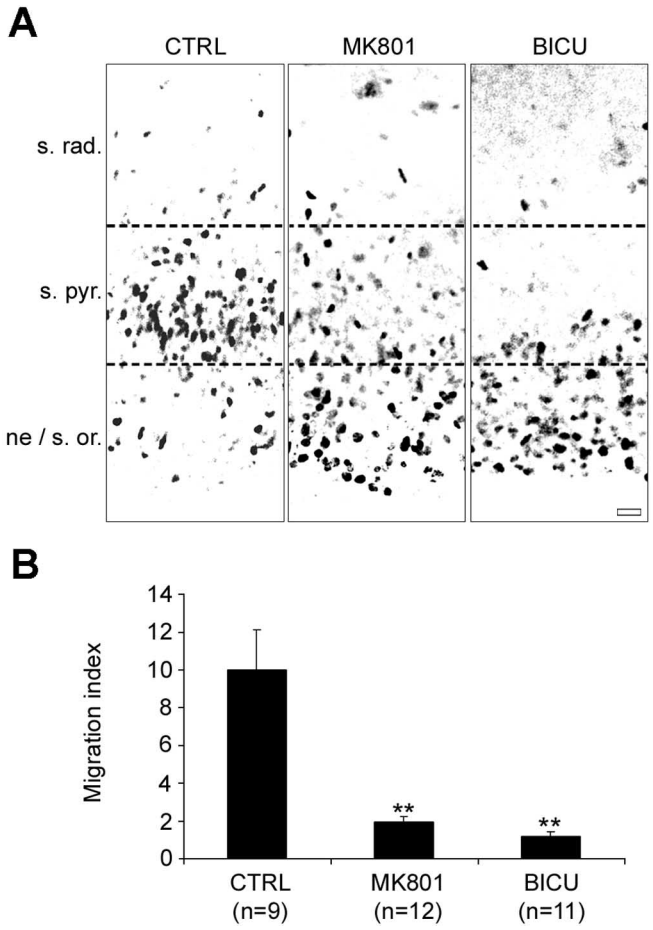


Figure 4. $GABA_A$ and NMDA receptor antagonists prevent the BrdU-labeled cells from migrating to the stratum pyramidale in hippocampal organotypic slice culture. ***A***, Immunostaining for BrdU on hippocampal organotypic slices cultured for 1 DIV without any treatment (control condition; left), in the presence of 10 μM MK801 (middle), and in the presence of 50 μM bicuculline (right). In the absence of any treatment, the majority of BrdU+ cells after 1 DIV has migrated to settle into the stratum pyramidale (s. pyr.). After 1 DIV, in the presence of MK801 or bicuculline, BrdU+ cells that have failed to migrate are mainly distributed into the migration area [i.e., neuroepithelium (ne)/stratum oriens (s. or.)]. Scale bar, 20 μm. ***B***, Histogram showing the migration indices obtained after treatment for 1 DIV with 10 μM MK801 or 50 μM bicuculline compared with the untreated control condition. The migration indices are expressed ($\pm$SEM) as the ratio between the percentage of cells that reached the stratum pyramidale after 1 DIV and the percentage of cells that were still in the migration area (i.e., from the neuroepithelium to the stratum oriens), with the average of the control values being set to 10. $^{**}p < 0.001$. The number of experiments is given in parentheses. CTRL, Control; BICU, bicuculline.

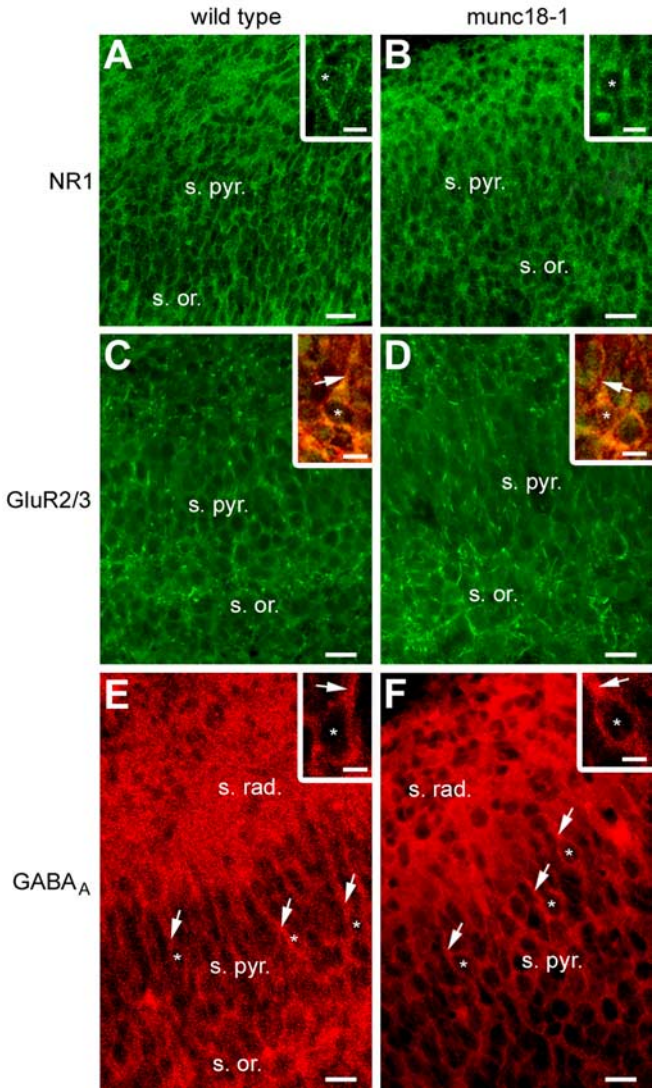


Figure 5. Receptor expression and hippocampal cytoarchitecture in munc18-1 mutants mice versus wild-type mice at late prenatal stages. ***A***, ***B***, Immunostaining for the NR1 subunit of the NMDA receptor on E17 hippocampal sections, revealing no striking differences in the NR1 subunit expression throughout the stratum oriens and the stratum pyramidale of the CA1 region, in the wild-type mice compared with the munc18-1 mutant mice. Insets, Higher magnification revealing a mainly somatic (asterisks) expression of the NR1 subunits in both groups. ***C***, ***D***, Immunostaining for the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor on E17 hippocampal sections, showing similar GluR2/3 subunit expression throughout the strata oriens and pyramidale of the CA1 region, in the wild-type mice compared with the munc18-1 mutant mice. Insets, Higher magnification of double immunostaining for the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor (green) and for MAP2 (red) showing in few pyramidal cells the presence of a short apical dendrite (arrows), decorated with GluR2/3 subunits. The asterisks indicate cell nuclei. ***E***, ***F***, Immunostaining for the $GABA_A$ receptor on E17 hippocampal sections, illustrating the absence of any striking difference in the $GABA_A$ subunit expression throughout the strata oriens, radiatum, and pyramidale of the CA1 region, in the wild-type mice compared with the munc18-1 mutant mice. Insets, Higher magnification showing a mainly somatic expression of the $GABA_A$ receptors in both groups. The asterisks indicate cell nuclei, and arrows indicate apical dendrites. Scale bars: 20 μm; insets, 10 μm. s. or., Stratum oriens; s. pyr., stratum pyramidale; s. rad., stratum radiatum.

tant mice, the CA1 pyramidal layer was not different from controls (Fig. 5). Furthermore, few pyramidal cells already displayed a MAP2-positive short apical dendrite (Fig. 5*C*,*D*, insets), suggesting that the apical dendrite outgrowth would not require the vesicular secretion of transmitters. Moreover, there was no obvious difference in receptor expression in the mutant compared with the wild type. The NR1 subunit of the NMDA receptors was present throughout the strata oriens and pyramidale (Fig. 5*A*,*B*), mainly expressed around the soma (Fig. 5*A*,*B*, insets). The GluR2/3 subunits of the AMPA receptors and the $GABA_A$ receptors (Fig. 5*C–F*) were also present on cells located in the stratum oriens and in the stratum pyramidale. These receptors were mainly somatic and, when present, were also detected on apical dendrites (Fig. 5, insets). Because receptor expression and organization of the pyramidal layer were not impaired in the absence of vesicular secretion of transmitters, we then investigated whether neuronal migration is affected.

Using BrdU incorporation on isolated hippocampal organotypic slices, we found no significant difference in the total number of BrdU+ migrated cells in wild-type slices (118.67 $\pm$ 31.69 BrdU+ migrated cells; nine experiments) compared with munc18-1 slices (146.33 $\pm$ 13.65 BrdU+ migrated cells; $p = 0.18$; three experiments). Furthermore, the amount of BrdU+ mi-

grated cells in the stratum pyramidale of the wild type (99.55 ± 8.58 BrdU+ migrated cells in the stratum pyramidale; nine experiments) was not significantly different from the mutant (70 ± 25.16 BrdU+ migrated cells in the stratum pyramidale; $p = 0.17$; three experiments). These observations suggest that neuronal migration is not affected by the absence of vesicular secretion of transmitters. Because transmitters are released by a SNARE-independent mechanism in these neurons (Demarque et al., 2002), we tested whether the effects of GABA and NMDA on neuronal migration persist in munc18-1-deficient mice.

The effects of $GABA_A$ and NMDA receptor antagonists persist in hippocampal organotypic slices from munc18-1 mutant mice

We investigated the effects of treatments with antagonists of the $GABA_A$ and the NMDA receptors on neuronal migration in the absence of transmitter secretion through synaptic vesicles in munc18-1 mutant mice. To quantify the effects of the application of receptor antagonists, we performed BrdU incorporation on isolated hippocampal organotypic slices from munc18-1 mutant mice (Fig. 6). On isolated slices as investigated here, we were able to study the impact of the absence of vesicular secretion of transmitters on migration, what could not have been possible on cocultivated slices, in which SNARE-dependent mechanisms could have been present in the GFP donor slice and in the GFP migrating cells. After 1 DIV in the presence of 10 μM MK801, an antagonist of the NMDA receptors, the migration index was reduced by 7 units (from 10.01 ± 3.45 in the control condition to 2.86 ± 1.54 after MK801; eight experiments; 1385 cells) (Fig. 6*B*). However, this effect was not significant ($p = 0.053$) because of a relative variability of the data, and we could not exclude that part of the glutamate involved in the modulation of cell migration may have a vesicular origin. After 1 DIV in the presence of 50 μM bicuculline, an antagonist of the $GABA_A$ receptors, the migration index was reduced by 9 units (from 10.01 ± 3.45 in the control condition to 0.82 ± 0.20 after bicuculline; $p = 0.002$; seven experiments; 1314 cells) (Fig. 6*B*). Thus, in the absence of vesicular release of transmitters through SNARE-dependent mechanisms, neuronal migration occurred but was impaired when cells were allowed to migrate in a medium supplemented with antagonists of receptors to the transmitters. This indicates that the activation of mainly $GABA_A$ receptors by endogenous transmitters still occurs in munc18-1-deficient mice and is involved in the modulation of CA1 pyramidal cell migration. This also suggests that transmitters (and mainly GABA) released independently of the SNARE machinery are able to modulate neuronal migration in a paracrine manner.

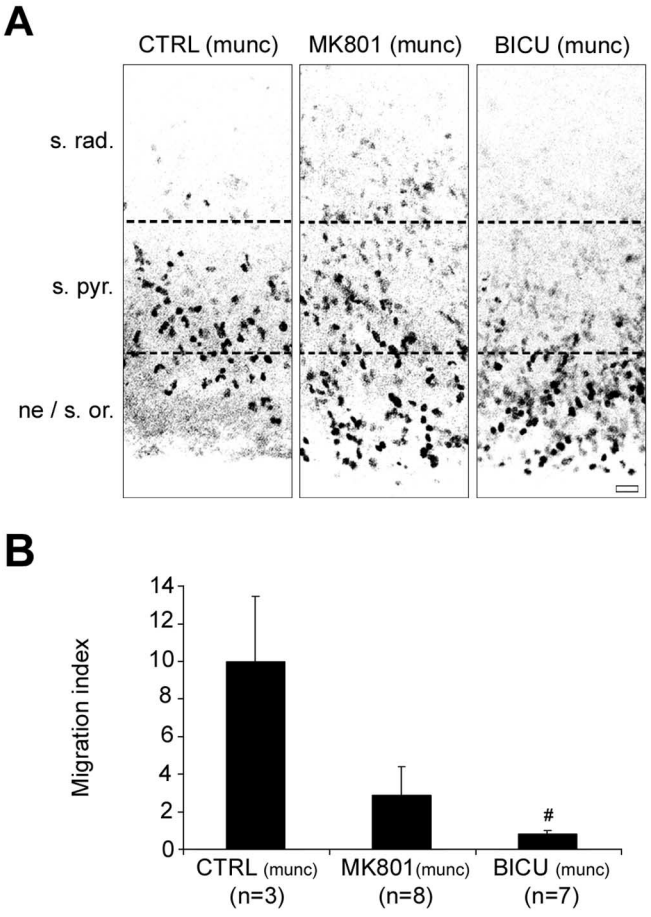


Figure 6. $GABA_A$ and NMDA receptor antagonists impaired the migration of BrdU-labeled cells in hippocampal organotypic slice culture from munc18-1 mutant mice. ***A***, Immunostaining for BrdU on hippocampal organotypic slices from munc18-1 mutant mice cultured for 1 DIV without any treatment [control condition (munc); left], in the presence of 10 μM MK801 (middle), and in the presence of 50 μM bicuculline (right). In the absence of any treatment in munc18-1 hippocampal slices, the BrdU+ cells after 1 DIV are distributed partly into the migration area [i.e., neuroepithelium (ne)/stratum oriens (s. or.)] and partly into the stratum pyramidale (s. pyr.). After 1 DIV in the presence of MK801 and to a greater extent in the presence of bicuculline, BrdU+ cells that have failed to migrate are distributed into the migration area. Scale bar, 20 μm. *B*, Histogram showing the migration indices obtained after treatment for 1 DIV with 10 μM MK801 or 50 μM bicuculline compared with the untreated control (munc) condition in hippocampal organotypic slice cultures from munc18-1 mutant mice. The migration indices are expressed (±SEM) as the ratio between the percentage of cells that reached the stratum pyramidale after 1 DIV and the percentage of cells that were still in the migration area (i.e., from the neuroepithelium to the stratum oriens), with the average of the control values being set to 10. $^{\#}p < 0.01$. The number of experiments is given in parentheses. CTRL, Control; BICU, bicuculline.

Discussion

Our results suggest that the release of GABA and glutamate through unconventional SNARE-independent mechanisms modulate neuronal migration. This is based on experiments showing that: (1) receptors to the transmitters GABA and glutamate are present in the migration area and are functional on migrating neuroblasts; (2) treatments with antagonists of the $GABA_A$ and the NMDA receptors strongly impair neuronal migration in our models; (3) neuronal migration and construction of the stratum pyramidale are normal in the absence of SNARE-dependent vesicular secretion of transmitters in munc18-1 mutant mice; and (4) the effects of treatments with antagonists persist in munc18-1 mutant mice. Therefore, the early expression of receptors in neurons that bear no functional synapses enables a modulation of migration by endogenous GABA and glutamate, possibly providing a mechanism for the activity-dependent regulation of brain development. Also, because these actions are not dependent on conventional vesicular release of transmitters, other mechanisms yet to be determined may control the presence and diffusion of transmitters in the extracellular space.

Paracrine transmitters?

Transmitters have been shown to play a crucial role in the modulation of brain construction, from the regulation of proliferation and migration to the modulation of differentiation and survival (Nguyen et al., 2001), acting in that sense as environmental (or epigenetic) factors. However, the mode of action of these transmitters and their mode of secretion are completely unknown. In our previous study (Demarque et al., 2002), we re-

ported the presence of a paracrine mode of intercellular communication through transmitters in the developing hippocampus, at a stage in which synapses are absent. This paracrine communication is based on the activation of receptors present in cells that have no synapses, by endogenous transmitters released through calcium- and SNARE-independent mechanisms (Demarque et al., 2002). Here, we demonstrate that the transmitters involved in this paracrine nonsynaptic mode of communication may be responsible of the modulation of neuronal migration, thus confirming that paracrine transmitters influence brain construction. This study shed new light on the results of the numerous studies investigating the modulatory role played by the transmitters during CNS development (Komuro and Rakic, 1993; Behar et al., 1998, 1999, 2000, 2001; Fueshko et al., 1998; Hirai et al., 1999; Bless et al., 2000; Simonian and Herbison, 2001; Kihara et al., 2002; Lopez-Bendito et al., 2003). As suggested by Owens and Kriegstein (2002), one could hypothesize that the modulation of neuronal migration by transmitters in those previous studies might be mediated exclusively by a nonvesicular release.

These paracrine transmitters have a nonvesicular (or SNARE-independent) origin, but the exact origin and mode of secretion of these transmitters remains to be investigated. One could hypothesize that transmitters might be released either from more mature neurons in the vicinity of migrating neuroblasts and/or at the level of the target fields, or from glial cells (i.e., astrocytes or radial glial cells), or alternatively from migrating neuroblasts themselves [i.e., in an autocrine/paracrine manner (Bolteus and Bordey, 2004)]. The mode of secretion is also unknown, but we could suggest that transmitters might be released either through exchangers (Warr et al., 1999), gap junction hemichannels (Cotrina et al., 1998; Ye et al., 2003), ATP receptors (Wang et al., 2002; Duan et al., 2003), or volume-sensitive chloride channels (Kimelberg et al., 1990; Pasantes-Morales et al., 1994; Mongin and Kimelberg, 2002).

Paracrine transmitters as developmental signals

An increasing amount of evidences, including those provided in our study, suggest that transmitters act as developmental signals (Nguyen et al., 2001;Owens and Kriegstein, 2002). These "informative" transmitters may establish morphogenetic gradients that guide migrating neuroblasts to their target fields (i.e., positional signaling), or create a permissive substrate for migration, giving to the neuroblasts the conditions required for motility, or a combination of both. Transmitters may also establish and maintain a level of activity adequate for migrating neuroblasts to respond to the "classical" guidance cues. In addition, transmitters could stimulate the secretion of these guidance cues from surrounding cells, glial cells (astrocytes or radial glial cells) or more mature neurons, present along the migrating pathway and/or at the level of the target field. A "guiding action" of transmitters is unlikely because the leading process orientation (considered as an index of the direction of migration) is unaffected after treatments with antagonists in our study. However, we measured the leading process orientation of migrating neuroblasts "freezed" in the position they had just before fixation, bypassing the fact that the leading process is a highly dynamic structure. Additional studies, more dynamic (i.e., time-lapse high-power microscopy), are required and in process to answer that question. Interestingly, a study by Zheng et al. (1996) reported a turning response of the growth cones of *Xenopus* spinal neurons submitted to glutamate application, the turning response being blocked by the NMDA receptor antagonist AP-5. A "motility-promoting action" of transmitters is more likely, because the activation of the ionotropic receptors by transmitters has been shown to evoke calcium influxes. This is the case for the activation of the NMDA receptors, coupled with a calcium conductance, as well as for the $GABA_A$ receptors, the activation of which in young postnatal hippocampal pyramidal cells and interneurons has been shown to induce intracellular calcium rise (Leinekugel et al., 1995). Furthermore, activation of $GABA_A$ and NMDA receptors in tangentially migrating interneurons has been shown to induce intracellular calcium rise (Soria and Valdeolmillos, 2002). The same group, however, showed recently that the intracellular calcium rise induced by pressure application of kainate, NMDA, or muscimol did not elicit motility (Moya and Valdeolmillos, 2004). These results are quite contradictory to the studies conducted by Komuro and Rakic (1998) and more recently by Kumada and Komuro (2004), which have demonstrated a tight correlation between calcium rise and motility in neurons migrating in the cerebellum, both being importantly decreased after blockade of NMDA receptors. Calcium orchestrated the dynamic of the cytoskeleton: the assembly of the microtubules (Rakic et al., 1996) as well as the assembly of the actin network (Rivas and Hatten, 1995). In that respect, the reduction in the length of the leading process observed after treatment with receptor antagonists in our study might be one of the consequences of a cytoskeleton disruption.

It would be interesting to investigate the response of migrating neuroblasts to transmitters as a function of their migratory status (i.e., resting cells vs actively migrating cells). We postulate that the morphologies of the migrating neuroblasts (orientation, length, and branching of their leading processes), as well as their responses to the transmitters would vary along their journey. Interestingly, we found a tonic activation of $GABA_A$ receptors in only 20% of assayed cells. Similar tonic $GABA_A$-generated currents have been observed in many cell types [including very immature CA1 pyramidal cells (Demarque et al., 2002)]. They might control neuronal excitability and information processing (Semyanov et al., 2004) and eventually contribute to modulate the motility of migrating neuroblasts.

To play a developmental role, paracrine transmitters should be able to diffuse into the extracellular space. This diffusion is allowed by the presence of a large, non-cohesive, extracellular space and a relative immaturity of the reuptake mechanisms, both creating the adequate conditions for a long-distance communication. Indeed, in the hippocampus, only glutamate transporters, but not the main GABA transporter GAT-1, contribute to the clearance of transmitters at birth (Demarque et al., 2002). This difference in the maturation of GABA transporters could explain the greater impact of the treatments with GABAergic antagonists in our study compared with glutamatergic antagonists. In addition, the difference in the functional expression of ionotropic receptors on migrating neuroblasts, as described in the present study, with the majority of cells expressing $GABA_A$ receptors argues in the same direction. This is in favor of a central role played by GABA as the key excitatory transmitter in developing brains (Represa and Ben-Ari, 2005). Other subtypes of GABA receptors such as $GABA_B$ might be involved in the modulation of migration in our model, as is the case for tangentially migrating interneurons (Lopez-Bendito et al., 2003). A role for $GABA_B$ receptors in the hippocampus is unlikely, because Gaiarsa et al. (1995) showed that postsynaptic $GABA_B$ receptors are absent or not functional during the first postnatal days in this structure.

In a more general perspective, it may be proposed that paracrine SNARE-independent transmitters contribute to modulate

not only cell migration but also proliferation, neuronal maturation, and synaptogenesis. Thus, munc18-1 KO mice displayed a quite normal maturation of dendrites [MAP2 immunopositive (Demarque et al., 2002)] (Fig. 5), and ultrastructural analysis revealed that null mutants develop apparently normal synaptic structures (Verhage et al., 2000). However, spontaneous activity has been shown to result in calcium transients and to be critical for neurite outgrowth and pathfinding (Spitzer et al., 2000; Ciccolini et al., 2003; Tang et al., 2003). We therefore propose that paracrine SNARE-independent neurotransmitters contribute to this activity and modulate neuronal maturation.

In conclusion, together our data show that paracrine transmitters, glutamate and mainly GABA, act as crucial modulatory players of the brain construction. These paracrine transmitters are released independently of the conventional SNARE-dependent mode of secretion and mediate their effects through the activation of $GABA_A$ and NMDA receptors. Because many pharmacological agents are likely to exert an influence on several neurotransmission systems during pregnancy, drug therapy during this period should be tightly controlled to avoid brain construction defects.

References

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278:474–476.

Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. J Comp Neurol 190:87–114.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. J Neurosci 18:6378–6387.

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. J Neurosci 19:4449–4461.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. Cereb Cortex 10:899–909.

Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL (2001) $GABA_B$ receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. Cereb Cortex 11:744–753.

Bless EP, Westaway WA, Schwarting GA, Tobet SA (2000) Effects of gamma-aminobutyric acid(A) receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route in vivo and in vitro. Endocrinology 141:1254–1262.

Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J Neurosci 24:7623–7631.

Ciccolini F, Collins TJ, Sudhoelter J, Lipp P, Berridge MJ, Bootman MD (2003) Local and global spontaneous calcium events regulate neurite outgrowth and onset of GABAergic phenotype during neural precursor differentiation. J Neurosci 23:103–111.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. Proc Natl Acad Sci USA 95:15735–15740.

Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca^{2+}- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. Neuron 36:1051–1061.

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) $P2X_7$ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. J Neurosci 23:1320–1328.

Fueshko SM, Key S, Wray S (1998) GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants. J Neurosci 18:2560–2569.

Gaiarsa JL, Tseeb V, Ben Ari Y (1995) Postnatal development of pre- and postsynaptic GABAB-mediated inhibitions in the CA3 hippocampal region of the rat. J Neurophysiol 73:246–255.

Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. Nature 366:347–351.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushiki S (1999) Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 114:63–67.

Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z, Sawada T (2002) Stimulation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 138:195–198.

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. J Neurosci 10:1583–1591.

Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260:95–97.

Komuro H, Rakic P (1998) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations. J Neurobiol 37:110–130.

Kumada T, Komuro H (2004) Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca^{2+} transients. Proc Natl Acad Sci USA 101:8479–8484.

Leinekugel X, Tseeb V, Ben Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABAA activation induces Ca^{2+} rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. J Physiol (Lond) 487:319–329.

Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z (2003) Blockade of $GABA_B$ receptors alters the tangential migration of cortical neurons. Cereb Cortex 13:932–942.

Mongin AA, Kimelberg HK (2002) ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. Am J Physiol Cell Physiol 283:C569–C578.

Moya F, Valdeolmillos M (2004) Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. Cereb Cortex 14:610–618.

Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 3:423–432.

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.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett 407:313–319.

O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. Science 258:299–302.

Owens DF, Kriegstein AR (2002) Developmental neurotransmitters? Neuron 36:989–991.

Pasantes-Morales H, Murray RA, Sanchez-Olea R, Moran J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. Am J Physiol 266:C172–C178.

Paxinos G, Törk I, Tecott LH, Valentino KL (1991) Atlas of the developing rat brain. San Diego: Academic.

Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. J Comp Neurol 141:283–312.

Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol 145:61–83.

Rakic P, Stensas LJ, Sayre E, Sidman RL (1974) Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of foetal monkey brain. Nature 250:31–34.

Rakic P, Knyihar-Csillik E, Csillik B (1996) Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. Proc Natl Acad Sci USA 93:9218–9222.

Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. Trends Neurosci, in press.

Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. J Neurosci 15:981–989.

Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat Rev Neurosci 3:641–653.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active $GABA_A$ receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci 27:262–269.

Simonian SX, Herbison AE (2001) Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis. J Neurosci 21:934–943.

Soria JM, Valdeolmillos M (2002) Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. Cereb Cortex 12:831–839.

Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD, Gomez TM (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. BioEssays 22:811–817.

Stanfield BB, Cowan WM (1979) The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. J Comp Neurol 185:423–459.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Methods 37:173–182.

Tang F, Dent EW, Kalil K (2003) Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. J Neurosci 23:927–936.

Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. Proc Natl Acad Sci USA 99:9037–9042.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287:864–869.

Wang CM, Chang YY, Kuo JS, Sun SH (2002) Activation of P2X(7) receptors induced [^{3}H]GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl^-/HCO^{3-}-dependent mechanism. Glia 37:8–18.

Warr O, Takahashi M, Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. J Physiol (Lond) 514:783–793.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. J Neurosci 23:3588–3596.

Zheng JQ, Wan JJ, Poo MM (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. J Neurosci 16:1140–1149.

Annex supplementary data

CA1 pyramidal cells are generated in an inside-out fashion between E14 and E18 in mice and receptors to glutamate and GABA are detected in the migration area at late prenatal stage.

Earlier studies using ^{3}H-thymidine (Stanfield and Cowan, 1979) suggested that pyramidal cells are generated in mice between E14 and E16. To determine an adequate stage for our studies, we performed a serie of BrdU injections in pregnant mice, from E12 to E19, littermates being sacrificed and perfused at P7-8 and P14-P15. Stereological analysis of BrdU-positive pyramidal cells in the CA1 region revealed for both ages of sacrifice the presence of a peak of genesis at E14 (6.97 ± 0.08 cells / mm^3 when sacrificed at P7-8 and 6.34 ± 1.18 cells / mm^3 when sacrificed at P14-15, 3 animals and 9 sections per age, FigS1A), followed by a plateau (from E15 to E18, on average 4.47 ± 0.28 cells / mm^3 when sacrificed at P7-8 and 2.93 ± 0.64 cells / mm^3 when sacrificed at P14-15, 3 animals and 9 sections per age, FigS1A). The genesis started around E12-E13, with very few cells (on average 1.69 ± 0.21 cells / mm^3 when sacrificed at P7-8 and 0.68 ± 0.31 cells / mm^3 when sacrificed at P14-15, 3 animals and 9 sections per age, FigS1A) being generated at this period and stopped at E19, with virtually no cells, or very few, being detected at this time (1.93 ± 1.62 cells / mm^3 when sacrificed at P7-8 and 0.19 ± 0.01 cells / mm^3 when sacrificed at P14-15, 3 animals and 9 sections per age, FigS1A). All BrdU-positive cells in the pyramidal layer were GFAP- and GABA-negative (data not shown). We also confirmed that CA1 pyramidal cells are generated in an inside-out fashion, with the early-born cells being devoted to the deepest part of the pyramidal layer (i.e. close to the stratum oriens) and the late-born cells being devoted to the most superficial part of the pyramidal layer (i.e. close to the stratum radiatum) (FigS1B). Therefore, there is a more prolonged period of genesis of CA1 pyramidal neurons than previously thought. We decided to investigate the role of transmitters in CA1 pyramidal cells migration at late prenatal stages (E17-E18), when the pyramidal layer is already discernable and young pyramidal neurons are still being generated and migrating.

Previous studies have revealed the presence of mRNAs of the $GABA_A$ receptor subunits at the level of the cortical and hippocampal neuroepithelium by E15 (Poulter et al., 1992 ; Poulter et al., 1993). In neocortical structures, GABAergic ($GABA_A$) and glutamatergic (AMPA / KA) receptors are present at the level of the

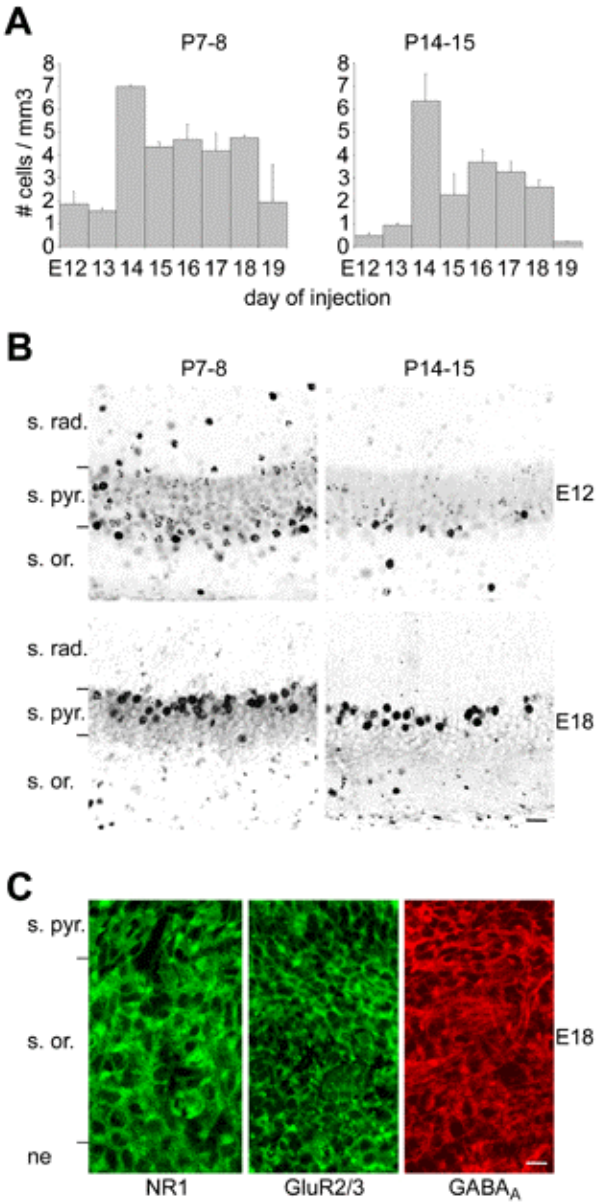


Figure S1: Birthdating analysis of CA1 pyramidal cells and receptors expression in the migration area.

(A) Histograms showing the number of BrdU-positive cells per mm^3, detected into the stratum pyramidale of the CA1 region of P7-8 and P14-15 animals, after single BrdU injection during embryonic development from E12 to E19. Each data point represents mean ± SEM (3 animals and 9 sections per age). (B) Immunostaining for BrdU on hippocampal sections, revealing the inside-out construction of the stratum pyramidale (s. pyr.). Top left panel: animal injected at E12 and perfused at P7-8. The BrdU-positive cells are located into the deepest part of the stratum pyramidale, close to the stratum oriens (s. or.). Top right panel: animal injected at E12 and perfused at P14-15. The BrdU-positive cells are located into the deepest part of the stratum pyramidale, close to the stratum oriens. Bottom left panel: animal injected at E18 and perfused at P7-8. The BrdU-positive cells are located into the superficial part of the stratum pyramidale, close to the stratum radiatum (s. rad.). Bottom right panel: animal injected at E18 and perfused at P14-15. The BrdU-positive cells are located into the superficial part of the stratum pyramidale, close to the stratum radiatum. Scale bar: 10 µm. (C) Immunostaining of E18 hippocampal sections, revealing the presence of the GluR2/3 subunits of the AMPA receptor (left panel), the NR1 subunit of the NMDA receptor (middle panel) and the $GABA_A$ receptors (right panel), throughout the migration area – the neuroepithelium (ne) and the stratum oriens. Scale bar: 10 µm.

ventricular zone at E17 (LoTurco et al., 1995) and functional AMPA receptors are detected on migrating neuroblasts of the intermediate zone of the E13.5-E14.5 cerebral cortex (Metin et al., 2000 ; Poluch and Konig, 2002 ; Poluch et al., 2003). In addition, $GABA_B$ receptors have been detected at the level of the lower intermediate zone of E16 cerebral cortex (Lopez-Bendito et al., 2003). Transmitters (GABA and glutamate) are present throughout the cerebral wall at embryonic stages, as shown by Haydar and colleagues (Haydar et al., 2000).

To gain more information on the presence of receptors in immature hippocampal neurons, we determined the presence of glutamatergic and GABAergic receptors in the migration area of the developing hippocampus (i.e. the neuroepithelium and the stratum oriens). GluR2/3 subunits of the AMPA receptor, NR1 subunits of NMDA receptors and $GABA_A$ receptors were present throughout the neuroepithelium and the stratum oriens (FigS1C). Therefore, we may suggest that glutamatergic and GABAergic receptors are expressed by migrating CA1 hippocampal neuroblasts.

Article 2

Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons

Jean-Bernard Manent, Isabel Jorquera, Yehezkel Ben-Ari, Laurent Aniksztejn, Alfonso Represa

Article 2, problématique.

Les deux types morphologiques principaux du cortex cérébral sont représentés par les neurones excitateurs glutamatergiques et les interneurones GABAergiques. Ces deux types neuronaux sont générés au niveau de zones germinatives distinctes, mais leurs périodes de migration et voies migratoires sont largement coexistantes (voir chapitre 1). De nombreuses études ont démontré l'existence d'une modulation de la migration des neurones excitateurs par le GABA (voir chapitre 3 et article 1), dont les interneurones en migration sont la source potentielle la plus évidente. La modulation de la migration des neurones excitateurs par le GABA suggère l'existence d'une communication précoce portée par les neurotransmetteurs, entre les deux types neuronaux. Si les interneurones expriment des récepteurs pour le GABA et le glutamate (voir chapitre 2), l'existence d'une modulation de la migration interneuronale passant par l'activation de ceux-ci n'a pas été étudiée. L'hypothèse de l'existence d'une modulation croisée des migrations des deux types neuronaux principaux du cortex cérébral peut être énoncée. Nous l'avons étudiée grâce à l'utilisation d'une lignée de souris transgénique exprimant la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur du gène de la GAD67 (Tamamaki et al., 2003), enzyme de synthèse majoritaire du GABA.

Grâce à ces souris, nous avons décrit les voies migratoires des interneurones à destination de l'hippocampe et identifié une voie migratoire majoritaire, en étroite interaction avec les cellules de Cajal-Retzius de la zone marginale. Arrivés au sein de l'hippocampe, les interneurones s'éloignent de la zone marginale pour s'engager à proximité de la future couche pyramidale.

Nous avons ensuite étudié la migration des interneurones hippocampiques sur cultures organotypiques d'explants cortico-hippocampiques. La migration de ces neurones, suivie pendant trois jours, est modulée par le glutamate agissant par l'intermédiaire de récepteurs AMPA, mais pas par l'intermédiaire de récepteurs NMDA, ni par le GABA.

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

Development/Plasticity/Repair

Glutamate Acting on AMPA But Not NMDA Receptors Modulates the Migration of Hippocampal Interneurons

Jean-Bernard Manent, Isabel Jorquera, Yehezkel Ben-Ari, Laurent Aniksztejn, and Alfonso Represa
Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 29, 13273 Marseille, France

Paracrine GABA and glutamate acting, respectively, on $GABA_A$ and NMDA receptors modulate the migration of hippocampal pyramidal cells. Using corticohippocampal organotypic explants from glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)–enhanced green fluorescent protein (EGFP) knock-in embryos, we now report that, in contrast to pyramidal neurons, the blockade of AMPA but not NMDA receptors exerts important actions on the migration of GABAergic interneurons. In addition, the blockade of $GABA_A$ receptors fails to modify the migration rates of GABAergic interneurons. Immunohistochemical analyses of GAD67–EGFP embryos (from embryonic day 14 to birth) reveal that interneurons colonize the hippocampal primordium by embryonic day 15. At that stage, the hippocampal primordium is already composed of pioneer glutamatergic neurons, including (1) Cajal-Retzius cells, immunopositive to calretinin and reelin, and (2) other presumptive pioneer pyramidal cells that are immunopositive to βIII-tubulin and vesicular glutamate transporter 3 and immunonegative to GABA or GAD67. Therefore, the migrations of pyramidal neurons and GABAergic interneurons are cross-modulated: glutamate released from pioneer glutamatergic neurons facilitates the migration of GABAergic interneurons, which in turn would release GABA, facilitating the migration of glutamatergic neuroblasts. This general sequence may provide a retroactive positive loop needed to construct the hippocampal network. It might constitute a primitive homeostatic mechanism in the developing brain that acts to balance GABA–glutamate contributions to network construction and activity.

Key words: **interneurons; migration; neurotransmitter; GABA; glutamate; AMPA; hippocampus**

Introduction

Neuronal migration is a fundamental process of the CNS construction because neurons often migrate long distances from their birthplace to their final destination layers. The two major neuronal subtypes of the adult cortex, i.e., glutamatergic principal cells and GABAergic interneurons, are generated at distinct germinal zones and navigate along distinct migratory pathways (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Marin and Rubenstein, 2003). Principal cells arise from the germinal zones lining the ventricle and migrate radially, following a relatively direct glial pathway to their destination layer into the developing cerebral cortex and hippocampus. Interneurons that are generated in the germinal zones of the basal ganglia primordium, i.e., the medial, lateral, and caudal ganglionic eminences, navigate tangentially into the developing cerebral cortex, covering long distances (for review, see Kriegstein and Noctor, 2004). The complex interneuronal migratory pathways within the neocortex have been investigated using dye labeling (de Carlos et al., 1996; Lavdas et al., 1999; Jimenez et al., 2002; Ang et al., 2003), cultures of embryonic explants (Anderson et al., 1997, 2001; Polleux et al., 2002), grafting experiments (Wichterle et al., 2001; Nery et al., 2002), focal electroporation with fluorescent protein expression vector (Yozu et al., 2005), transgenic mice (Pleasure et al., 2000), or glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)–enhanced green fluorescent protein (EGFP) knock-in (KI) mice (Tamamaki et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Recent studies revealed that migrating interneurons navigate along two main cortical streams: (1) subventricular zone (SVZ) and lower intermediate zone (IZ), and (2) marginal zone (MZ) and cortical subplate. They also migrate radially to reach their final destination layers [undergoing pial-oriented migration or ventricle-oriented migration (Nadarajah et al., 2002)] or obliquely between the main routes (Tanaka et al., 2003). However, the entry and migration pathways of interneurons within the hippocampus remain to be investigated.

Birthdating analyses (Stanfield and Cowan, 1979; Bayer, 1980; Soriano et al., 1989; Manent et al., 2005) indicate that both hippocampal neuronal subtypes, principal cells and interneurons, originate during a relatively large period of gestation [from embryonic day 12 (E12) to E18]. This implies that tangentially (ventrally originated) migrating cells encounter and assemble with radially migrating cells and pioneer neurons originated from the periventricular neuroepithelia. Both types of migration being essentially coexistent, it is likely that both cell types work together to form the proper time-dependent inside-out laminar gradients and yield to an equilibrated structure in terms of numbers of each

Received Dec. 2, 2005; revised April 12, 2006; accepted April 16, 2006.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Conseil Régional Provence-Alpes-Côte-d'Azur, and the Fondation Française pour la Recherche sur l'Epilepsie. J.-B.M. received financial supports from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie and from the Ligue Française Contre l'Epilepsie. We are grateful to Drs. K. Obata and K. Vogt for kindly providing GAD67-EGFP knock-in mice and Drs. A. Goffinet, S. El Mestikawy, and G. Rougon for the generous gift of antibodies. We also thank T. Bourqua, C. Pellegrino, and E. Buhler for technical assistance.

Correspondence should be addressed to Alfonso Represa, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 29, Campus de Luminy, Boite Postale 13, 13273 Marseille, France. E-mail: represa@inmed.univ-mrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1033-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/260001-●$15.00/0

respective cell type. One of the best illustrated communication between neurons relies on specific neurotransmitters (mainly GABA and glutamate) and receptors subtypes (mainly $GABA_A$ and NMDA receptors), which have been shown to modulate the migration of different neuronal subtypes, including, among others, cerebellar granule cells (Komuro and Rakic, 1993, 1998) and cortical (Behar et al., 1998, 1999, 2000; Hirai et al., 1999; Kihara et al., 2002) and hippocampal (Manent et al., 2005) pyramidal cell neuroblasts. These observations stress the notion that ambient GABA (normally released from migrating interneurons) might modulate the migration of glutamatergic neurons. Whether GABA and/or glutamate modulate the migration of interneurons remains unclear. Previous reports have suggested that migrating cortical interneurons express functional $GABA_A$ (Metin et al., 2000; Soria and Valdeolmillos, 2002), $GABA_B$ (Lopez-Bendito et al., 2003), and AMPA (Metin et al., 2000; Poluch et al., 2001; Soria and Valdeolmillos, 2002) receptors, but not NMDA receptors [(Metin et al., 2000) (but see Soria and Valdeolmillos, 2002)]. A blockade of $GABA_B$ receptors results in an accumulation of tangentially migrating neurons in the ventricular/subventricular zones of cortical explants, but the mechanisms of this action are presently not known (Lopez-Bendito et al., 2003). Interneuronal migration might also be modulated via AMPA receptor activation, as suggested by previous studies showing that migrating interneurons of the neocortical IZ express AMPA receptors (Metin et al., 2000) and that AMPA receptor activation affects the length of their processes (Poluch et al., 2001) as well as their GABA content (Poluch and Konig, 2002). However, the roles of $GABA_A$, AMPA, and NMDA receptors on interneuronal migration have not been completely elucidated.

Using corticohippocampal explants from GAD67–EGFP knock-in embryos, we have now investigated whether GABA and glutamate modulate the migration of GABAergic interneurons. We report that AMPA receptor blockade prevents the migration of GAD67–EGFP interneurons, which fail to populate the hippocampal primordium. In contrast to pyramidal neuron migration, the blockade of neither $GABA_A$ nor NMDA receptors produces any significant effect on interneuronal migration. We conclude that different modes of migration (radial vs tangential) involving different cell types (principal pyramidal cells vs interneurons) are regulated throughout different mechanisms and suggest that glutamatergic and GABAergic neurons modulate their migration in a synergistic and cooperative manner.

Materials and Methods

Animals. Experiments were performed on E14–E17 mice embryos, from GAD67–EGFP knock-in mice, kindly provided by Dr. K. Obata (●●●) (Tamamaki et al., 2003). The GAD67–EGFP embryos were selected from the wild-type nonfluorescent littermates under a binocular microscope equipped with appropriate lamps and filters. All experimental procedures were performed in agreement with the European Union and French legislations concerning the animal care and use.

Pharmacological agents and antibodies. Pharmacological agents used in culture were as follows: 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxaline (CNQX), (5*S*,10*R*)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801), 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*f*]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX), 6-imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6*H*)-pyridazinebutanoic acid hydrobromide (gabazine), D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (d-APV), and bicuculline (all obtained from Tocris Cookson, Bristol, UK).

Primary antibodies were as follows: mouse monoclonal, anti-βIII-tubulin (1:500; Sigma, St. Louis, MO), anti-$GABA_A$ β chain (1:200; Chemicon, Temecula, CA), anti-GAD67 (1:400; Chemicon), anti-GFP (1:2000; Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-nestin (1:1000; Becton Dickinson, Mountain View, CA), anti-reelin (G10, 1:1000; a generous gift of Dr. A. Goffinet, ●●●), anti-vimentin (1:100; Sigma), anti-polysialic acid (PSA) (1:2; kindly provided by Dr. Rougon, ●●●); rabbit polyclonal, anti-calretinin (1:2000; Swant, Bellinzona, Switzerland), anti-GABA (1:500; Sigma), anti-GFAP (1:200; Sigma), anti-GFP (1:3000; Invitrogen), anti-glutamate receptor subtype 1 (GluR1) (1:600; Chemicon), anti-NR1 (1:200; Chemicon), anti-NR2A/B (1:400; Chemicon), anti-vesicular glutamate transporter 1 (vGlut1) (1:5000; SySy, Göttingen, Germany), anti-vGlut2, and anti-vGlut3 [both at 1:1000, a generous gift from Dr. S. El Mestikawy, ●●● (Gras et al., 2005)]; guinea pig anti-doublecortin (1:2500; USBiological, Swampscott, MA); and rat anti-bromodeoxyuridine (BrdU) (1:50; Harlan Sera-Lab, Loughborough, UK).

Secondary antibodies were as follows: donkey anti-mouse conjugated with FITC (1:200); goat anti-mouse conjugated with Texas Red (1:200); donkey anti-rat conjugated with FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA); goat anti-rabbit or anti-guinea pig conjugated with cyanine 3 (1:200); and goat anti-rabbit conjugated with Alexa 488 (1:200) (Invitrogen).

Corticohippocampal organotypic slice culture. Pregnant animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (7%; Sigma) or killed by cerebral dislocation. Embryos were removed by cesarean section, and GAD67–EGFP embryos were selected as described above. Their brains were then removed and placed into Petri dishes containing cold PBS supplemented with glucose (30%; Sigma) and penicillin–streptomycin (50 mg/ml; Invitrogen). After separation of the two hemispheres, they were cut into 350–400 μm coronal slices using a tissue chopper (McIlwain; Campden Instruments, Leicester, UK), and slices were collected into 35 mm Petri dishes containing culture medium (MEM, 10% horse serum, and 25 μg/ml insulin). Meninges were gently removed, and corticohippocampal slices were prepared under a dissecting microscope, with the help of microtweezers and spatula. Slices were cultivated onto the membrane of Millicell-CM inserts (Millipore, Bedford, MA), in six-well plates containing 1 ml of culture medium per well, according to the protocol developed by Stoppini et al. (1991), adapted to embryonic tissues. Three corticohippocampal slices per inserts were arranged flat onto the membrane, and the excess of culture medium was removed. The six-well plates were kept for 3 d *in vitro* (DIV) at 37°C with 5% CO_2 and 95% air, in the presence/absence of pharmacological agents (see above). For cell proliferation and cell survival assay, culture medium was supplemented with BrdU (for 2 h before fixation of the slices, 50 μg/ml; Sigma) and propidium iodide (1 μl/ml; Sigma), respectively (supplemental data, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Imaging of living slices was performed daily on a Nikon (Tokyo, Japan) Diaphot inverted microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera and photomicrographs were digitized in .tiff format using the built-in software Nikon ACT-1. In addition, a few hippocampal slices (acute slices or cultured for 24 h) were imaged on a Zeiss (Oberkochen, Germany) confocal microscope (LSM 510), using a 10× objective, for up to 140 min. Images of the superficial migratory stream were taken every 10 min, and stacks were reconstructed from 12 optical sections (60.8 μm thickness) using the built-in software LSM Image.

Immunohistochemistry on sections. Pregnant animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (7%; Sigma) or killed by cerebral dislocation. Briefly, embryos were removed by cesarean section, and GAD67–EGFP embryos were selected as described above. Their brains were then removed and maintained overnight into the fixative solution (4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS or 2% glutaraldehyde for GABA staining). After washes in PBS, brains were embedded in agarose and cut coronally with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany). Sections were permeabilized for 10 min at room temperature in PBS–Triton X-100 (0.1%)–goat serum (5%). For BrdU staining, the permeabilization step was followed with a 20 min incubation in PBS–2N HCl at 45°C. After permeabilization, slices were washed three times in PBS and incubated overnight at room temperature with primary antibodies diluted in PBS–Triton X-100 (0.1%)–goat serum (5%). The slices were rinsed three times in PBS and were then incubated 2 h at room temperature in appropriated secondary antibodies, used separately for double immunolabelings. After three final washes in PBS, slices were

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

mounted on glass slides and coverslipped in Gel Mount (Biomedia, Foster City, CA). Slices were examined on a Zeiss LSM 510 confocal microscope using 5×, 10×, 20×, and 63× objectives, and photomicrographs were digitized using the built-in software LSM image.

Quantitative analysis of migrated cells. Photomontages were performed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA). Corticohippocampal slices were reconstructed, the somata of migrated cells located into the hippocampal primordium were pointed by black dots, and quantitative analyses (cell densities) were performed using the analysis software NIH ImageJ 1.33d (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). All quantitative analyses were performed using stereological methods. The normality of the data distribution was checked using SigmaStat (Systat Software, Port Richmond, CA), and the statistical significance was assessed using appropriate tests.

Results

Tangentially migrating GAD67–EGFP interneurons populate the hippocampal primordium by E15, navigating along glutamate-enriched regions

Although the interneuronal migratory pathways within the neocortex have been well described (see Introduction), little is known concerning the migration of these neurons toward and within the hippocampal complex. To investigate this issue, we performed immunohistological analyses on sections from GAD67–EGFP KI embryos, from E14 to E17. At E14 (Fig. 1*A*), as described previously (Tanaka et al., 2003), migrating interneurons clearly formed two distinct migratory pathways within the cortical wall: one superficial, within the MZ and the cortical subplate, and the other, more important, in the lower IZ and SVZ. At that stage, we observed a few pioneer GAD67–EGFP interneurons migrating toward the hippocampal primordium. They navigated along a superficial migratory stream in the retrosplenial cortex and subicular area (Fig. 1*A*, 1). At E15 (Figs. 1*B*, 2*C*), migrating interneurons clearly populated the hippocampal primordium; they distributed within the subiculum and CA1 fields and coursed mainly a major migratory route in clear continuity with the cortical superficial stream. In contrast, the deeper cortical stream was interrupted at the junction between neocortex and subiculum (Figs. 1*B*, 2*C*). By E16 (Fig. 1*C*), interneurons colonizing the hippocampus via the superficial migratory stream now reached the CA3 field. However, the thinner deep migratory stream reached the CA1 field lining close to the ventricular zone but stopped by the border of CA3. Migrating interneurons reached the dentate gyrus primordium throughout the superficial migratory stream by E17 (data not shown). Quantitative analysis of cell densities evaluated in both the superficial and deep migratory streams clearly indicated that interneurons reach the hippocampus first through a superficial migratory stream and then through both superficial and deep migratory streams. The density of interneurons was higher in the superficial stream compared with the deeper stream (Fig. 1*D*). In conclusion, although interneurons migrate within the neocortex mainly along a deeper pathway following the subventricular zone and the lower intermediate zone, they invade the hippocampus throughout a mainly superficial path below the marginal zone.

To confirm that GAD67–EGFP-positive cells represent tangentially migrating neurons, double immunostainings were performed with specific antibodies of radial glia (nestin) and migrating neurons (doublecortin and PSA). At any embryonic stage analyzed, GAD67–EGFP cells displayed the typical morphology of migrating neurons (small round-shaped cell body, branched leading process) and were clearly immunopositive to both doublecortin (Fig. 2*A*) and PSA (Fig. 2*B*). These cells ran below the marginal zone crossing nestin-positive extensions (radial glial

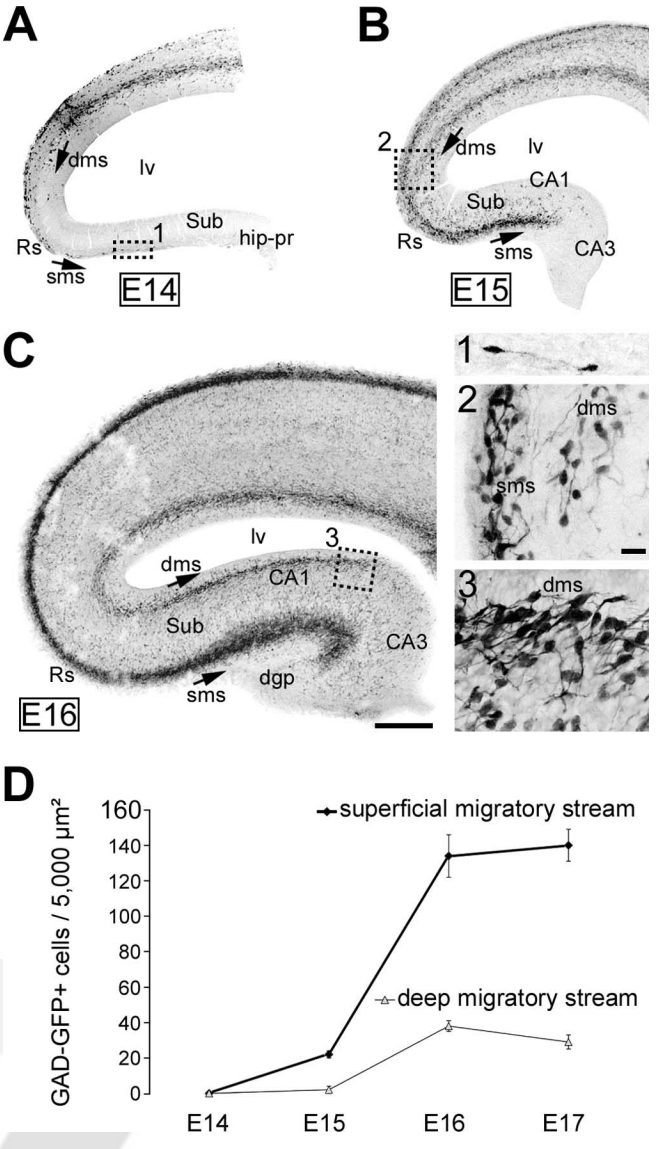


Figure 1. Interneuronal migratory pathways: toward and within the hippocampal primordium in GAD67–EGFP KI mice. ***A–C***, Confocal photomicrographs of E14 (***A***), E15 (***B***), and E16 (***C***) coronal sections from GAD67–EGFP embryos, stained with antibodies against GFP (in black). Squares were enlarged in 1–3, respectively. GAD67–EGFP interneurons migrating tangentially within the neocortical wall navigate along two major migratory routes at E14: (1) a superficial migratory stream, lining the cortical marginal zone; and (2) a deep migratory stream, following the cortical subventricular zone and lower marginal zone. ***A***, Pioneer interneurons migrating to the hippocampal primordium (square shown enlarged in 1) follow the superficial migratory stream. ***B***, Migrating interneurons reach the CA1 field at E15 exclusively through the superficial migratory stream; the deep migratory stream stops at this age by the border of the subicular area (enlarged in 2). ***C***, Migratory interneurons reach the CA3 field at E16 again through the superficial stream; the dentate gyrus is not yet colonized. The deep migratory stream stops at this age by the border of CA2–CA3 (enlarged in 3). dgp, Dentate gyrus primordium; dms, deep migratory stream; hip-pr, hippocampal primordium; lv, lateral ventricle; Rs, rostral migratory stream; sms, superficial migratory stream; Sub, subiculum. Scale bars: ***A–C***, 100 μm; 1–3, 20 μm. ***D***, Quantitative analysis of GAD67–EGFP positive cell densities in the superficial and deep migratory streams in the hippocampal primordium as a function of age. Analyses were performed at the front of the migratory streams, in three different sections from the dorsal hippocampus from E14 to E17 GAD67–EGFP KI embryos ($n = 3$ hippocampi per age). Note that the cellular density is higher in the superficial migratory stream and that cells traveling through the deep migratory stream reach the hippocampal primordium later than those of the superficial stream.

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

extensions) (Fig. 2*C*), the majority of leading process being oriented perpendicularly to radial glial extensions. In addition, few GAD67–EGFP cells could be observed to emerge from the superficial migratory stream and to follow radial glial extensions (Fig. 2*C*), suggesting that, in the hippocampus as in the neocortex, GABAergic neurons change their migration mode from tangential to radial to colonize the hippocampal plate. To further stress the migrating activity of GAD67–EGFP cells in the hippocampal primordium, time-lapse analyses were performed on acute or cultured E15 slices (Fig. 2*D*). Experiments were repeated five times. Slices were recorded for up to 140 min using a confocal microscope. Leading processes displayed a quite dynamic behavior, with growth cones motility, extensions, and retractions. Rapid extensions of leading processes were followed by somal translocations. These observations strongly indicate that hippocampal GAD67–EGFP cells in the superficial migratory stream are tangentially migrating neurons.

To elucidate the cellular composition of the interneuronal migratory pathways within the hippocampal primordium, counterstainings with a Nissl dye (Neurotrace) or immunostainings with specific markers of Cajal-Retzius cells (reelin and calretinin), glutamatergic neurons (vGlut1, vGlut2, and vGlut3), and interneurons (GABA and GAD67) were performed on E15 slices from GAD67–EGFP KI embryos. Nissl stainings (Fig. 3*A–C*) revealed that the GAD67–EGFP interneurons of the hippocampal superficial migratory stream travel at the junction between the marginal zone and the hippocampal plate in the subicular area (Fig. 3*B*) and clearly invade the hippocampal plate in the CA1 field (Fig. 3*C*). Cells located into the marginal zone were, as expected, immunopositive for calretinin (Fig. 3*D*,*E*) and reelin (Fig. 3*J*,*K*), two specific markers of the Cajal-Retzius cells. Tangentially migrating interneurons were observed to navigate below this layer of Cajal-Retzius cells, never invading the marginal zone. Furthermore, tangentially migrating interneurons were never found immunopositive for reelin or calretinin (Fig. 3*E*,*K*). We then analyzed the cellular composition of the hippocampal primordium. When the pioneer GAD67–EGFP interneurons invaded the hippocampal primordium, an important amount of βIII-tubulin-positive neurons were already present at the level of hippocampal plate of the presumptive CA1 and CA3 fields (Fig. 3*F*,*G*). These neurons were im-

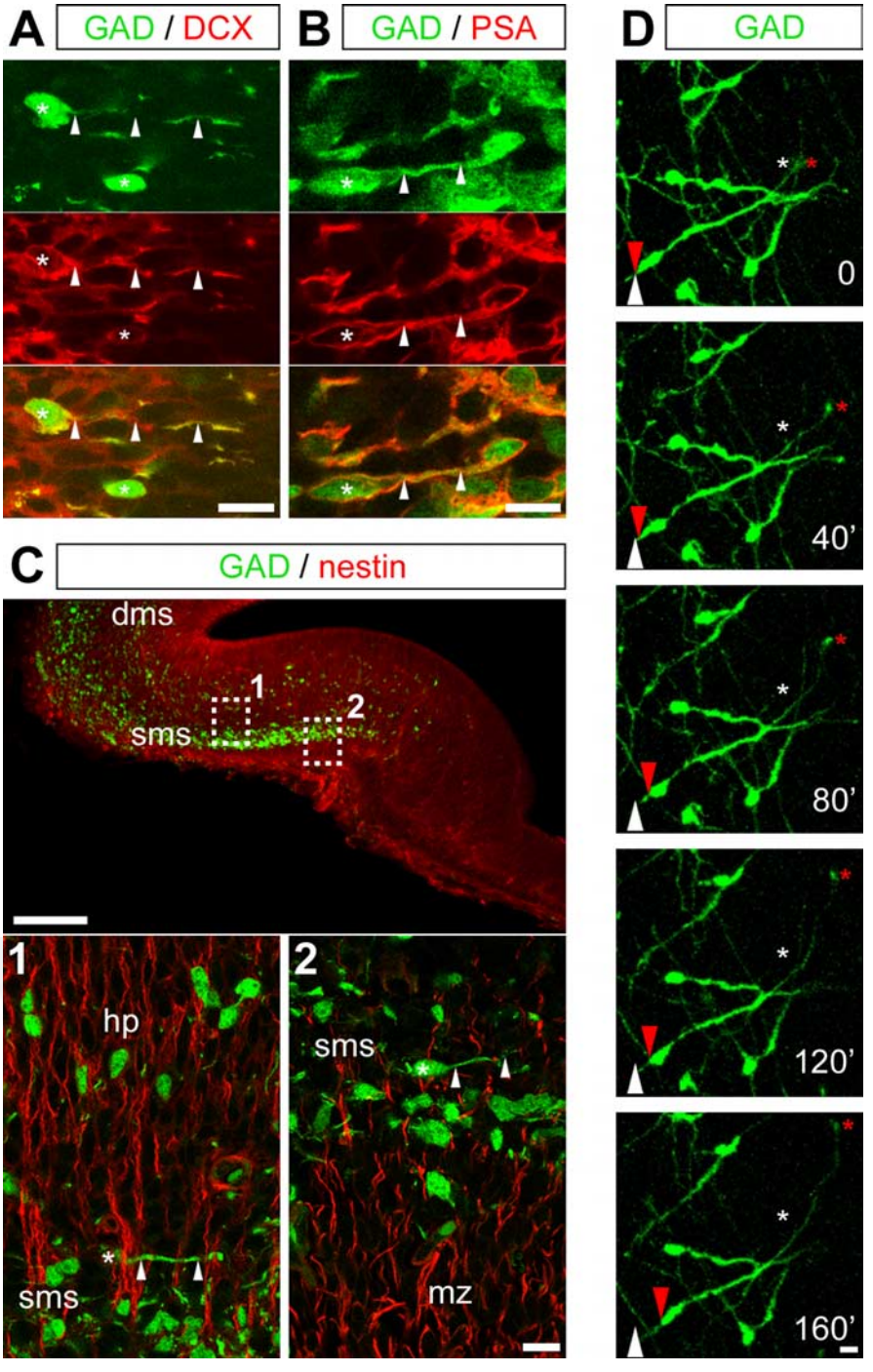


Figure 2. GAD67–EGFP cells are tangentially migrating neurons. ***A***, ***B***, Confocal photomicrographs (*z*-projections) of E15 coronal hippocampal sections double labeled with antibodies against GFP (green) and doublecortin (DCX; ***A***) and PSA (***B***) (red), two markers of immature migrating neurons. Merged images were shown in the bottom panels. Cell bodies are indicated by asterisks, and processes are indicated by arrowheads. ***C***, Confocal photomicrographs (*z*-projections) of E15 coronal hippocampal sections double labeled with antibodies against GFP (green) and nestin (red), which here stains radial glia. Squares 1 and 2 were enlarged in the bottom panels. In the superficial migratory stream, GAD67–EGFP-positive neurons display the typical morphology of migrating neuroblasts, with a leading process arranged tangentially to the orientation of radial glial processes. In the hippocampal plate, GAD67–EGFP-positive neurons appear in contrast to follow radial glial extensions, thus suggesting that, in the hippocampal complex, interneurons change their mode of migration from tangential to radial, to colonize deeper hippocampal layers. ***D***, Time-lapse analysis of an E15 coronal hippocampal section from GAD67–EGFP KI mice. This section was incubated for 1 DIV before analysis as indicated in Material and Methods. Each time point (every 40 min) corresponds to a *z*-projection of 12 focal planes (60.8 μm thickness). Red arrows and asterisks point to moving cell bodies and terminal tips, respectively. White arrows and asterisks point to the initial position of these elements. dms, Deep migratory stream; hp, hippocampal plate; mz, marginal zone; sms, superficial migratory stream. Scale bars: ***A***, ***B***, bottom in ***C***, ***D***, 10 μm; top in ***C***, 100 μm.

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

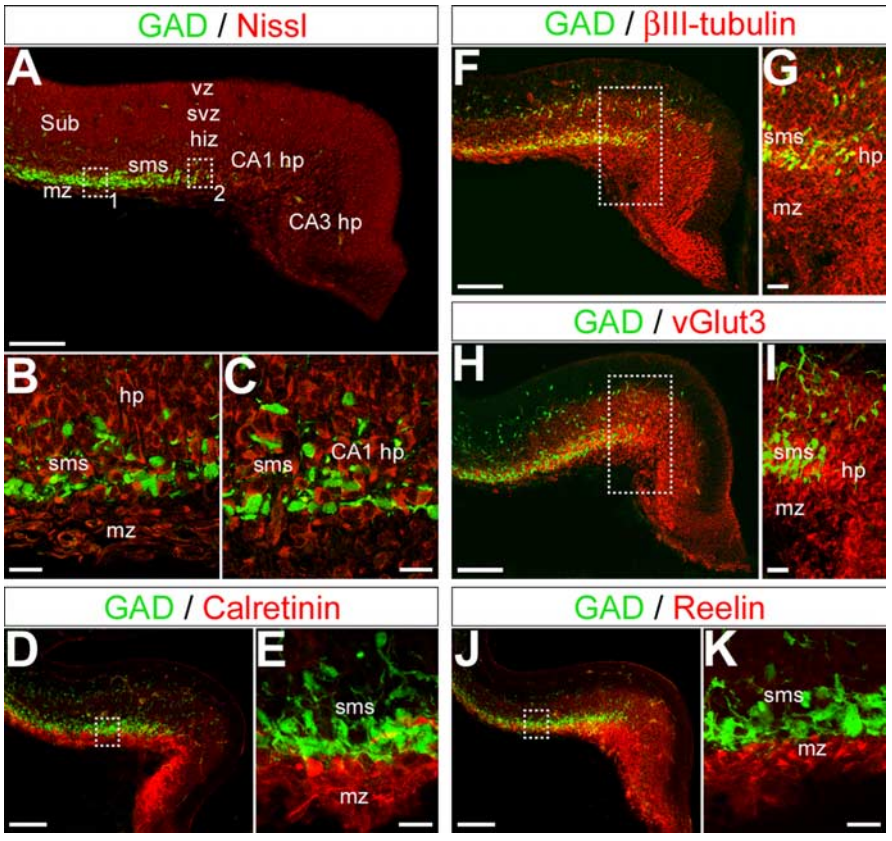


Figure 3. GAD67–EGFP interneurons navigate within the hippocampal primordium, which is composed of pioneer glutamatergic neurons. ***A–C***, Confocal photomicrographs (single optical sections) of an E15 coronal hippocampal section immunostained for GFP (green) and Nissl counterstain (Neurotrace, deep red). Squares labeled 1 and 2 in ***A*** are enlarged in ***B*** and ***C***, respectively. GAD67–EGFP interneurons form a band of migrating cells below the marginal zone and intermingle with "neuronal" cells contributing to form the hippocampal plate in the subiculum (***B***) and the hippocampal primordium (***C***). ***D–K***, Confocal photomicrographs (*z*-projections) of E15 coronal hippocampal sections double labeled with antibodies against GFP (green) and antibodies to calretinin (***D***, ***E***), βIII-tubulin (***F***, ***G***), vGlut3 (***H***, ***I***), and reelin (***J***, ***K***) (red). Squares in ***D***, ***F***, ***H***, and ***J*** are enlarged in ***E***, ***G***, ***I***, and ***K***, respectively. Note that the superficial migratory stream forms a band adjacent to the marginal zone composed of cells immunopositive to reelin and calretinin, two markers of the glutamatergic Cajal-Retzius cells. Antibodies against βIII-tubulin stains cells in the marginal zone, in the superficial migratory stream and the hippocampal plate. Antibodies against vGlut3 reveal the presence of an intense immunostaining of the hippocampal intermediate zone, plate, and subplate. However, these antibodies do not stain any GAD67–EGFP-positive cell. Therefore, GFP cells intermingle with cells immunopositive to βIII-tubulin and to vGlut3 within the hippocampal plate–subplate. hiz, Hippocampal intermediate zone; hp, hippocampal plate; mz, marginal zone; sms, superficial migratory stream; Sub, subiculum; svz, subventricular zone; vz, ventricular zone. Scale bars: ***A***, ***D***, ***F***, ***H***, ***J***, 100 μm; ***B***, ***C***, ***E***, ***G***, ***I***, ***K***, 20 μm.

munonegative for GAD67 (Fig. 3*F*,*G*) and GABA (data not illustrated). Furthermore, these cells were immunopositive for the vesicular glutamate transporter vGlut3 (Fig. 3*H*,*I*), strongly suggesting that these neurons were glutamatergic pioneer neurons, generated before E15; these cells are likely to be pioneer pyramidal cells that were generated in mice by E14 or earlier (Manent et al., 2005, their supplemental data). No staining was observed with vGlut1 or vGlut2 antibodies (data not shown).

Thus, pioneer tangentially migrating interneurons on their long journey to the hippocampal primordium mainly navigate along a superficial migratory stream, lining the marginal zone containing Cajal-Retzius cells. Once they reach the hippocampal primordium, migrating interneurons change direction to invade the developing hippocampal plate, composed of pioneer pyramidal neurons. These migratory pathways correspond to glutamate-enriched areas: (1) glutamatergic Cajal-Retzius cells of the marginal zone (del Rio et al., 1995; Hevner et al., 2003) and (2) pioneer glutamatergic neurons of the developing CA fields. We hypothesized that this "glutamatergic environment" is required for an appropriate interneuronal migration. In addition, GABA released from GABAergic migrating neurons might contribute to their migration in an "autocrine–paracrine" manner, as shown previously in the rostral migratory pathway (Bolteus and Bordey, 2004).

Glutamate acting through AMPA, but not NMDA, receptors modulates the migration of GAD67–EGFP interneurons

To investigate whether transmitters, and in particular glutamate, play a role on interneuronal migration, E15 organotypic slices from GAD67–EGFP KI embryos were maintained for 3 DIV in the presence of antagonists for GABA and glutamate receptors. GAD67–EGFP interneurons in organotypic slice cultures were allowed to migrate to the hippocampal primordium in a culture medium supplemented with pharmacological agents. Time-lapse analyses were performed to evaluate the migration of GFP cells, and quantifications were performed daily from 1 to 3 DIV on reconstructed slices (Fig. 4). F4

In the absence of any pharmacological treatment, the density of GAD67–EGFP migrated interneurons was gradually increased at the level of the hippocampal primordium (from 0.16 ± 0.16 cells per surface unit at 1 DIV to 0.64 ± 0.39 at 2 DIV and 1.03 ± 0.55 at 3 DIV; $n = 9$ experiments, 1267 cells) (Fig. 4*B*), indicating that neuronal migration occurred and was robust in organotypic slice cultures. In addition, short time-lapse imaging on cultivated slices taken after 1 DIV revealed the presence of GAD67–EGFP interneurons eliciting leading process elongation and somal translocation, two typical features of migrating interneurons (Fig. 2*D*).

When GAD67–EGFP interneurons were allowed to migrate in the presence of 30 μM CNQX, an antagonist of the AMPA/KA receptors, the time-dependent increase in cell density at the level of the hippocampal primordium was importantly modified compared with the control condition: at 3 DIV, the density of migrated interneurons in the hippocampal primordium was reduced from 1.03 ± 0.55 cells per surface unit in the control condition to 0.34 ± 0.21 cells per surface unit after CNQX ($p < 0.01$; $n = 6$ experiments, 301 cells) (Fig. 4*B*,*C*). Similar results were obtained after 3 DIV in the presence of 10 μM NBQX, an antagonist of AMPA receptors (0.45 ± 0.23 cells per surface unit; $p < 0.05$; $n = 6$ experiments, 396 cells) (Fig. 4*C*).

The density of migrated interneurons in the hippocampal primordium was not significantly decreased after 3 DIV in the presence of the $GABA_A$ receptors antagonists bicuculline (50 μM) or gabazine (10 μM) compared with the control condition (0.61 ± 0.43 cells per surface unit after bicuculline, $n = 6$ experiments, 491 cells; 0.59 ± 0.29 cells per surface unit after gabazine, $n = 6$ AQ: H

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

experiments, 529 cells) (Fig. 4*B*,*C*). The density of migrated interneurons in the hippocampal primordium was also not significantly decreased after 3 DIV in the presence of the NMDA receptors antagonists MK801 (10 μM) and d-APV (80 μM) compared with the control condition (0.69 ± 0.46 cells per surface unit after MK801, $n = 6$ experiments, 671 cells; 0.62 ± 0.49 cells per surface unit after D-APV, $n = 6$ experiments, 454 cells) (Fig. 4*B*,*C*).

Furthermore, the overall distribution of migrated interneurons within the hippocampal primordium was not significantly modified after $GABA_A$ or NMDA receptor antagonist treatment compared with the control condition (data not illustrated).

Importantly, pharmacological treatments influenced neither cell proliferation nor cell survival, because the density of $BrdU^+$ cells at the level of the ganglionic eminences, as well as the number of propidium iodide-positive cells in the hippocampal primordium were not significantly different from the control condition (supplemental data and Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Thus, antagonizing the effects of glutamate acting through AMPA receptors impaired interneuronal migration in organotypic slice cultures from GAD67–EGFP KI embryos. In contrast, antagonizing the effects of glutamate acting through NMDA receptors or the effects of GABA acting through $GABA_A$ receptors did not significantly impair migration. These results suggest that only glutamate acting through AMPA receptors play a role in the modulation of interneuronal migration.

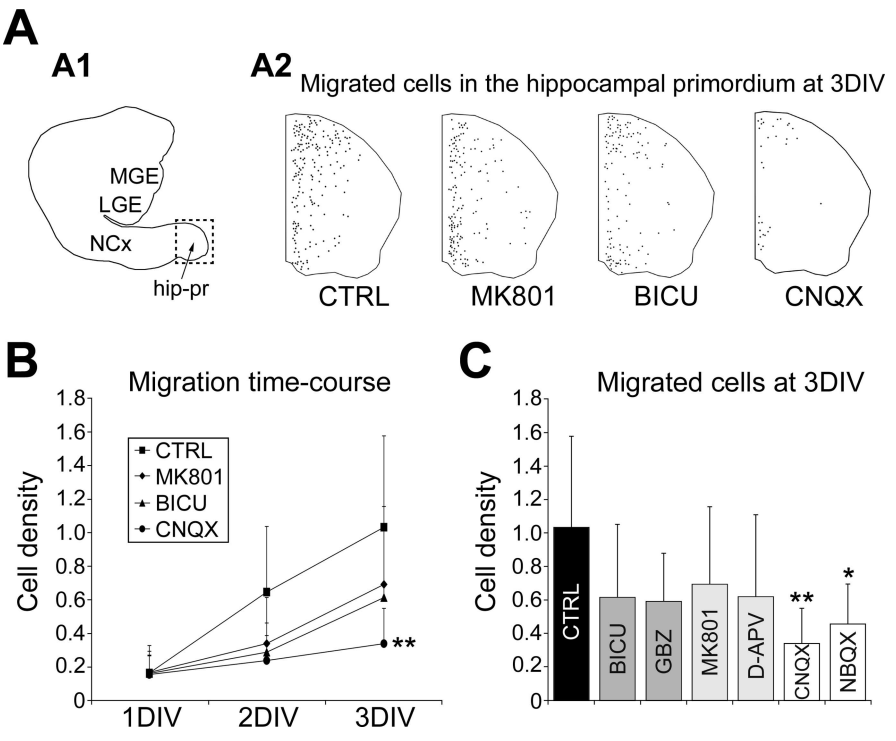


Figure 4. AMPA receptor antagonists, but not $GABA_A$ or NMDA receptor antagonists, perturb the migration of GAD67–EGFP interneurons to the hippocampal primordium. ***A1***, Reconstruction of an organotypic explant from E15 GAD67–EGFP KI mice after 3 DIV. The preparation includes the ganglionic eminences, the neocortex, and the hippocampal primordium (square, shown enlarged in ***A2***). ***A2***, Reconstructions of hippocampal primordia from E15 GAD67–EGFP KI mice cultured for 3 DIV without any treatment [control condition (CTRL)] or in the presence of 10 μM MK801, 50 μM bicuculline (BICU), or 30 μM CNQX. Black dots represent GAD67–EGFP migrated interneurons. Note the important reduction in cell density after CNQX treatment. ***B***, Line plot illustrating (±SD) the time-dependent increase in cell density (cells per surface unit, arbitrary set to 3600 μm^2) at the level of the hippocampal primordium. Hippocampal sections were cultured for 3 DIV without any treatment [control condition (CTRL)] or in the presence of antagonists of $GABA_A$ [50 μM bicuculline (BICU)], NMDA (10 μM MK801), and AMPA (30 μM CNQX) receptors. Living slices were imaged daily for cell densities analyses. ***C***, Histogram illustrating (±SD) the density of GAD67–EGFP migrated cells (cells per surface unit, arbitrary set to 3600 μm^2) in the hippocampal primordium after 3 DIV without any treatment [control condition (CTRL)] or in the presence of antagonists of $GABA_A$ [50 μM bicuculline (BICU) or 10 μM gabazine (GBZ)], NMDA (10 μM MK801 or 80 μM d-APV), and AMPA (30 μM CNQX or 10 μM NBQX) receptors. Only AMPA receptor antagonists impair GAD67–EGFP cell migration. Mann–Whitney *U* test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ compared with the control. hip-pr, Hippocampal primordium; LGE, lateral ganglionic eminence; MGE, medial ganglionic eminence; NCx, neocortex.

Tangentially migrating GAD67–EGFP interneurons express AMPA, NMDA, and $GABA_A$ receptors

To analyze whether the absence of any migration defects during NMDA or $GABA_A$ receptor antagonist treatment was attributable to an absence of expression of these receptors by migrating interneurons, we performed immunohistological analyzes on hippocampal sections from E15 GAD67–EGFP KI embryos. As reported previously by Metin et al. (2000), for migrating interneurons of the neocortical intermediate zone, GAD67–EGFP interneurons migrating to the hippocampal primordium express the GluR1 subunit of the AMPA receptors (Fig. 5*A*,*B*). The GluR1 immunoreactivity was strictly restricted to the superficial interneuronal migration pathway (Fig. 5*A*), virtually decorating only tangentially migrating interneurons (Fig. 5*A*,*B*). Tangentially migrating interneurons were also immunoreactive for the $GABA_A$ receptors (Fig. 5*C*) and the NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptors (Fig. 5*D*,*E*). NR1 staining is rather ubiquitous and concerns GAD67–EGFP-positive and negative cells, whereas NR2A/B staining is more restricted to GAD67–EGFP neurons. Because NR2A mRNA only became detectable after birth (Monyer et al., 1994), this latter immunostaining likely represented NR2B subunit expression.

Therefore, the lack of effect of $GABA_A$ and NMDA receptor blockade on the tangential migration of interneurons is not attributable to an absence of NMDA or $GABA_A$ receptors.

Discussion

In the present study, we report that GABAergic interneurons colonize the hippocampus mainly via a superficial pathway paved with pioneer glutamatergic neurons. We show that AMPA receptor blockade impairs hippocampal interneuronal migration, whereas NMDA and $GABA_A$ receptor blockade fail to induce any major change. These data contrast with our previous report (Manent et al., 2005) demonstrating that hippocampal pyramidal cell migration is modulated by mainly $GABA_A$ and, to a lesser degree, NMDA receptors, but not AMPA. We propose the following: (1) the migration of distinct neuronal subtypes, using specific modes of migration and migratory pathways, is modulated through different mechanisms; and (2) glutamatergic and GABAergic neurons modulate their migration in a synergistic and cooperative manner, constituting one of the first homeostatic mechanisms operating in the developing brain.

balt6/zns-neusci/zns-neusci/zns-orig/zns1811-06a | doylel | S=4 | 5/5/06 | 16:24 | Art: 1217455 | Input-YY(v)

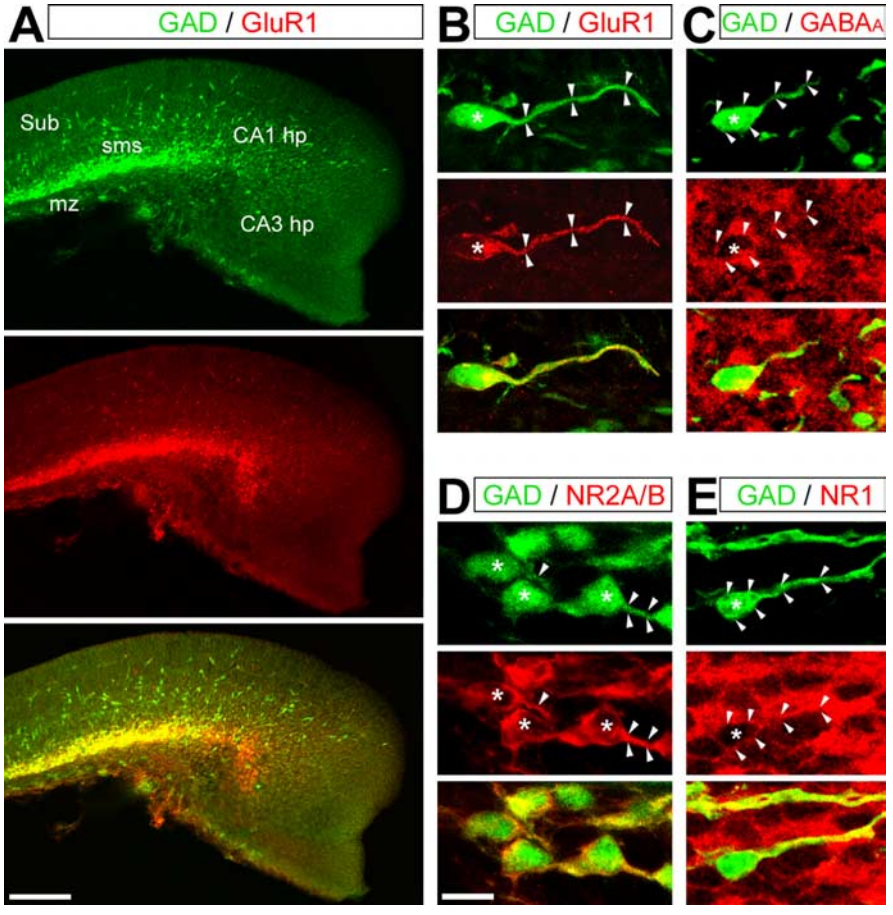


Figure 5. GAD67–EGFP interneurons express AMPA, NMDA, and $GABA_A$ receptors. Confocal photomicrographs (*z*-projections) of E15 hippocampal sections double labeled with antibodies against GFP (green) and against different receptor subunits (red). Merged images are presented in the bottom panels. The asterisks indicate cell nuclei, and the arrowheads delineate somata and leading processes. ***A***, ***B***, Immunostaining for GFP and the GluR1 subunit of the AMPA receptor. Note that the GluR1 staining is strictly restricted to GAD67–EGFP migrating interneurons, decorating the somata and the leading processes. ***C***, Immunostaining for GFP and the β-chain of the $GABA_A$ receptor. $GABA_A$ receptor staining is relatively ubiquitous and present at the somata and leading processes of GAD67–EGFP migrating interneurons. ***D***, ***E***, Immunostaining for GFP and the NR2A/B (***D***) and NR1 (***E***) subunits of the NMDA receptor. NR1 staining is rather ubiquitous and concerns GFP-positive and GFP-negative cells, whereas NR2A/B staining is more restricted to GAD67–EGFP neurons. Both stainings decorate the somata and leading processes of migrating interneurons. hp, Hippocampal plate; mz, marginal zone; sms, superficial migratory stream; Sub, subiculum. Scale bars: ***A***, 100 μm; ***B–E***, 20 μm.

Transmitters as developmental signals: diverse modulations and diverse modes of neuronal migration

In this report, tangential migration of interneurons in organotypic explants from GAD67–EGFP KI mice is reduced by AMPA but not NMDA or $GABA_A$ receptor blockade. Interestingly, Metin et al. (2000) have shown that AMPA receptors expressed by migrating interneurons in the neocortical IZ are highly permeable to calcium, because they apparently fail to express the GluR2 subunit. The activation of these calcium-permeable AMPA receptors might induce modifications in the intracellular calcium levels via a direct calcium influx through these channels and indirectly through the depolarization-mediated activation of voltage-dependent calcium channels. Therefore, the release of glutamate from adjacent Cajal-Retzius cells or pioneer pyramidal neurons would generate calcium signals. These intracellular calcium transients would result in the modification of cell motility, because changes in their frequencies have been shown to affect the rate of migration of cerebellar granule cells (for review, see Komuro and Kumada, 2005). However, it is more difficult to explain the absence of effects of $GABA_A$ and NMDA receptors blockade because migrating interneurons express $GABA_A$ and NMDA receptors (Soria and Valdeolmillos, 2002). Interestingly, patch-clamp analysis clearly shows that migrating interneurons of the neocortical IZ do not respond to NMDA application (Metin et al., 2000). In addition, currents evoked by $GABA_A$ receptor agonists (GABA and isoguvacine) induced rapidly desensitizing responses of small amplitude in these neurons. These data suggest that both NMDA and $GABA_A$ receptors would not be major contributors to calcium transients in migrating interneurons.

In contrast, the radial migration of hippocampal pyramidal cells is strongly modulated by $GABA_A$ and NMDA but not AMPA receptors (Behar et al., 1998, 1999, 2000; Hirai et al., 1999; Kihara et al., 2002; Manent et al., 2005). The lack of effect of AMPA receptor antagonists is attributable to the absence of operative AMPA receptors on migrating pyramidal cells (Manent et al., 2005), at least in the hippocampus. Thus, a major difference in the calcium signals is expected between pyramidal neurons and interneurons: the former operate by means of the $GABA_A$/NMDA synergy with the excitatory actions of GABA removing the voltage-dependent blockade of NMDA channels (Leinekugel et al., 1995). In contrast, in interneurons, this synergistic action is not operative; calcium signals would be generated via the direct depolarization through the activation of AMPA receptors by the released glutamate that directly triggers a calcium influx.

Data on the effects of transmitters on cell migration indicated contrasting effects depending on distinct neuronal subtypes. Thus, interneurons migrating from the anterior SVZ to the olfactory bulb display a characteristic "saltatory" mode of migration (Wichterle et al., 1997) mainly modulated by GABA (Bolteus and Bordey, 2004). These authors, however, proved that, in these neurons, $GABA_A$ receptor activation rather reduces the migration rate, whereas the blockade of these receptors with bicuculline enhances the migration rate, thus showing an opposite effect compared with radially migrating pyramidal cells in hippocampal explants (Manent et al., 2005). Interestingly, olfactory bulb interneurons express $GABA_A$ and then AMPA receptors but not NMDA receptors while migrating tangentially (Carleton et al., 2003); the expression of functional NMDA receptors was observed only when the cells reached the olfactory bulb and changed their mode of migration to a radial migration. It is thus plausible that tangential migration in the rostral migratory stream is modulated by $GABA_A$ and then eventually AMPA, whereas the radial migration in the olfactory bulb would be mediated by NMDA. These differences strongly suggest that the modulation of neuronal migration is time, stage, and population dependent.

Glutamatergic and GABAergic hippocampal neurons modulate their migration in a synergistic and cooperative manner: a hypothetical model for the orchestration of hippocampal construction (supplemental Fig. S2, available at www.jneurosci.org as supplemental material)

In adult networks, the equilibrium between the activity of GABAergic and glutamatergic neurons is essential for the generation of behavioral relevant patterns. Our present data strongly suggest that this coordination most likely starts at a very early stage. We propose as a working hypothesis that glutamatergic neurons modulate the migration of GABAergic interneurons (this report) and that GABA neurons modulate the migration of glutamatergic pyramidal cells (Behar et al., 1998, 2000; Manent et al., 2005).

Pioneer Cajal-Retzius cells (del Rio et al., 1995; Hevner et al., 2003) and glutamatergic pyramidal cells, which proliferate in the hippocampus from E12 (Manent et al., 2005, their supplemental data), provide an early source of glutamate in the hippocampal primordium. In addition, glial cells (by this period of life, radial glial cells) might also release glutamate (Angulo et al., 2004). The expression of functional glutamate transporters in embryonic hippocampus (Demarque et al., 2002) limits, however, the action of glutamate, and a close contact between migrating interneurons and glutamate-releasing cells is required (Metin et al., 2000). Tangentially migrating interneurons within the hippocampus follow a superficial pathway in close contact with vGlut3-immunopositive cells in the hippocampal plate and adjacent to the marginal zone, enriched in Cajal-Retzius cells. Migrating interneurons in the superficial migratory stream are in contrast far away from radial glia cell bodies (vimentin- and nestin-immunoreactive cells were rather localized in the ventricular–subventricular zone) and did not follow radial glial extensions. Radial glial cells might in contrast play a more pronounced role for radial migration, when interneurons leave their main migratory stream to follow radial glial extensions.

The unique source of GABA in the hippocampal primordium is the GABAergic migrating interneurons, because GABA antibodies stained only GAD67–EGFP cells in hippocampal sections. The effects of ambient GABA are likely to be facilitated by a weak clearance from the extracellular space attributable to a poor functional maturation of GABA transporters, at least of the main hippocampal GABA transporter GAT1 (Demarque et al., 2002). Accordingly to this, GABA might easily diffuse in the hippocampal complex and activate relatively distant cells. This would explain that GABA is able to modulate pyramidal cell migration from the subventricular zone, in which they are generated, to the hippocampal plate. The effects of GABA on $GABA_A$ receptors expressed by migrating pyramidal cells would be reinforced by the action of glutamate on NMDA receptors, via a coordinated cooperation between these two receptor types as that reported previously in neonatal hippocampal slices (Leinekugel et al., 1997). Thus, glutamate released from pioneer glutamatergic neurons would facilitate the migration of GABAergic interneurons, which in turn would release GABA, facilitating the migration of glutamatergic neuroblasts (supplemental Fig. S2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These cooperative effects would contribute to construct a balanced system in terms of time of arrival of new neurons and relative numbers of each neuronal subtypes, thus avoiding the requirement of a massive elimination of exceeding migrated cells. This notion also implies that perturbing one of the two neuronal subtypes during brain maturation would consequently result in an alteration of the second one. Interestingly, cortical heterotopias generated in rats exposed to methylazoxymethanol *in utero* (Chevassus-Au-Louis et al., 1998) or by RNA interference knockdown of doublecortin (Ramos et al., 2006) not only contain cortical pyramidal cells but GABAergic interneurons as well. Thus, heterotopias, constituted originally of pyramidal cells that failed to migrate radially to the cortical plate, also attract and retain migrating interneurons. Although speculative, it is tempting to suggest that the reciprocal interactions between glutamatergic and GABAergic systems are contributing with other factors to this cell population-dependent defect.

References

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278:474–476.

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128:353–363.

Ang Jr ES, Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. J Neurosci 23:5805–5815.

Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. J Neurosci 24:6920–6927.

Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with ^{3}H-thymidine autoradiography. J Comp Neurol 190:87–114.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. J Neurosci 18:6378–6387.

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. J Neurosci 19:4449–4461.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. Cereb Cortex 10:899–909.

Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J Neurosci 24:7623–7631.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. Nat Neurosci 6:507–518.

Chevassus-Au-Louis N, Rafiki A, Jorquera I, Ben Ari Y, Represa A (1998) Neocortex in the hippocampus: an anatomical and functional study of CA1 heterotopias after prenatal treatment with methylazoxymethanol in rats. J Comp Neurol 394:520–536.

de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. J Neurosci 16:6146–6156.

del Rio JA, Martinez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. Cereb Cortex 5:13–21.

Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca^{2+}- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. Neuron 36:1051–1061.

Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. Neuropharmacology 49:901–911.

Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. Brain Res Dev Brain Res 141:39–53.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushiki S (1999) Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 114:63–67.

Jimenez D, Lopez-Mascaraque LM, Valverde F, de Carlos JA (2002) Tangential migration in neocortical development. Dev Biol 244:155–169.

Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z, Sawada T (2002) Stimulation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuro-

nal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 138:195–198.

Komuro H, Kumada T (2005) Ca^{2+} transients control CNS neuronal migration. Cell Calcium 37:387–393.

Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260:95–97.

Komuro H, Rakic P (1998) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations. J Neurobiol 37:110–130.

Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci 27:392–399.

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. J Neurosci 19:7881–7888.

Leinekugel X, Tseeb V, Ben Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABAA activation induces Ca^{2+} rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. J Physiol (Lond) 487: 319–329.

Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben Ari Y, Khazipov R (1997) Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. Neuron 18:243–255.

Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z (2003) Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. Cereb Cortex 13:932–942.

Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. J Neurosci 25:4755–4765.

Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci 26:441–483.

Metin C, Denizot JP, Ropert N (2000) Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. J Neurosci 20:696–708.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron 12:529–540.

Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 3:423–432.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. Nat Neurosci 5:218–224.

Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. Nat Neurosci 5:1279–1287.

Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. Neuron 28:727–740.

Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. Development 129:3147–3160.

Poluch S, Konig N (2002) AMPA receptor activation induces GABA release from neurons migrating tangentially in the intermediate zone of embryonic rat neocortex. Eur J Neurosci 16:350–354.

Poluch S, Drian MJ, Durand M, Astier C, Benyamin Y, Konig N (2001) AMPA receptor activation leads to neurite retraction in tangentially migrating neurons in the intermediate zone of the embryonic rat neocortex. J Neurosci Res 63:35–44.

Ramos RL, Bai J, Loturco JJ (2006) Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. Cereb Cortex, in press. AQ: J

Soria JM, Valdeolmillos M (2002) Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. Cereb Cortex 12:831–839.

Soriano E, Cobas A, Fairen A (1989) Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. I. Regio superior and regio inferior. J Comp Neurol 281:586–602.

Stanfield BB, Cowan WM (1979) The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. J Comp Neurol 185:423–459.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Methods 37:173–182.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J Comp Neurol 467:60–79.

Tanaka D, Nakaya Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. Development 130:5803–5813.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. Neuron 18:779–791.

Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. Development 128:3759–3771.

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 25:7268–7277.

Supplemental data

Proliferation assay

To investigate whether the pharmacological treatments have an effect on cell proliferation, treated (50 µM bicuculline, 10 µM MK-801 and 30 µM CNQX) and untreated (control) cortico-hippocampal slices were cultivated in the presence of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 µg / ml, Sigma) for 2 hours in vitro. Slices were then fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde and were processed for BrdU immunohistochemistry, as described in the materials and methods section.

Slices were examined on a Zeiss confocal microscope (LSM 510) using a 10x objective and photomicrographs were digitized using the built-in software LSM Image. The total number of BrdU+ cells was evaluated at the level of the LGE (from where the late-generated interneurons arise, Anderson et al., Development 2001). Quantitative analysis (cell densities) was performed using the analysis software ImageJ 1.33d (Wayne Rasband, NIH, USA). This analysis revealed no statistical differences in the amount of BrdU+ cells in treated vs. control slices (3 experiments per condition, see supplemental figure S1A). Furthermore, we never observed BrdU+ interneurons in their migratory routes (cortex or hippocampus), excluding any proliferation during migration.

Cell survival assay

To investigate whether the pharmacological treatments have an effect on cell survival, treated (50 µM bicuculline, 10 µM MK-801 and 30 µM CNQX) and untreated (control) cortico-hippocampal slices were cultivated in the presence of propidium iodide (PI, 1µL / ml, Sigma) for 3DIV. Imaging of living slices was performed daily on a Nikon Diaphot inverted microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera and photomicrographs were digitized using the built-in software Nikon ACT-1. The number of PI+ cells per field was evaluated daily on living slices, using the analysis software Image J 1.33d (Wayne Rasband, NIH, USA). This analysis revealed no statistical differences in the amount of PI+ cells in treated vs. control slices (3 experiments per condition, see supplemental figure S1B). The amount of PI+ cells in CNQX-treated slices was unmodified, as compared to the control slices, excluding any increased cell death induced by CNQX treatment.

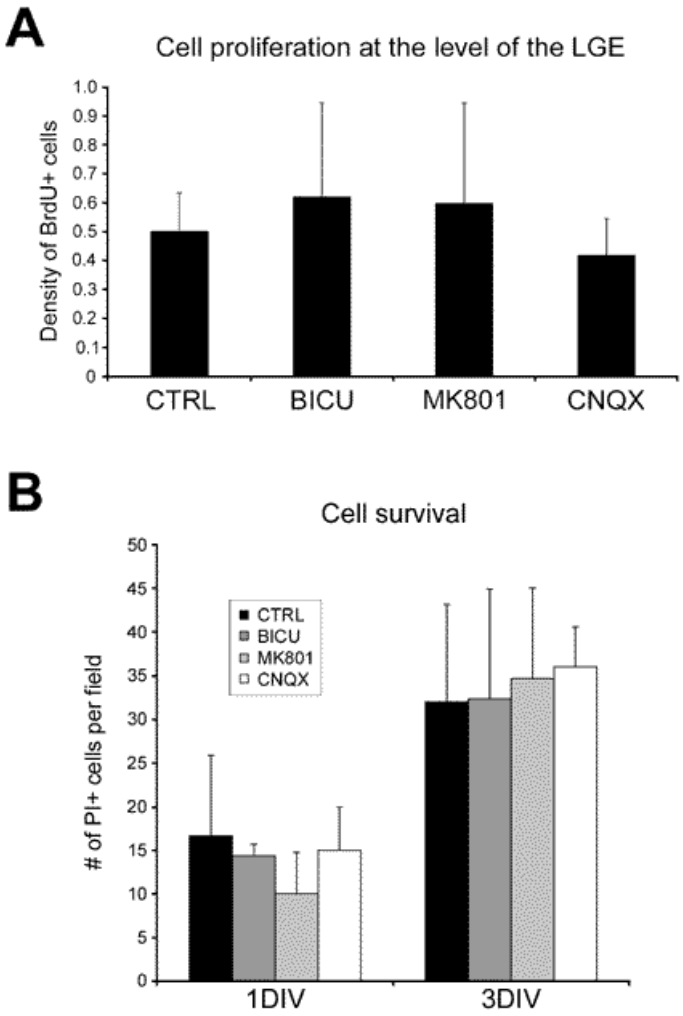


Figure S1. Proliferation and cell survival.
A) Histogram illustrating (± standard deviation) the density of BrdU+ cells (cells per surface unit) in the lateral ganglionic eminence (LGE) after 2 hours in vitro without any treatment [control condition (CTRL)] or in the presence of antagonists of GABAA [50μM bicuculline (BICU)], NMDA (10 μM MK801) and AMPA (30 μM CNQX) receptors.
B) Histogram illustrating (± standard deviation) the number of PI+ cells per field in the hippocampal primordium after 1DIV and 3DIV without any treatment [control condition (CTRL)] or in the presence of antagonists of GABAA [50μM bicuculline (BICU)], NMDA (10 μM MK801) and AMPA (30 μM CNQX) receptors.

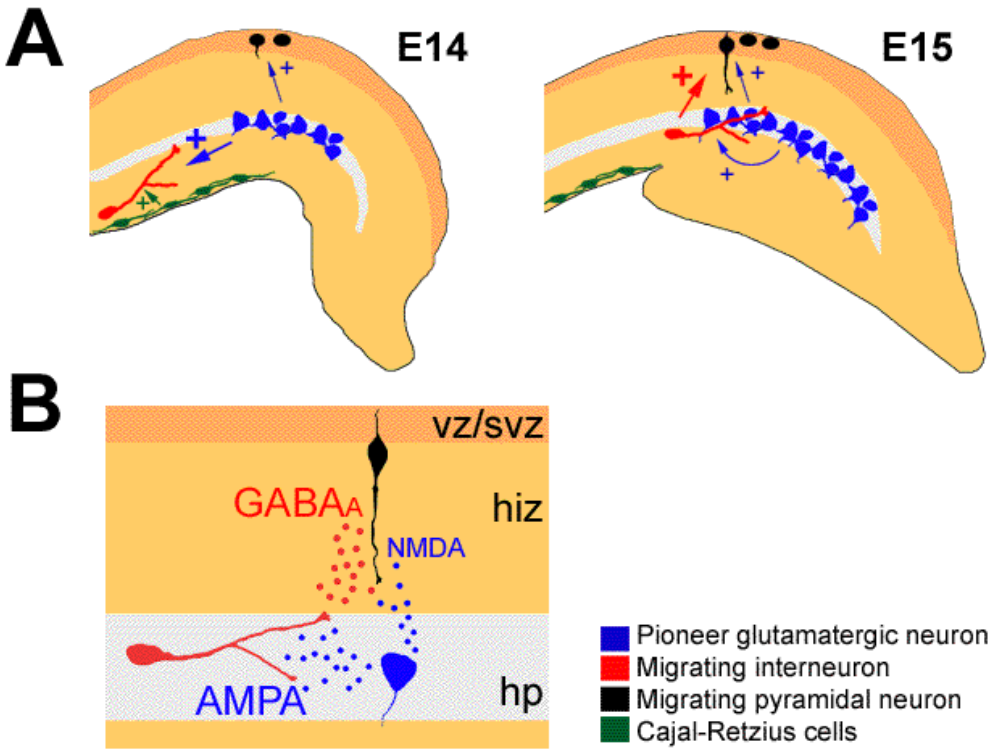


Figure S2. Proposed model for reciprocal interactions between glutamatergic and GABAergic neurons in the developing embryonic hippocampus.
Pioneer glutamatergic neurons (in blue) are present in the hippocampal primordium before the arrival of GABAergic interneurons (by E14, A). They likely release glutamate that exert a positive influence on the migration of interneurons (in red) via the activation of AMPA receptors. Cajal-Retzius cells (in green) located along the migratory pathway to the hippocampal primordium would also release glutamate, influencing interneuronal migration. Once interneurons have entered the hippocampal plate (by E15, A), they likely release GABA, facilitating the migration of glutamatergic neuroblasts via the activation of GABAA receptors, with the cooperation of glutamate acting on NMDA receptors. More glutamatergic cells reach then the hippocampal plate, which in turn will help the migration of more interneurons. This model (B) proposes a positive cooperation between the two neuronal subtypes.

Article 3

Fetal exposure to antiepileptic drugs acting on the GABA system generates hippocampal and cortical dysplasias

Jean-Bernard Manent, Isabel Jorquera, Iolanda Mazzucchelli, Antoine Depaulis, Emilio Perucca, Yehezkel Ben-Ari and Alfonso Represa

Article 3, problématique.

Compte tenu des rôles essentiels joués par le GABA et le glutamate au cours des étapes de migration neuronale, il paraissait essentiel d'étudier l'impact de médications influençant la signalisation GABAergique et glutamatergique au cours de la grossesse. Les médicaments antiépileptiques, ciblant majoritairement ces systèmes étaient les candidats les plus évidents. L'exposition fœtale aux antiépileptiques est particulièrement courante, affectant 1 grossesse sur 250 (Fairgrieve et al., 2000). Ces médicaments sont suspectés d'augmenter l'incidence des anomalies congénitales et de provoquer des déficits cognitifs à long terme chez les enfants exposés (Perucca, 2005b). D'autre part, la survenue de crises durant la grossesse est délétère pour le fœtus, provoquant des hémorragies cérébrales et des arrêts cardiaques (LaJoie and Moshe, 2004). A l'heure actuelle, il n'existe aucun modèle animal permettant d'étudier les effets tératogènes de l'exposition fœtale aux antiépileptiques et aux crises, tout comme de comparer les effets de différents antiépileptiques.

Nous avons étudié chez le rat les conséquences morphologiques de l'exposition fœtale au vigabatrin et au valproate, deux antiépileptiques augmentant les niveaux de GABA par inhibition de sa dégradation, et à la carbamazepine, qui modifie l'excitabilité neuronale en bloquant des canaux sodiques et calciques voltage-dépendant. Nous rapportons une incidence accrue de dysplasies corticales et hippocampiques chez les animaux exposés *in utero* au vigabatrin et au valproate, malformations cérébrales suggérant des défauts de migration neuronale. Les mêmes traitement provoquent également une augmentation des taux de neurones en dégénérescence.

Par contre, l'exposition du fœtus aux crises maternelles (induites par kindling hippocampique) ne provoque pas de malformations cérébrales fœtales, mais perturbe le gain de poids maternel et réduit le nombre d'animaux par portée.

Fetal exposure to antiepileptic drugs acting on the GABA system generates hippocampal and cortical dysplasias

Jean-Bernard Manent[1], Isabel Jorquera[1], Iolanda Mazzucchelli[2], Antoine Depaulis[3], Emilio Perucca[2,4], Yehezkel Ben-Ari[1] and Alfonso Represa[1*]

[1] INMED-INSERM U29, Campus de Luminy, Marseille (France)
[2] Department of Internal Medecine and Therapeutics, University of Pavia (Italy)
[3] INSERM U704, Université Joseph Fourier, Grenoble (France)
[4] Institute of Neurology IRCCS, C. Mondino Foundation, Pavia (Italy)

[*] Corresponding author, represa@inmed.univ-mrs.fr

The treatment of epilepsy during pregnancy is a debated issue since maternal seizures may adversely affect maternal and fetal outcome[1], whereas exposure to antiepileptic drugs (AEDs) may increase the incidence of congenital abnormalities[2, 3, 4, 5] and possibly affect postnatal cognitive development in the offspring[5, 6, 7, 8, 9, 10]. Experimental animal studies are clearly required to compare the teratogenic effects of AEDs and/or seizures and provide suitable conditions to select new AEDs that are not detrimental during gestation. We have compared now the morphological consequences of prenatal exposure to AEDs and seizures in rats. We centered our examinations on cortical dysplasias that are amongst the most frequent pathological findings in pediatric epilepsies. We report here that prenatal exposure to two AEDs (vigabatrin and valproate) that act on GABA signaling induce hippocampal and cortical dysplasias in rats. By contrast, offspring of rats exposed prenatally to carbamazepine and to kindled seizures show no clear-cut evidence of dysplasias. Since GABAergic synapses produce excitatory effects in fetal brain, we suggest that AEDs, which increase the extracellular concentration of GABA, may produce severe migration disorders in the offspring when administered during pregnancy. The potential clinical relevance of these findings should be ascertained.

Pregnant rats were treated with vigabatrin (VGB, n=8), valproate (VPA, n=8) or carbamazepine (CBZ, n=8) i.p. at doses not widely different from those used in humans (see methods and supplemental data 1), during the period of neurogenesis and migration of hippocampal (CA1 region) and neocortical (superficial layers) neurons [i.e. from embryonic (E) day 14 to E19]. Plasma drug concentrations during treatment were measured for VPA and CBZ (6 animals per treatment; see supplemental data 2) and found to be within the range encountered clinically. We also investigated the impact of epileptic seizures by analysing pups born to "kindled" rats that had experienced one generalized convulsive seizure/day during the same gestational period.

Maternal body weight and litter size. Seizures (SEIZ), VGB and CBZ treatments clearly resulted in reduced maternal weight gain (curves in supplemental data 3) and smaller litter size (12 ± 0.5 litter pups in vehicle-treated controls vs. 6.7 ± 0.5, 6.0 ± 2.5 and 7.2 ± 0.5 respectively; $p<0.05$). VPA had no effect on litter size (12.1 ± 0.7) and maternal weight.

Morbidity. Conventional histology (Nissl staining) and NeuN (a specific neuronal

marker) immuno-histochemistry were performed in adult offspring [postnatal (P) day 30]. A significantly increased number of hippocampal and cortical dysplasias were observed in rats born to VGB- and VPA-treated mothers as compared to controls. On the contrary, no microdysplasia and other cortical pathological abnormalities were observed in offspring of rats treated with CBZ or experiencing seizures.

In the hippocampus, two kinds of alterations were observed (Fig. 1): i) interruptions in the Ammon's horn lamination and ii) cell dispersions. Interruptions in the lamination were manifested by an interruption (Figs 1b, 1e) of the continuity of the smooth pyramidal cell layer present in control rats (Figs 1a, 1d). Interruptions were mainly observed in rats exposed prenatally to VGB (Fig 1h) and concerned both the CA1 and CA3 (supplementary data 4) pyramidal layers but not the granule layer, which is formed after birth and thus is not affected by prenatal AED exposure. Cell dispersions were manifested by a concentration of neurons outside the main pyramidal layer and could even constitute a double layer in some cases (Figs 1c, 1f) composed mainly of ectopic pyramidal neurons. Dispersions were observed mainly in the CA1 region in rats exposed prenatally to VGB or VPA (Fig 1i). These alterations were scored accordingly to their severity (mean size) and classified in subtypes in supplemental data 5 and 6; the more severe degrees of alterations were found in VGB- and VPA-exposed offspring. Though CBZ exposure did not significantly affect the number of hippocampal interruptions and dispersions in offspring, there was a non-statistically significant trend for these alterations to increase in CBZ-exposed animals (Fig 1), even though these were of a minor degree (supplemental data 5 and 6). Similarly, prenatal exposure to maternal seizures did not cause an increase in number of interruptions, but there was a non-statistically significant trend for seizure-exposed offspring to show more dispersions, which were essentially of a mild degree, as compared with controls (Fig 1 and supplemental data 6).

The two types of hippocampal alterations frequently coexisted (e.g. 69 ± 5% of VPA-induced cell dispersions were associated with layer interruptions; $p<0.05$).

To determine whether the distribution of hippocampal interneurons was modified by fetal exposure to AEDs, immuno-histochemistry studies with parvalbumin and calbindin antibodies were performed. These antibodies label different subset of interneurons such as basket cells (parvalbumin) and backprojecting neurons

(calbindin)[11]. No major differences were observed either in the density of labeled cells or in the general distribution of these neurons and a few calbindin or parvalbumin positive cells were present within the cell dispersion areas (see supplemental data 8).

In the somatosensory cortex, alterations in the layering were observed in the offspring of rats treated with VGB and VPA during pregnancy (Fig 2c) but not in the offspring of control rats or rats exposed prenatally to CBZ or seizures. VGB- and VPA-exposed rats showed massive interruptions in the neocortical lamination, affecting the most superficial cortical layers (layer 2-3), associated with an important cellular depletion both locally and in deeper layers (Fig 2a, 2b).

To determine whether dysplasias are associated with neurodegeneration, we labeled dying neurons using the TUNEL technique in slices from P0 rats exposed prenatally to VGB or VPA, as well as control rats and rats exposed prenatally to seizures (Fig. 3). Prenatal exposure to VGB and VPA caused a significant increase in the density of TUNEL+ cells in comparison with control animals (Fig 3a-c). Interestingly, animals exposed prenatally to maternal seizures were not different form control animals in terms of neurodegeneration, indicating that maternal seizures, at least during the last week of gestation, did not induce cell death in the fetal brain. Our data are in line with a previous study showing a pro-apoptotic effect of AEDs, including VGB and VPA, when administered postnatally to rodents, i.e., once neurons have completed their migration and undergo a period of intense synaptogenesis[12]. However, these authors did not report any microdysplasia, supporting the notion that cell death by itself is not the major contributor to the genesis of the alterations reported here and that the cortical and hippocampal dysplasias observed in our study mostly result from other mechanisms.

A variety of developmental disorders result from alterations of neuronal proliferation and migration. We therefore investigated the effects of AEDs and seizures on these parameters. Pregnant females were injected with the S-phase marker BrdU at E15 and the number of labeled neurons was counted at P30. The total number of BrdU+ cells detected in hippocampal sections was not modified upon exposure to any AED or maternal seizures (data not shown), indicating that the proliferation step is unaffected by AEDs or seizures.

The examination of the distribution of BrdU+ cells, double-labeled with the

neuronal marker NeuN, revealed that in control animals the neurons generated at E15 accumulated mainly in the stratum pyramidale in adulthood, whereas in animals exposed prenatally to VGB and VPA, these neurons were significantly increased in the stratum oriens, with a parallel reduction in the percentage of cells within the strata pyramidale and radiatum (Fig. 4B). This suggests that in VGB- and VPA-exposed animals pyramidal neurons fail to migrate correctly and remain in an ectopic position in the adult hippocampus. Similarly, the total number of neurons (NeuN+ cells) was also significantly increased in the stratum oriens and in the dispersion area, as compared with control animals (Fig. 4D). These results are in line with those obtained for the interruption subtypes (supplementary data 7), suggesting that neurons accumulated in the dispersion area represent ectopic pyramidal cells whose migration was impaired by AEDs.

In conclusion, prenatal exposure to AEDs that increase GABA levels (VPA, VGB) during the last week of gestation in rats leads to the formation of dysplasias (likely to be migration defects) in the hippocampus and somatosensory cortex, as well as neuronal cell death. The observation that AEDs that increase GABA levels (VGB, VPA) are detrimental is of particular importance since GABA has been shown to provide most of the excitatory drive at an early stage, in primates and rodents[13]. GABA signaling modulates a wide range of essential developmental processes[14] even before synapses are formed, when it acts in a paracrine manner able to modulate neuronal migration[15, 16]. The lack of comparably deleterious effects of CBZ, a drug which acts by blocking voltage-dependent sodium channels, may be due to the low density of these channels at an early developmental stage[16]. It should be noted however that plasma CBZ concentrations in these experiments were at the lower end of the range found in patients receiving therapeutic doses (see supplemental data 2) and that we cannot exclude that greater histological brain abnormalities could occur in animals exposed to higher CBZ concentrations.

Our results might have relevance for the health of children exposed prenatally to AEDs. There are indications from other animal studies[17, 18] and from clinical observations[5, 6, 8, 9, 10, 19, 20, 21] that exposure in utero to some AEDs might lead to neurological and/or cognitive alterations. While carbamazepine has been regarded as safe8, valproate has been repeatedly associated with developmental delay, including lower verbal IQ[9, 10] and higher incidence of additional educational needs7 in prenatally exposed children, even though an influence of confounding

factors cannot be excluded[10]. Several observations suggest that cortical malformations involving the hippocampus and medial temporal cortex[22] are instrumental in mental retardation. Whether drug-induced subtle cortical and hippocampal dysplasias are involved in causing postnatal cognitive deficits in offspring exposed to VGB, VPA or other GABAergic drugs during pregnancy should be subject for future investigations. The use of animal models, such as those we developed in the present study, are critical to investigate this issue and in addition would help understanding the mechanisms that underlie the formation of cortical dysplasias.

Methods.

In vivo experiments: treatments

All experimental procedures were performed in agreement with the European Union and French legislation concerning the care and use of laboratory animals. Pregnant Wistar rats (Janvier, France) received from embryonic day 14 (E14) to E19, 2 i.p. injections per day of one of the following AEDs (all from Sigma, dissolved in PBS – DMSO 5%): carbamazepine (CBZ, 20 mg/kg/day), vigabatrin (VGB, 200 mg/kg/day), valproic acid (VPA, 100 mg/kg/day). Doses were chosen according to the literature concerning animal experimentation (see supplemental data 1), avoiding doses that have been reported to be teratogenic[23] or causing massive apoptotic neurodegeneration of developing brain[12]. Control pregnant females received the same injections with the vehicle only. Pregnant females also received a single i.p. injection with the S-phase marker 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg, dissolved in PBS – NaOH 0.007N, Sigma) at E15. Animal that have been exposed to AEDs in utero were analysed at postnatal (P) day 0 and at P30. They were deeply anaesthetized with an injection of chloral hydrate (Sigma), perfused intracardially with the fixative solution (4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS), and their brains were cut coronally (60µm thickness) with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany).

In vivo experiments: pharmacokinetic studies

Plasma concentrations of CBZ and VPA were evaluated in separate groups of pregnant animals (n=6 per group) treated in the same way as those used to assess cerebral malformations. Blood samples were collected by venipuncture at 0.5 h, 2 h and 4 h after the first (E14) and last (E19) injection, respectively

(supplemental data 2). The plasma was separated within 1 h and frozen at -20°C until assay.

In vivo experiments: Kindling.

To test the impact of seizures on brain development the kindling model of epilepsy was chosen, as this is the only protocol allowing the control of the number, the severity and the duration of seizures during the period of interest (E15-E20). Four female rats were stereotaxically implanted under general anesthesia (diazepam, Roche; 4mg/kg i.p.; ketamine, Merial; 1,000 mg/kg i.p.) with a bipolar electrode (insulated twisted stainless steel wire – 150 µm diameter) aimed at the basal lateral nucleus of the amygdala (AP: 2.7 mm; ML: 4.5 mm ; DV: 9.0 mm, with reference to Paxinos and Watson's atlas of the rat brain[24]). Three monopolar stainless steel electrodes were screwed on the animal's skull over the parietal and occipital (reference) cortex. All electrodes were soldered to a female micro-connector and secured to the skull with acrylic cement. Starting one week after surgery, the animals were stimulated for 2 sec once a day through the amygdala electrode using a monophasic square wave current of 300 µA (frequency = 50 Hz; pulse width = 1 ms). Both behavior and EEG were monitored 5 min before and after the stimulation. Within 15 days, all animals displayed a stage-5 secondarily generalized clonic seizure and characterized by forelimb clonies associated with rearings and fallings[25]. For each animal, five stage 5 seizures were induced before mating. During pregnancy, the animals were stimulated once a day from E15 to E19-20 using the same parameters. For each stimulation, stage 4-5 seizures were observed.

Drug assays

The plasma concentration of VPA was quantified by fluorescence polarization immunoassay (TDx, Abbott, Italy) on a TDx apparatus (Abbott, Italy). Calibration curves (0.7 mg/ml to 75 mg/ml) were prepared by spiking known amounts of VPA in rat drug-free plasma. The limits of quantitation were 0.7 mg/ml, and day-to-day coefficients of variation were <5%.

The concentrations of CBZ were determined by a specific HPLC assay[26]. 100 ml plasma aliquots were extracted in 50 ml of internal standard (heptabarbital, 50 mg/ml in acetonitrile) and 100 ml acetonitrile. After centrifugation, the supernatant was diluted in PBS (2:1), centrifuged, filtrated through Millex-GV

0.22 mm filters (Millipore, Italy), and 20 ml were injected into a Shimadzu HPLC system (Shimadzu Scientific Instrument, Inc, USA). The system consisted in a System Controller SCL-10Avp, a LC-10ADvp solvent delivery module, a LP-10ADvp pump with a FCV-10ALvp Low-Pressure Gradient Flow Control Valve, an on-line DGU-12/DGU-14A Degasser, and a SIL-10ADvp autosampler. The analytical column was a Brownlee Spheri-5 ODS 100mm x 4.6 mm, 5 µm (Brownlee Labs, USA), heated to 50°C with a T-6300 thermostate (Merck, Germany), and connected to LaChrom L-7400 (Merck, Germany) variable wavelength detector with readings at 210 nm. For the isocratic elution, the mobile phase consisted in sodium monohydrogen phosphate 50 mM (J.T.Baker B.V., Holland), adjusted to pH 5.5 with orthophosphoric acid, and acetonitrile (Sigma-Aldrich, Italy) 80:20 at flow rate of 1.1 ml/min. Calibration curves (0.5 mg/ml to 8 mg/ml) were prepared by spiking known amounts of CBZ in drug-free rat plasma. The limits of quantitation were 0.1 mg/ml, and day-to-day coefficients of variation were <15%.

Immunohistochemistry

Brain sections were permeabilized for 10 min at room temperature (RT) in PBS–Triton X-100 (0.1%)– goat serum (5%). For BrdU staining, the permeabilization step was followed with a 20 min incubation in PBS–HCl 2N at 45°C. After permeabilization, slices were washed three times in PBS and incubated overnight at RT with primary antibodies diluted in PBS–Triton X-100 (0.1%)– goat serum (5%). The slices were rinsed three times in PBS and incubated for 2 h at RT in appropriated secondary antibodies, used separately for double immunolabeling. After three final washes in PBS, slices were mounted on glass slides and cover-slipped in Gel Mount (Biomedia). The primary antibodies were as follows: mouse anti-NeuN (1:1,000, Chemicon) or anti- Parvalbumin (PV, 1: 5000; Swant), rabbit anti calbindin D28k (1:1000; Swant), rat anti-BrdU (1:50, Harlan Sera-Lab), mouse The secondary antibodies were as follows: donkey anti-rat conjugated with FITC (1:200) and goat anti-mouse or anti-rabbit conjugated with Texas Red (1:200) both from Jackson ImmunoResearch.

Sections were examined under a Zeiss LSM510 confocal microscope using 10X and 20X objectives, images were digitized using the built-in software. They were exported as stacks of images, z-projections or orthogonal views in tiff format for quantitative analysis.

Assessment of cell death.

An in situ cell death detection kit (Roche Applied Sciences) was used to detect TUNEL-positive cells, according to the manufacturer's recommended protocol. Briefly, sections were permeabilized for 30 min at RT in PBS–Triton X-100 (0.3%), then rinsed in PBS and pre-incubated with potassium permanganate (0.06%) for 10 minutes at RT. After additional washes in PBS, sections were incubated with the TUNEL reaction mixture for 1 hour at 37°C.

Sections were examined under on a Nikon Eclipse E800 fluorescence microscope equipped with a Nikon DXM1200 digital camera, using 10X and 20X objectives. Photomicrographs were digitized using the built-in software Nikon ACT-1.

Quantitative analyses

Two different experimenters, blind to the animal's treatment conditions, performed the examination of sections and the quantitative analyses. Images were analyzed with the analysis software ImageJ 1.33d (Wayne Rasband, NIH) using stereological methods. Photomontages and reconstructions were performed with Photoshop 7.0 (Adobe). The normality of the data distribution was checked using SigmaStat (Systat Software), and the effects of the treatments were compared to the controls using Mann-Whitney test.

References

1. LaJoie,J. & Moshe,S.L. Effects of seizures and their treatment on fetal brain. Epilepsia 45 Suppl 8, 48-52 (2004).

2. Holmes,L.B. The teratogenicity of anticonvulsant drugs: a progress report. J. Med. Genet. 39, 245-247 (2002).

3. Arpino,C. et al. Teratogenic effects of antiepileptic drugs: use of an International Database on Malformations and Drug Exposure (MADRE). Epilepsia 41, 1436-1443 (2000).

4. Samren,E.B., van Duijn,C.M., Christiaens,G.C., Hofman,A. & Lindhout,D. Antiepileptic drug regimens and major congenital abnormalities in the offspring. Ann. Neurol. 46, 739-746 (1999).

5. Perucca,E. Birth defects after prenatal exposure to antiepileptic drugs. Lancet Neurol. 4, 781-786 (2005).

6. Koch,S. et al. Long-term neuropsychological consequences of maternal epilepsy and anticonvulsant treatment during pregnancy for school-age children and adolescents. Epilepsia 40, 1237-1243 (1999).

7. Adab,N., Jacoby,A., Smith,D. & Chadwick,D. Additional educational needs in children born to mothers with epilepsy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 70, 15-21 (2001).

8. Gaily,E. et al. Normal intelligence in children with prenatal exposure to carbamazepine. Neurology 62, 28-32 (2004).

9. Vinten,J. et al. Neuropsychological effects of exposure to anticonvulsant medication in utero. Neurology 64, 949-954 (2005).

10. Eriksson,K. et al. Children exposed to valproate in utero--population based evaluation of risks and confounding factors for long-term neurocognitive development. Epilepsy Res. 65, 189-200 (2005).

11. Somogyi,P. & Klausberger,T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J. Physiol 562, 9-26 (2005).

12. Bittigau,P. et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 15089-15094 (2002).

13. Ben Ari,Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat. Rev. Neurosci. 3, 728-739 (2002).

14. Represa,A. & Ben Ari,Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. Trends Neurosci. 28, 278-283 (2005).

15. Demarque,M. et al. Paracrine intercellular communication by a Ca2+- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. Neuron 36, 1051-1061 (2002).

16. Manent,J.B. et al. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. J. Neurosci. 25, 4755-4765 (2005).

17. Vorhees,C.V., Minck,D.R. & Berry,H.K. Anticonvulsants and brain development. Prog. Brain Res. 73, 229-244 (1988).

18. Phillips,N.K. & Lockard,J.S. Infant monkey hyperexcitability after prenatal exposure to antiepileptic compounds. Epilepsia 37, 991-999 (1996).

19. Hirano,T., Fujioka,K., Okada,M., Iwasa,H. & Kaneko,S. Physical and psychomotor development in the offspring born to mothers with epilepsy. Epilepsia 45 Suppl 8, 53-57 (2004).

20. Dean,J.C. et al. Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth. J. Med. Genet. 39, 251-259 (2002).

21. Adab,N. et al. The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75, 1575-1583 (2004).

22. Barkovich,A.J. & Raybaud,C.A. Neuroimaging in disorders of cortical development. Neuroimaging Clin. N. Am. 14, 231-54, viii (2004).

23. Menegola,E. et al. Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. Teratog. Carcinog. Mutagen. 16, 97-108 (1996).

24. Paxinos,G., Törk,I., Tecott,L.H. & Valentino,K.L. Atlas of the developing rat brain. 1991. San Diego, Academic Press, INC.

25. Racine,R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32, 281-294 (1972).

26. Wad,N. Simultaneous determination of eleven antiepileptic compounds in serum by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 305, 127-133 (1984).

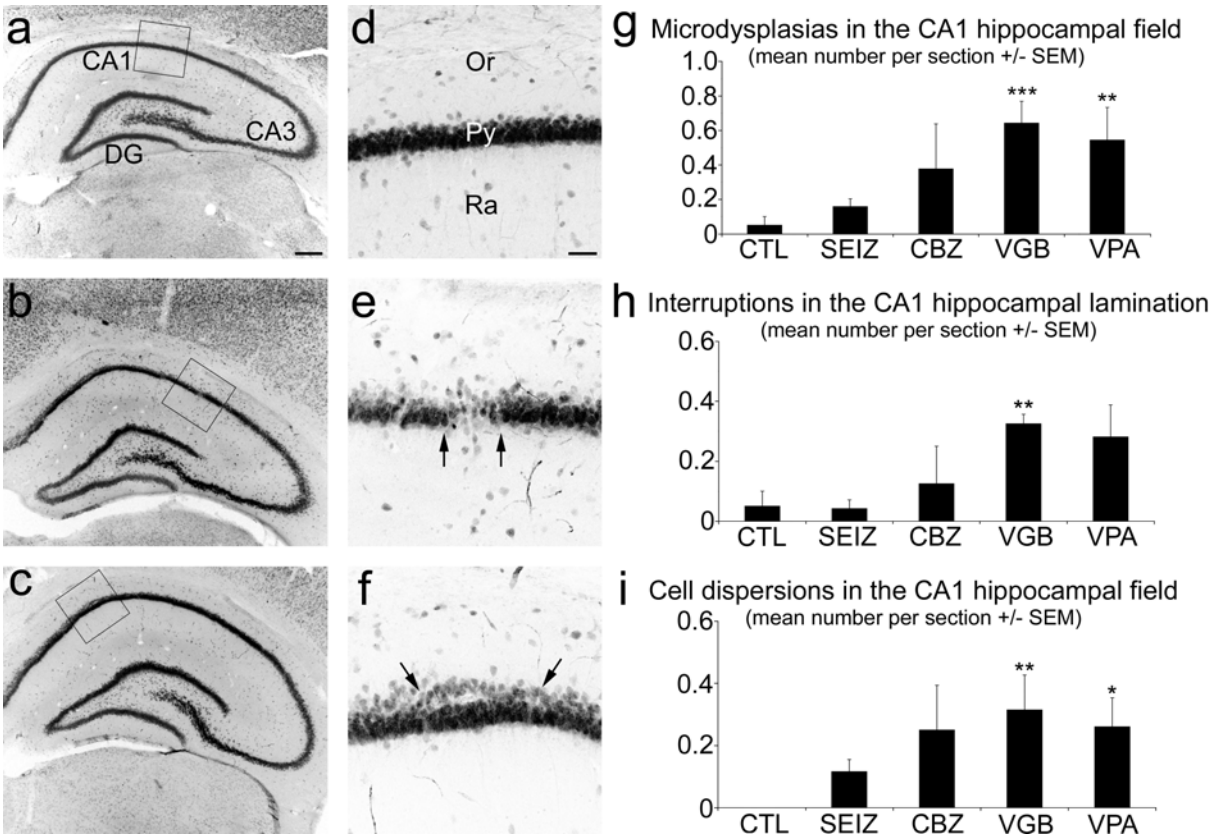


Figure 1. Foetal exposure to VGB and VPA causes microdysplasias in the CA1 hippocampal field.

NeuN immunostainings of a control hippocampus (a) and enlarged CA1 field (d), as observed in sections from a P30 rat born to a vehicle-treated mother, and two examples of hippocampal microdysplasias: an interruption in the CA1 lamination (b-e) and a cell dispersion associated with a double layer (c-f), both as observed in animals born to VGB-treated mothers. Scale bar, 50 µm.

The histograms illustrate the mean number (± SEM) per section of 1) any type of microdysplasias in the CA1 hippocampal field (g), 2) interruptions in the CA1 hippocampal lamination (h) and 3) cell dispersions in the CA1 hippocampal field (i) as a function of the treatment received by pregnant animals. Three to 5 animals and at least 8 separated sections per animal were quantified. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ as compared to control rats.

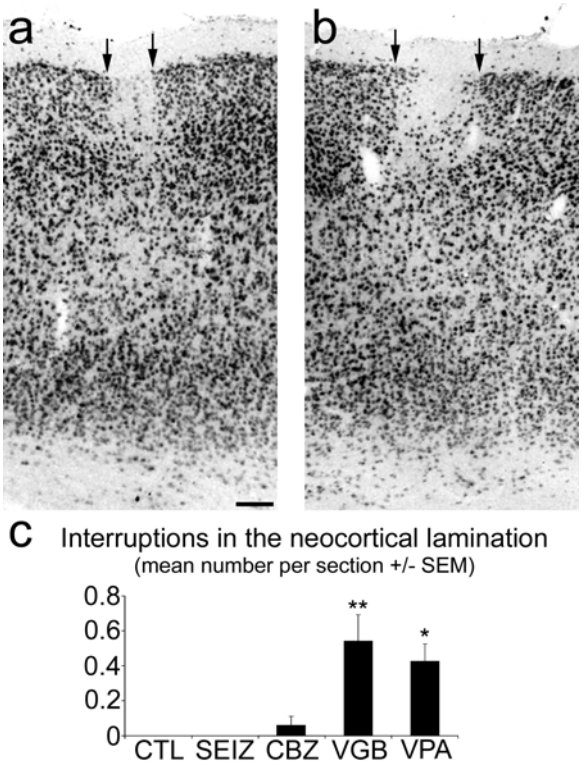


Figure 2. Foetal exposure to VGB and VPA causes interruptions in the neocortical lamination.

a-b. NeuN immunostainings of the somatosensory cortex illustrating two examples of massive interruptions in the neocortical lamination (indicated by arrows), affecting the most superficial cortical layers (layer 2-3), associated with an important cellular depletion at the level of the lesion and in the corresponding deeper layers. Scale bar, 50 µm.

c. Histogram illustrating the mean number per section (± SEM), of interruptions (larger than 40 µm) in the neocortical lamination, detected as a function of the treatment received by pregnant animals. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ as compared to controls.

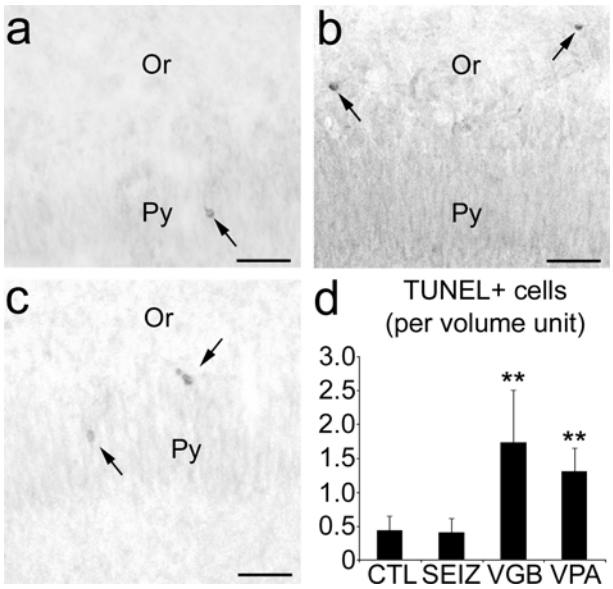


Figure 3. Foetal exposure to VGB and VPA causes cell death.
a-c) Hippocampal sections stained with TUNEL from P0 rats born to mothers treated with vehicle (a), VGB-(b) or VP (c). TUNEL+ cells are indicated with arrows. Py: stratum pyramidale, Ra: stratum radiatum. Scale bars: 50 µm.
d) Histograms illustrating the mean number (± SEM) of TUNEL+ cells per volume unit (6,387,252 µm3) as a function of the treatment received by pregnant animals. **p<0.01.

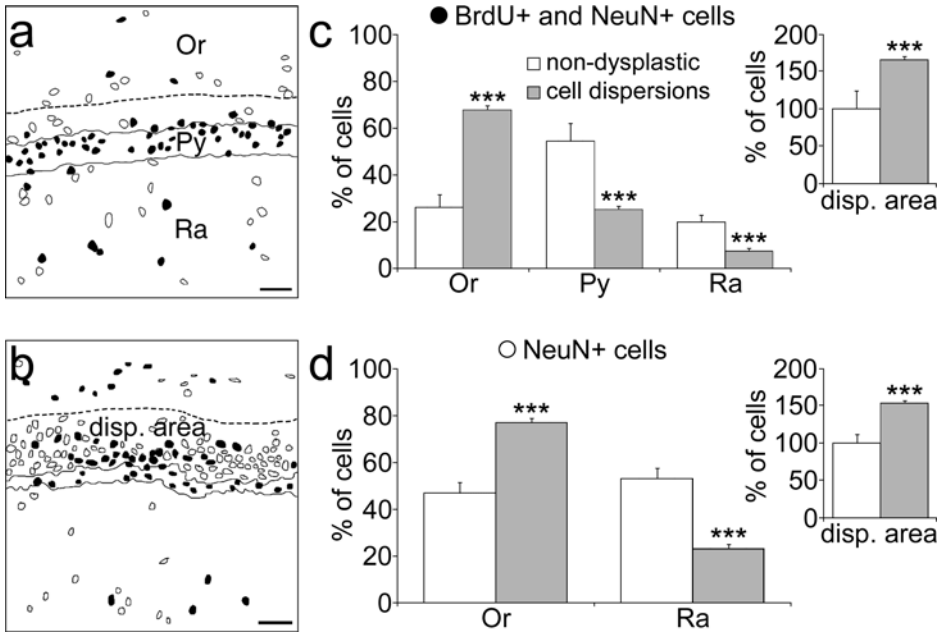


Figure 4. Cell dispersions caused by foetal exposure to VGB and VPA are linked to migration defects.

Reconstructed hippocampal sections illustrating a non-dysplastic CA1 field (a) and a dysplastic CA1 field (b) with cell dispersion. A single dose of BrdU was injected at E15 and animals were sacrified at P30. The position of double-labeled NeuN+ and BrdU+ cells (in black) as compared to the whole population of NeuN+ neurons (in white) indicate that the migration of cells generated at E15 was perturbed in animals exposed prenatally to VGB and VPA because misplaced cells appear to be located into a dispersion area (disp. area, delimited with dashed lines). Hippocampal layers are indicated: stratum oriens (Or), stratum pyramidale (delineated with straight lines, Py), stratum radiatum (Ra). Scale bar: 50 µm.

The histograms illustrate the percentage (± SEM) of BrdU+ and NeuN+ cells (c) and the percentage of NeuN+ cells (d) present in the hippocampal strata (main histograms) and within the dispersion area (histograms in insets) in dysplastic as compared to control CA1 fields (*** $p<0.001$).

Supplemental data 1.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	Present study
CBZ	1.25 –15	10 – 15	40				20
VGB	12.5 – 50	25 – 37.5		500 – 1000	50 – 200		200
VPA	5 – 30	10 – 60	100 – 150		50 – 400	900	100

Doses are given in mg / kg / day.
SE: acute doses for treatment of status epilepticus.

[1] Dosing in adult epileptic patients, MedlinePlus, Drugs and Supplements, http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html

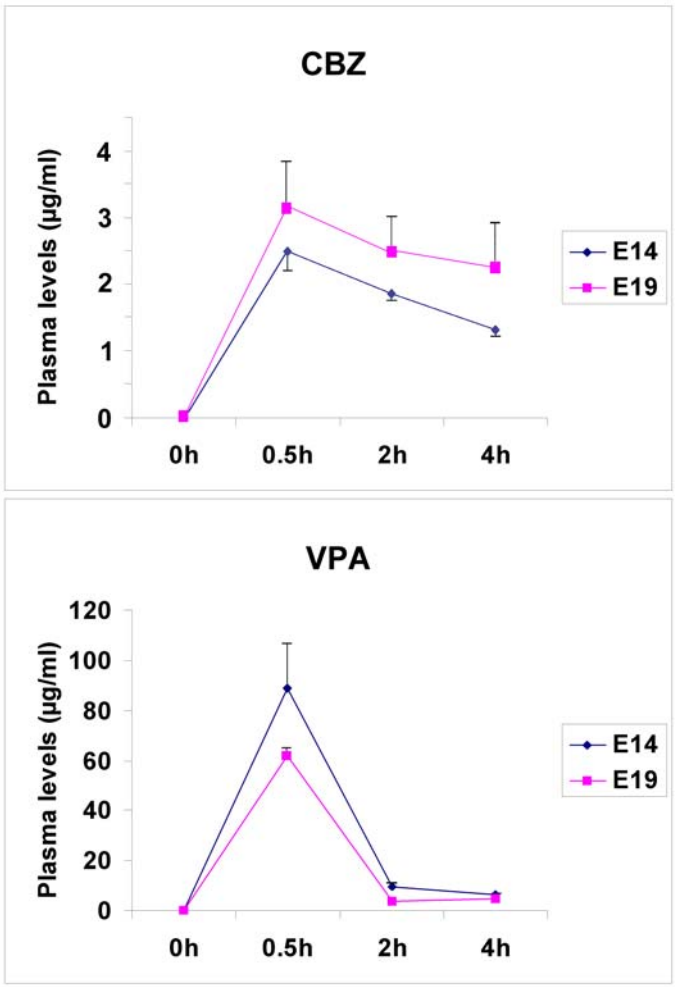
[2] Dosing in adult epileptic patients, American Epilepsy Society (AES), Antiepileptic Drug Information, http://www.aesnet.org/Visitors/PatientsPractice/aed/index.cfm

[3] Amygdala- and hippocampal-kindled seizures in adult rats,
Otsuki K, Morimoto K, Sato K, Yamada N, Kuroda S. Effects of lamotrigine and conventional antiepileptic drugs on amygdala- and hippocampal-kindled seizures in rats. Epilepsy Res. 1998 Jul;31(2):101-12.

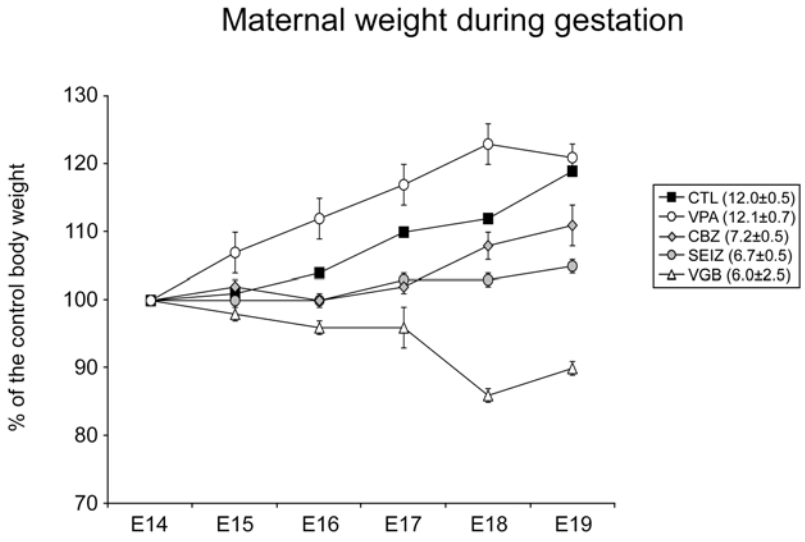
[4] KA-induced status epilepticus in adult rats,
Halonen T, Miettinen R, Toppinen A, Tuunanen J, Kotti T, Riekkinen PJ Sr. Vigabatrin protects against kainic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus. Neurosci Lett. 1995 Jul 28;195(1):13-6.

[5] Apoptotic effects during the first postnatal week in rats,
Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzietko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15089-94.

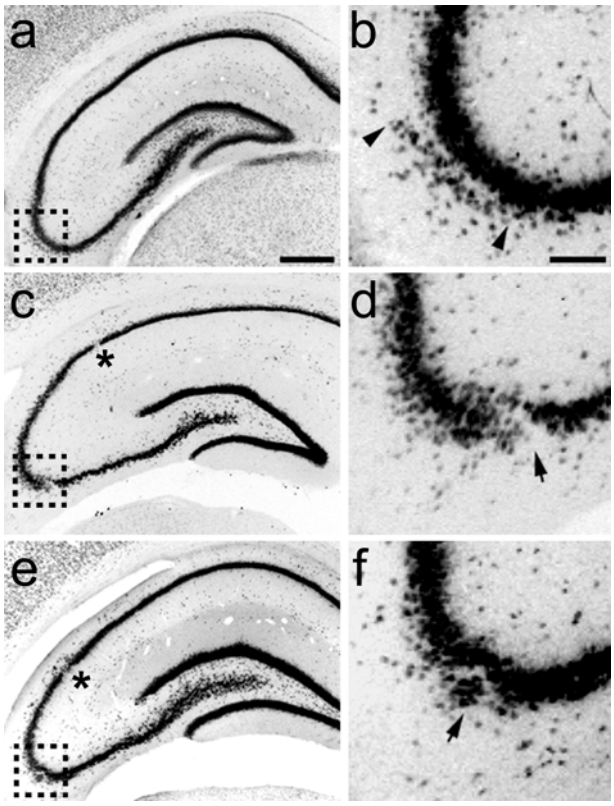
[6] Teratogenic effects during pregnancy in rats,
Menegola E, Broccia ML, Nau H, Prati M, Ricolfi R, Giavini E. Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. Teratog Carcinog Mutagen. 1996;16(2):97-108.



Supplemental data 2. Plasma concentrations of CBZ and VPA.
Plasma concentrations, expressed as µg/ml ± SEM were determined at 0.5, 2 and 4 h after the morning injection on gestational days E15 and E19. CBZ concentrations were at all times at the lower range of those occurring clinically in patients receiving therapeutic doses (usually quoted optimal range: 4-12 µg/ml (Eadie et al., Br J Clin Pharmacol. 2001). Plasma VPA concentrations at 30 min were within the range encountered clinically (usually quoted optimal range: 50-100 µg/ml ; Eadie et al, Br J Clin Pharmacol. 2001). Because the unbound fraction of VPA in young rats (16-18%) (Slattum et al., J. Pharm. Sci. 1996) is about twice as high as in humans, the pharmacologically active concentrations in rats are expected to be twice as high as they it would appear from total concentration values.



Supplemental data 3. Maternal weight during gestation.
Graph illustrating the maternal weight (percentages ± SEM) monitored during gestation (from E14 to E19) and the litter size (± SEM) at birth, for each treatment. Note the lower gain of body weight and the smaller litter size after exposure to VGB, CBZ or seizures (SEIZ). By contrast VPA did not reduce these parameters. The number of pregnant rats and litter analysed were 8 for CBZ, 8 for VGB, 8 for VPA, 4 for kindled rats and 8 for controls (CTL).



Supplemental data 4. Foetal exposure to VGB and VPA causes alterations in the CA3 field.

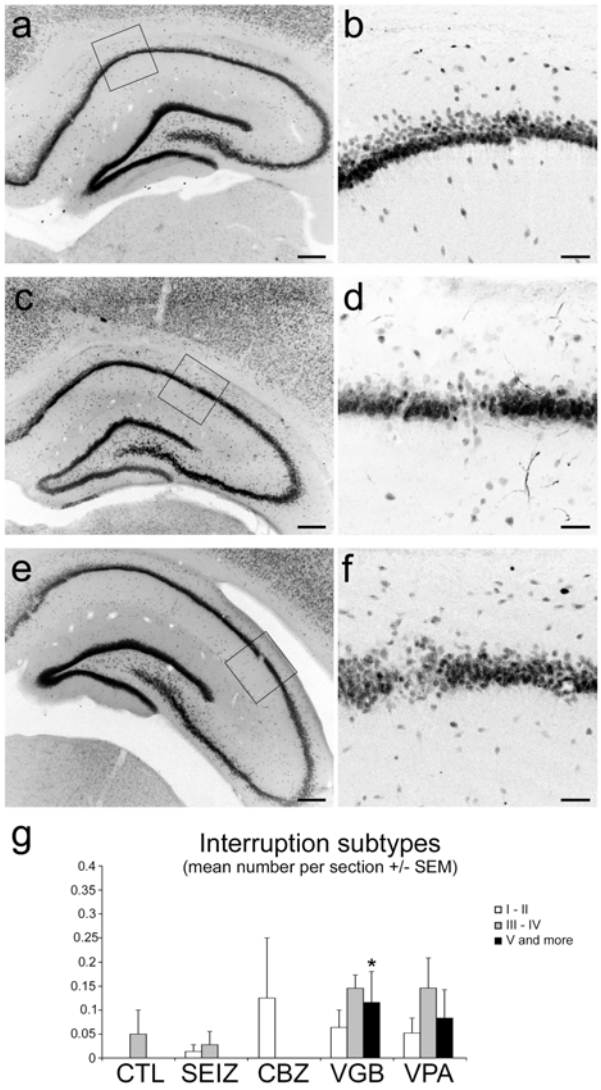
Photomicrographs of hippocampal sections stained with antibodies against NeuN, the regions within squares in a-c-e are shown enlarged in b-d-f.

a-b: Low and high power images illustrating a cell dispersion associated with double layer in the CA3 pyramidal layer.

c-d: Low and high power images illustrating a interruption in the CA3 hippocampal lamination.

e-f: Low and high power images illustrating a interruption in the lamination associated with a mass of ectopic cells in the CA3 pyramidal layer.

Scale bars, 200 μm in a to e and 50 μm in b to f.



Supplemental data 5. Foetal exposure to VGB and VPA causes diverse subtypes of interruptions in the CA1 hippocampal lamination, often associated with cell dispersions.

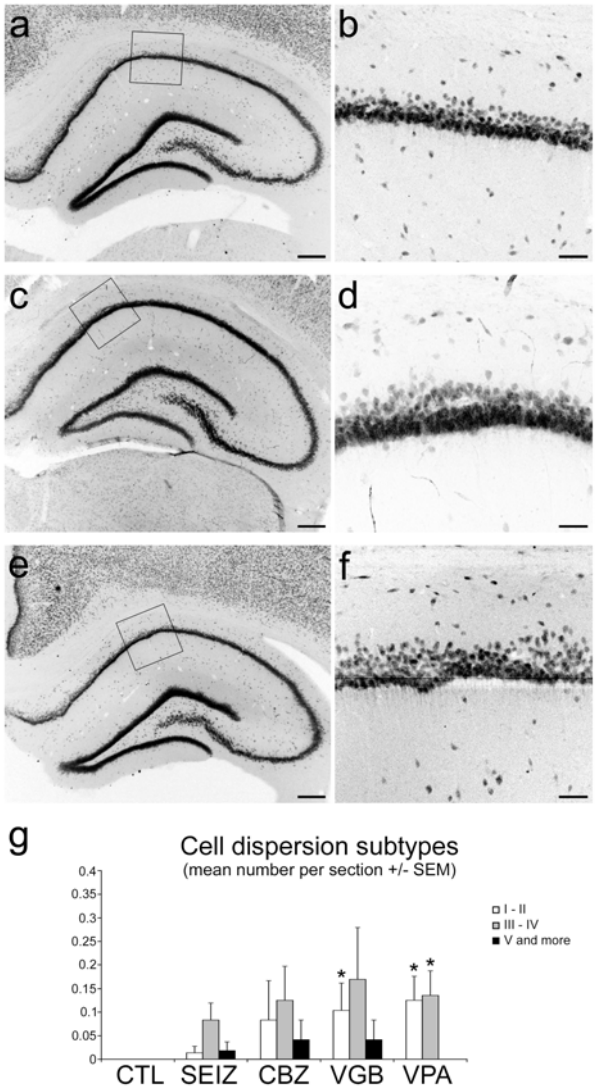
Photomicrographs of hippocampal sections stained with antibodies against NeuN (a-c-e, scale bars: 200 µm), the regions within squares are shown as enlarged confocal images in b-d-f (z-projections of 4 focal planes, 30 µm thickness, scale bars: 50 µm).

a-b. Low and high power images from a P30 rat born to a VGB-treated mother, illustrating a type I interruption associated with cell dispersion. The extent of the interruption reaches 1 cell diameter (type I) and the left border of the pyramidal layer is shifted to the stratum radiatum. The associated cell dispersion is restricted to the deepest part of the stratum oriens, close to the pyramidal layer and extends over 3 to 4 cell diameters.

c-d. Low and high power images from a P30 rat born to a VGB-treated mother illustrating a type VI interruption. The extent of the interruption reaches 6 cell diameters (type VI). Few cells are scattered around the lesion area and cell density is increased in the strata oriens and radiatum, respectively above and below the lesion area.

e-f. Low and high power images from a P30 rat born to a VPA-treated mother illustrating a type VIII interruption associated with cell dispersion. The extent of the interruption reaches 8 cell diameters and the compaction of the pyramidal layer is severely affected at the vicinity of the lesion.

g. Histogram illustrating the mean number of each interruption subtypes detected in the CA1 pyramidal layer (± SEM) as a function of the treatment received by pregnant animals. * $p<0.05$ (VGB).



Supplemental data 6. Foetal exposure to VGB and VPA causes diverse subtypes of cell dispersions in the CA1 pyramidal layer, often associated with interruptions.

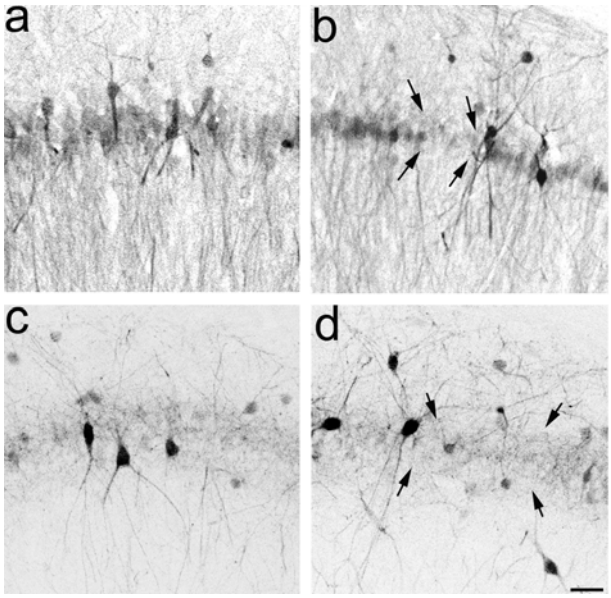
Photomicrographs of hippocampal sections stained with antibodies against NeuN (a-c-e, scale bars: 200 µm), the regions within squares are shown as enlarged confocal images in b-d-f (z-projections of 3 to 5 focal planes, 24 to 36 µm thickness, scale bars: 50 µm).

a-b. Low and high power images illustrating a type II cell dispersion, from a P30 rat born to a VGB-treated mother. The dispersion area is restricted to the deepest part of the stratum oriens, and extends over 2 cell diameters (type II).

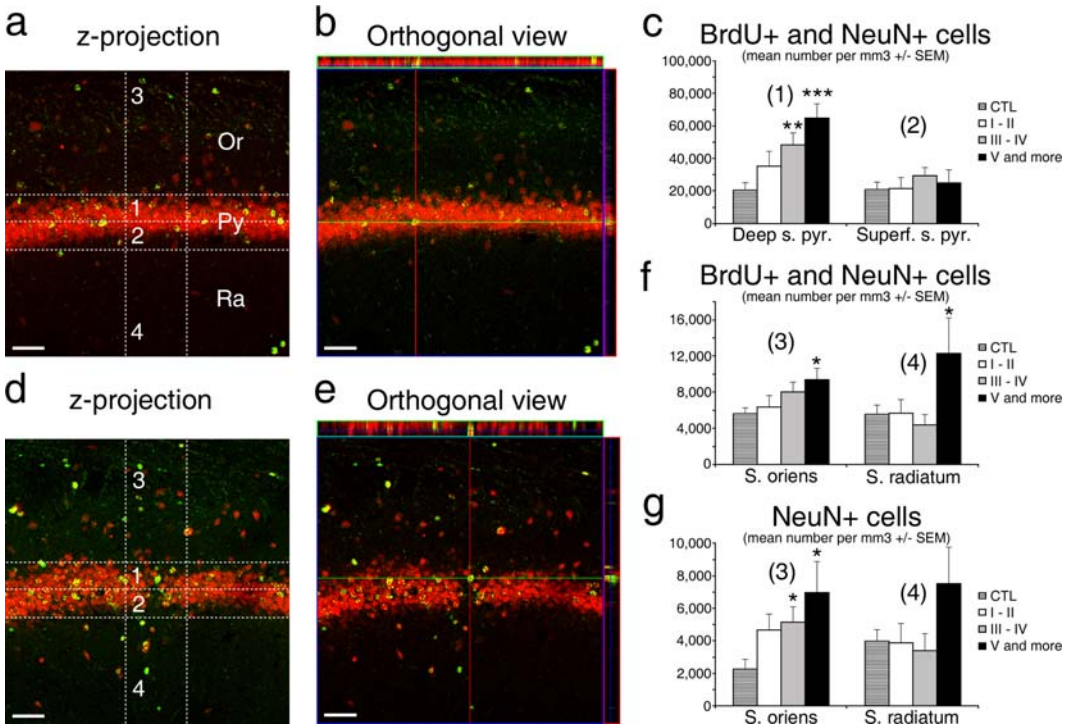
c-d. Low and high power images from a P30 rat born to a VPA-treated mother illustrating a type III cell dispersion associated with double layer. Cells located into the dispersion area form an additional ectopic layer, composed of 2 lines of cells, separated from the normally compacted pyramidal layer.

e-f. Low and high power images from a P30 rat born to a VGB-treated mother illustrating a type V cell dispersion. The dispersion area extends over 5 cell diameters (type V). The pyramidal layer is composed of 2 layers of cells and has an undulating appearance.

g. Histogram illustrating the mean number of each cell dispersion subtypes detected in the CA1 pyramidal layer (± SEM) as a function of the treatment received by pregnant animals. * $p<0.05$ (VGB, VPA).



Supplemental data 7. Immunohistochemical staining of interneurones
Photomicrographs of hippocampal sections stained with antibodies against calbindin (a-b) and parvalbumin (c-d); The sections are from P30 rats born to vehicle-treated mothers (a-c) and VGB-treated mothers (b-d). The interruption and cell dispersion (b, d) areas in the CA1 hippocampal field are indicated by arrows. The overall distribution of both types of interneurons is apparently unaffected by in utero exposure to VGB. Scale bar, 50 μm.



Supplemental data 8. The interruptions in the CA1 hippocampal lamination caused by foetal exposure to VGB and VPA are linked to migration defects.
Confocal images of hippocampal sections (a-b-c-d) stained with antibodies against NeuN (red) and BrdU (green); green and red channels are merged; scale bars: 50 µm.
a. Z-projection of 3 focal planes, from a P30 rat born to a vehicle-treated mother. Note the relatively low density of double-labelled cells into the strata oriens and radiatum. Different regions of interest (ROI) are labelled: deep stratum pyramidale (1), superficial stratum pyramidale (2), stratum oriens (3) and stratum radiatum (4). Hippocampal regions are indicated: stratum oriens (Or), stratum pyramidale (Py) and stratum radiatum (Ra). b. Orthogonal view of the same image in a, illustrating the co-localization between NeuN (red) and BrdU (green) signals at the level of the selected cell. The top image surrounded by the green rectangle represents the plane intersecting the stack of images at the level of the green horizontal line. Note the absence of any interruption in this plane. The left image surrounded by the red rectangle represents the plane intersecting the stack of images at the level or the red vertical line. The cell located at the intersection between the green and red plane is double-labelled. Image stack thickness: 24 µm. c. Histogram illustrating the mean number of double labelled cells (BrdU-positive and NeuN-positive) per mm3 (± SEM) present at the level of the ROI indicated in a and d. For quantifications, the interruptions observed in sections from rats exposed prenatally to VGB and VPA were pulled together. Note the increased cell density at the level of the deep stratum pyramidale (1) at the level of type III and more layer interruptions, as compared to the control. **p<0.01, ***p<0.001. d. Z-projection of 4 focal planes, from a P30 rat born to a VGB-treated mother (type III interruption associated with cell dispersion). Note the increased number of double-labelled cells around the lesion area, as well as into the corresponding strata oriens and radiatum. e. Orthogonal view of the same image in d, illustrating the co-localization between NeuN (red) and BrdU (green) at the level of the selected cell. The interruption extends over the entire image stack, as illustrated on the top image surrounded by the green rectangle. Image stack thickness: 30 µm. f. Histogram illustrating the mean number of BrdU-positive and NeuN-positive cells per mm3 (± SEM) present at the level of the ROI indicated in a and d as a function of the interruption subtypes. *p<0.05 as compared with control. g. Histogram illustrating the mean number of NeuN-positive cells per mm3 (± SEM) present at the level of the ROI indicated in a and d, in control in comparison with different interruption subtypes. Note the increased cell density at the level of the stratum oriens in type III-IV to type V and more, as compared to the control. *p<0.05.

Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous avons évalué les rôles joués par les neurotransmetteurs GABA et glutamate au cours de la migration neuronale, ainsi que les conséquences de la perturbation de leurs actions durant la construction du cerveau fœtal. Nous avons montré : 1) qu'une libération non conventionnelle de GABA et de glutamate module la migration des futurs neurones pyramidaux hippocampiques, 2) que le glutamate agissant via des récepteurs AMPA module la migration des interneurones hippocampiques et 3) que la prise de médicaments antiépileptiques ciblant majoritairement la transmission GABAergique pendant la gestation provoque des défauts de migration chez le fœtus. Ces résultats soulignent le rôle modulateur crucial joué par les neurotransmetteurs au cours du développement du Système Nerveux Central.

Les neurotransmetteurs, des messagers paracrines.

Une riche littérature est consacrée aux actions modulatrices des neurotransmetteurs au cours des étapes du développement cérébral [revue dans (Nguyen et al., 2001)]. Ces études ont souligné le rôle déterminant joué par les neurotransmetteurs au cours des étapes de prolifération, migration, différentiation et survie neuronale, jouant en ce sens le rôle de véritables facteurs épigénétiques. Néanmoins, le mode d'action de ces transmetteurs, ainsi que leur mode de libération restent inconnus.

A un stade où les synapses sont absentes, ou en densité limitée, les transmetteurs sont responsables, à l'évidence, d'une communication de nature non synaptique. Demarque et collaborateurs (Demarque et al., 2002) ont montré qu'une libération non conventionnelle de neurotransmetteurs est responsable d'une communication paracrine, non synaptique, aux stades périnatals (voir chapitre 3). Les résultats présentés dans l'article 1 montrent que cette libération de transmetteurs participe à la modulation de la migration des futurs neurones pyramidaux hippocampiques.

Ainsi, il est possible de considérer les neurotransmetteurs comme de véritables messagers paracrines aux stades embryonnaires : 1) ils sont libérés selon des mécanismes non conventionnels, distincts de la sécrétion vésiculaire des transmetteurs dépendante du complexe SNARE ; 2) ils diffusent au sein de l'espace extracellulaire du cerveau immature, rendu permissif par l'immaturité des systèmes de capture et 3) ils agissent par le biais de récepteurs aux propriétés particulières, notamment du fait de leurs compositions en sous-unités.

La source de ces transmetteurs reste néanmoins à élucider : ils peuvent être libérés par les cellules environnantes (neurones ou cellules gliales), ou celles localisées à proximité de la destination des jeunes neurones en migration. Ils peuvent également être libérés par les neurones en migration eux-mêmes, agissant alors selon un mode autocrine. Les résultats présentés dans l'article 2 suggèrent une libération neuronale : les interneurones en migration libèrent du GABA, influençant en retour la migration des futures cellules pyramidales qui libèrent du glutamate (voir également paragraphes suivants). Par contre, une action autocrine du GABA sur les interneurones en migration ne semble pas exister, même si ces neurones expriment des récepteurs $GABA_A$.

Le mode de libération des transmetteurs demeure également inconnu. Ils sont libérés selon des mécanismes de sécrétion indépendants du complexe SNARE, mais leur nature reste à élucider. Ils pourraient être libérés grâce à des échangeurs, comme l'échangeur cystine-glutamate, responsable de la modulation des concentrations extracellulaires de glutamate (Warr et al., 1999) ; grâce à des hémi-canaux gap, responsables d'une libération de glutamate par les astrocytes (Ye et al., 2003) ; par des récepteurs de l'ATP, dont l'activation est responsable d'une libération de glutamate par les astrocytes (Duan et al., 2003) ; ou par des canaux chlore sensibles au volume et perméables aux acides aminés, portés par les astrocytes (Kimelberg et al., 1990 ; Pasantes-Morales et al., 1994 ; Mongin and Kimelberg, 2002).

La diffusion des neurotransmetteurs libérés dans l'espace extracellulaire est facilitée par les propriétés particulières du tissu cérébral embryonnaire. Ce tissu est peu cohésif, du fait de son immaturité et de celle des cellules le constituant. D'autre part, les mécanismes de capture des transmetteurs sont peu efficaces aux stades embryonnaires. Aux stades périnatals, seuls les transporteurs du glutamate participent à la capture des neurotransmetteurs, les transporteurs du GABA (notamment GAT-1) n'étant pas efficaces (Demarque et al., 2002). Ainsi, les actions paracrines du GABA sont majoritaires aux stades embryonnaires, les actions paracrines du glutamate étant limitée par l'action des transporteurs.

L'action des neurotransmetteurs passe par l'activation de récepteurs spécifiques, qui, grâce à des compositions spécifiques en sous-unités, ont des propriétés particulières aux stades embryonnaires. Ainsi, les réponses évoquées par l'activation des récepteurs $GABA_A$ portés par les neurones corticaux immatures sont amples et ne font pas l'objet de désensibilisation, alors que les réponses des

neurones matures sont plus rapides et désensibilisent. De plus, les récepteurs $GABA_A$ portés par les neurones immatures sont activés à des concentrations de GABA plus faibles que les neurones plus matures (voir Figure 22) (Owens et al., 1999). Enfin, des récepteurs $GABA_A$ possèdant la sous-unité ε peuvent être activés en l'absence de GABA (Neelands et al., 1999). Les récepteurs NMDA portés par les jeunes neurones de la plaque corticale à E18 sont activés de façon endogène (LoTurco et al., 1991) et ceux présents au cours de la première semaine de vie post-natale sont moins sensibles au blocage par les ions magnésium (Kirson et al., 1999). Des récepteurs possédant ces propriétés pourraient être exprimés par les jeunes neurones en migration.

Les résultats présentés dans l'article 1 nous permettent de proposer que les actions modulatrices des transmetteurs au cours de la migration neuronale et, par extension, des autres étapes de la construction cérébrale, sont le fait de neurotransmetteurs paracrines. Cette hypothèse est étayée par les observations de lignées mutantes pour la sécrétion vésiculaire des neurontransmetteurs (Verhage et al., 2000 ; Varoqueaux et al., 2002), ne montrant aucun déficit de construction cérébrale en l'absence de synapses fonctionnelles. Néanmoins, la présence des deux modes de transmission, synaptique et non synaptique (paracrine), peut être indispensable à la construction correcte du système nerveux, notamment aux stades plus avancés.

Différents modes de migration, différentes actions modulatrices de la migration par les neurotransmetteurs.

Les actions modulatrices des neurotransmetteurs au cours de la migration neuronale ont été étudiées dans de nombreux modèles et types neuronaux [voir chapitre 3 et (Nguyen et al 2001)]. Les résultats de ces études ont montré une prédominance des actions du GABA et du glutamate, agissant respectivement par le biais de récepteurs $GABA_A$ et NMDA, pour les neurones excitateurs corticaux et hippocampiques (voir chapitre 3, Figure 34 et article 1). Les résultats présentés dans l'article 2 montrent une prédominance des actions du glutamate, agissant par le biais de récepteurs AMPA, pour les interneurones hippocampiques. Ainsi, la migration de neurones, employant des modes migratoires distincts, est modulée par des neurotransmetteurs agissant par le biais de récepteurs distincts. A la vue de ces résultats, nous pouvons proposer que la présence de récepteurs spécifiques est caractéristique d'un mode de

migration, permettant une modulation fine de la navigation des neurones vers leur destination. Cette hypothèse peut être étayée par les résultats de l'étude de Carleton et collaborateurs (Carleton et al., 2003). Dans un modèle particulier de migration neuronale, la migration rostrale vers le bulbe olfactif, ces auteurs ont montré que les jeunes neurones en migration expriment des récepteurs différents selon leur mode de migration. Lors de la première partie de leur trajet migratoire, ces neurones migrent de façon tangentielle (migration en chaînes, voir chapitre 3) et expriment des récepteurs $GABA_A$ et AMPA. Lors de la deuxième partie de leur trajet, ces neurones se détachent des chaînes migratoires et adoptent un mode de migration radiale, exprimant alors également des récepteurs NMDA. La migration tangentielle des futures neurones olfactifs étant modulée par le GABA agissant via des récepteurs $GABA_A$ (Bolteus and Bordey, 2004), nous pouvons raisonnablement penser que leur migration radiale est modulée par le glutamate agissant via des récepteurs NMDA. Ce modèle particulier de migration serait particulièrement adapté pour tester cette hypothèse. Il en est de même pour la migration des cellules granulaires du cervelet, qui migrent tangentiellement aux stades précoces, avant de s'engager sur une fibre de la glie de Bergman et de migrer radialement. Si la migration radiale de ces cellules est modulée par le NMDA (voir chapitre 3), leur migration tangentielle pourrait être modulée différemment.

Il est important de noter que les neurones en migration ne sont pas strictement restreints à un seul mode migratoire : si les neurones excitateurs migrent majoritairement de façon radiale et les interneurones, majoritairement de façon tangentielle, les neurones excitateurs peuvent également migrer tangentiellement et les interneurones, radialement (voir chapitre 1). Il serait intéressant d'étudier l'expression des récepteurs et les effets de leur activation chez des neurones utilisant des modes migratoires s'écartant du cadre général. En ce sens, l'étude de la migration multipolaire des neurones excitateurs corticaux serait particulièrement intéressante. Ces neurones migrent de façon très dynamique au niveau de la zone intermédiaire, indépendamment de la glie radiaire et la direction de leur mouvement peut être radiale, tangentielle ou même transversale (voir chapitre 1). L'étape de migration multipolaire est particulièrement cruciale pour le développement cortical, puisqu'un échec au niveau de cette phase provoque une accumulation de neurones ectopiques au niveau de la zone intermédiaire (Bai et al., 2003 ; Tsai et al., 2005). Cette zone

intermédiaire représente également une zone de cohabitation pour les différents types neuronaux en migration, pouvant être propice à des interactions entre neurones. Des défauts d'interactions pourraient conduire à la perturbation des comportements migratoires. Il est intéressant de noter que les hétérotopies induites au niveau de la zone intermédiaire par l'inactivation du gène DCX contiennent non seulement des neurones excitateurs ayant subi l'inactivation de DCX, mais également des neurones ne l'ayant pas subi et des interneurones [(Bai et al., 2003 ; Ramos et al., 2005) et voir chapitre 1]. Ces neurones piégés au sein de l'hétérotopie peuvent résulter de tels défauts d'interactions entre neurones et les neurotransmetteurs pourraient être impliqués dans celles-ci.

Interactions précoces entre neurones excitateurs et interneurones.

Afin d'atteindre leur position définitive au sein du cortex en développement, les neurones excitateurs et les interneurones doivent tout d'abord migrer à partir de leurs zones de genèse. Leurs périodes de migration étant largement coexistantes et leurs voies migratoires entremêlées, il est raisonnable de penser que ces deux types neuronaux interagissent dès les stades précoces. En effet, ces neurones expriment des récepteurs du GABA et du glutamate (voir chapitre 2) et l'activation de ces récepteurs participe à la modulation de leur migration (voir chapitre 3). Les résultats présentés dans les articles 1 et 2 fournissent des éléments dans ce sens : 1) la migration des neurones pyramidaux est modulée majoritairement par le GABA (article 1) et 2) la migration des interneurones est modulée par le glutamate (article 2). Les interneurones étant une des sources évidentes de GABA et les neurones excitateurs une source de glutamate, nous proposons que ces deux types neuronaux modulent réciproquement leur migration. Ainsi, le glutamate libéré par les neurones excitateurs module la migration des interneurones et le GABA libéré par les interneurones module la migration des neurones excitateurs. Cette forme de communication portée par les neurotransmetteurs pourrait constituer un mécanisme homéostatique destiné à construire un cerveau correctement équilibré en terme d'excitation et d'inhibition. Ainsi, elle permettrait de contrôler la proportion relative de chaque type neuronal au sein d'une structure cérébrale. Par extension, il est possible d'envisager qu'une communication précoce entre les neurones est nécessaire à l'organisation en couches corticales. Il est d'ailleurs intéressant de noter que

neurones excitateurs et interneurones sont engagés dans des modes migratoires particuliers à différentes étapes de leur trajet. Ainsi que déjà évoqué plus haut, les neurones excitateurs passent par une étape de migration multipolaire au niveau de la zone intermédiaire. De même, ils passent également par une étape de migration rétrograde en direction des zones germinatives (voir chapitre 1). Les interneurones en migration tangentielle sont également capables de changer de direction, migrant radialement en direction de la plaque corticale ou de la zone ventriculaire (voir chapitre 1). Ces mouvements particuliers des neurones, s'écartant des voies générales de migration, pourraient être destinés à l'acquisition d'informations de positionnement au sein des couches corticales. Ces informations de position pourraient être obtenues par interaction entre les différents types neuronaux, et leur décryptage pourrait passer par l'expression de récepteurs spécifiques.

Défauts migratoires après exposition fœtale aux antiépileptiques.

Au cours de la grossesse, le cerveau fœtal est soumis à l'influence de différents facteurs environnementaux, d'origine maternelle ou extra-maternelle, à l'image des traitements pharmacologiques administrés à la femme enceinte, dont la grande majorité des composés traversent la barrière fœto-placentaire.

Les médicaments antiépileptiques sont parmi les molécules auxquelles les fœtus sont le plus fréquemment exposés, puisqu'une grossesse sur deux-cent cinquante est menée sous antiépileptiques (Fairgrieve et al., 2000). Ces molécules appartiennent à une classe très large de composés, ayant des cibles variées. De façon générale, ces molécules agissent en augmentant les niveaux de GABA (par blocage des systèmes de dégradation, des systèmes de recapture ou en potentialisant l'action du GABA sur le récepteur $GABA_A$), en diminuant l'action du glutamate (en inhibant sa libération et son interaction avec les récepteurs) ou en modulant l'activité neuronale par bloquage des canaux sodiques et calciques voltage-dépendant [revue (Perucca, 2005a)]. Dans l'article 3, nous avons ciblé deux composés augmentant les niveaux de GABA (vigabatrin et valproate) et un composé bloquant les canaux sodiques et calciques (carbamazepine). Vigabatrin et valproate induisent des dysplasies cortico-hippocampiques chez les animaux exposés *in utero*, alors que la carbamazepine n'en provoque pas aux doses étudiées. Ces résultats suggèrent que la perturbation des taux de GABA est plus délétère que le blocage des canaux

sodiques et calciques voltage-dépendant. Les dysplasies observées suggérant des défauts de migration, ces données sont en accord avec le rôle modulateur majeur du GABA au cours des étapes de migration neuronale. De plus, les dysplasies observées concernent les neurones excitateurs corticaux et hippocampiques (les interneurones ne semblent pas affectés au cours des périodes de traitement étudiées), ce qui est également en accord avec les actions modulatrices du GABA chez ces types cellulaires (chapitre 3 et article 1).
Néanmoins, compte tenu des actions pro-migratoires du GABA, on aurait pu s'attendre à observer une migration excessive de ces neurones plutôt qu'à leur accumulation sur les trajets migratoires lors des traitements aux antiépileptiques. Il faut également noter que des neurones ectopiques sont présents au delà de la couche pyramidale dans les cas des interruptions de la couche pyramidale, pouvant suggérer une migration excessive (article 3, supplemental data 8).
L'étude des effets d'autres molécules est en cours au laboratoire, notamment ciblant plus particulièrement la signalisation glutamatergique (lamotrigine).
Si l'exposition fœtale à certains médicaments antiépileptiques est potentiellement délétère pour la construction du cerveau, il faut néanmoins contrôler les crises chez la femme enceinte. En effet, la survenue de crises généralisées lors de la grossesse représente un risque d'arrêt cardiaque et d'hémmorragies intra-crâniennes chez le fœtus [revue, (LaJoie and Moshe, 2004)]. Les résultats obtenus nous permettent de désigner des molécules dont l'utilisation est moins risquée en terme de malformations cérébrales. Ainsi, la carbamazépine serait plus indiquée que le valproate et le vigabatrin afin d'éviter la survenue de telles anomalies. Il est important de noter que les effets de ces molécules sont étroitement liés à la dose d'administration, l'utilisation de la plus faible dose nécessaire à éviter la survenue de crises étant à conseiller.

Conclusion.

Au cours de ce travail, nous avons évalué les rôles modulateurs du GABA et du glutamate lors de la migration neuronale et avons mis en évidence plusieurs notions fondamentales. D'une part, le GABA et le glutamate jouent le rôle de messagers paracrines modulant la migration des futurs neurones pyramidaux hippocampiques. Ces actions passent par une libération non conventionnelle de GABA et de glutamate, indépendante du mode de sécrétion vésiculaire des

neurotransmetteurs. D'autre part, la migration de neurones engagés dans différents modes migratoires est modulée différemment par le GABA et le glutamate. Ainsi, la migration des neurones pyramidaux hippocampiques est modulée par l'activation de récepteurs $GABA_A$ et NMDA, alors que celle des interneurones hippocampiques est modulée par l'activation de récepteurs AMPA. Ensuite, les principaux types neuronaux du cerveau adulte (neurones excitateurs et interneurones) exercent une modulation réciproque de leurs migrations, suggérant une communication précoce entre ces types neuronaux avant la formation de synapses. Enfin, toute perturbation de l'action des neurotransmetteurs lors de la construction cérébrale, par exemple suite à l'exposition fœtale aux antiépileptiques, est potentiellement tératogène.

Références bibliographiques

Altman J, Bayer SA (1990a) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. J Comp Neurol 301: 365-381.

Altman J, Bayer SA (1990b) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. J Comp Neurol 301: 325-342.

Altman J, Bayer SA (1990c) Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. J Comp Neurol 301: 343-364.

Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41: 683-686.

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278: 474-476.

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128: 353-363.

Ang ES, Jr., Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. J Neurosci 23: 5805-5815.

Angevine JB, Jr., Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. Nature 192: 766-768.

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. Neuron 41: 881-890.

Antonopoulos J, Pappas IS, Parnavelas JG (1997) Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. Eur J Neurosci 9: 291-298.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4155-4160.

Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ (2002) The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. Development 129: 4249-4260.

Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. J Neurosci 14: 5525-5547.

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat Neurosci 6: 1277-1283.

Baraban SC, Wenzel HJ, Castro PA, Schwartzkroin PA (1999) Hippocampal dysplasia in rats exposed to cocaine in utero. Brain Res Dev Brain Res 117: 213-217.

Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. J Comp Neurol 190: 87-114.

Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. J Neurosci 16: 1808-1818.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. Cereb Cortex 10: 899-909.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. J Neurosci 18: 6378-6387.

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. J Neurosci 19: 4449-4461.

Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL (2001) GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. Cereb Cortex 11: 744-753.

Ben Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. J Physiol 416: 303-325.

Benitez-Diaz P, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceno RV, Pena-Contreras Z, Palacios-Pru E (2003) Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. Dev Neurosci 25: 366-374.

Bentivoglio M, Mazzarello P (1999) The history of radial glia. Brain Res Bull 49: 305-315.

Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. J Anat 99: 691-709.

Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. Nat Neurosci 8: 1002-1012.

Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J Neurosci 24: 7623-7631.

Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. Trends Pharmacol Sci 21: 16-19.

Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremeau RT, Jr., Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. J Comp Neurol 480: 264-280.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. Pharmacol Rev 54: 247-264.

Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron 8: 189-198.

Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron 48: 591-604.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. Nat Neurosci 6: 507-518.

Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. J Physiol 494 (Pt 2): 451-464.

Clayton GH, Owens GC, Wolff JS, Smith RL (1998) Ontogeny of cation-Cl- cotransporter expression in rat neocortex. Brain Res Dev Brain Res 109: 281-292.

Conti F, Minelli A, Melone M (2004) GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. Brain Res Brain Res Rev 45: 196-212.

Coskun V, Luskin MB (2002) Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. J Neurosci Res

69: 795-802.

Crandall JE, Hackett HE, Tobet SA, Kosofsky BE, Bhide PG (2004) Cocaine exposure decreases GABA neuron migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex in embryonic mice. Cereb Cortex 14: 665-675.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Curr Opin Neurobiol 11: 327-335.

Cuzon VC, Yeh PW, Cheng Q, Yeh HH (2005) Ambient GABA Promotes Cortical Entry of Tangentially Migrating Cells Derived from the Medial Ganglionic Eminence. Cereb Cortex.

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65: 1-105.

de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. J Neurosci 16: 6146-6156.

Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca2+- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. Neuron 36: 1051-1061.

Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2004) Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. J Neurosci 24: 3289-3294.

Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. Nat Neurosci 6: 1127-1134.

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. J Neurosci 23: 1320-1328.

Dupuy ST, Houser CR (1996) Prominent expression of two forms of glutamate

decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. J Neurosci 16: 6919-6932.

Durand GM, Zukin RS (1993) Developmental regulation of mRNAs encoding rat brain kainate/AMPA receptors: a northern analysis study. J Neurochem 61: 2239-2246.

Evans JE, Frostholm A, Rotter A (1996) Embryonic and postnatal expression of four gamma-aminobutyric acid transporter mRNAs in the mouse brain and leptomeninges. J Comp Neurol 376: 431-446.

Fairgrieve SD, Jackson M, Jonas P, Walshaw D, White K, Montgomery TL, Burn J, Lynch SA (2000) Population based, prospective study of the care of women with epilepsy in pregnancy. BMJ 321: 674-675.

Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. Brain Res Dev Brain Res 115: 1-8.

Flames N, Marin O (2005) Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. Neuron 46: 377-381.

Frederiksen K, McKay RD (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. J Neurosci 8: 1144-1151.

Fremeau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. Trends Neurosci 27: 98-103.

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. J Neurosci 17: 8363-8375.

Gao XB, van den Pol AN (2000) GABA release from mouse axonal growth cones. J Physiol 523 Pt 3: 629-637.

Gao XB, van den Pol AN (2001) GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. J Neurophysiol 85: 425-434.

Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 777-788.

Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. Neuropharmacology 49: 901-911.

Gray GE, Glover JC, Majors J, Sanes JR (1988) Radial arrangement of clonally related cells in the chicken optic tectum: lineage analysis with a recombinant retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 7356-7360.

Gressens P, Baes M, Leroux P, Lombet A, Van Veldhoven P, Janssen A, Vamecq J, Marret S, Evrard P (2000) Neuronal migration disorder in Zellweger mice is secondary to glutamate receptor dysfunction. Ann Neurol 48: 336-343.

Gressens P, Kosofsky BE, Evrard P (1992a) Cocaine-induced disturbances of corticogenesis in the developing murine brain. Neurosci Lett 140: 113-116.

Gressens P, Lammens M, Picard JJ, Evrard P (1992b) Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. Alcohol Alcohol 27: 219-226.

Gressens P, Mesples B, Sahir N, Marret S, Sola A (2001) Environmental factors and disturbances of brain development. Semin Neonatol 6: 185-194.

Grove EA, Williams BP, Li DQ, Hajihosseini M, Friedrich A, Price J (1993) Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. Development 117: 553-561.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at

neocortical development. Nat Rev Genet 3: 342-355.

Hall RA, Bahr BA (1994) AMPA receptor development in rat telencephalon: [3H]AMPA binding and western blot studies. J Neurochem 63: 1658-1665.

Harris RA, Proctor WR, McQuilkin SJ, Klein RL, Mascia MP, Whatley V, Whiting PJ, Dunwiddie TV (1995) Ethanol increases GABAA responses in cells stably transfected with receptor subunits. Alcohol Clin Exp Res 19: 226-232.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol 229: 15-30.

Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (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.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. J Neurosci 20: 5764-5774.

Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ (2006) GABA-A Receptors Regulate Neocortical Neuronal Migration In Vitro and In Vivo. Cereb Cortex.

Hennou S, Khalilov I, Diabira D, Ben Ari Y, Gozlan H (2002) Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. Eur J Neurosci 16: 197-208.

Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. Brain Res Dev Brain Res 141: 39-53.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushiki S (1999) Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res

114: 63-67.

His W (1889) Die Neuroblasten und deren Entstehung im embrionalen Mark. Abh. Kgl. sachs. Ges. Wissensch. math. phys. Kl. 15:311-372.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B (1989) N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. J Neurochem 52: 1937-1940.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovska V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. Science 287: 1056-1060.

Jimenez D, Lopez-Mascaraque LM, Valverde F, de Carlos JA (2002) Tangential migration in neocortical development. Dev Biol 244: 155-169.

Johansen TN, Greenwood JR, Frydenvang K, Madsen U, Krogsgaard-Larsen P (2003) Stereostructure-activity studies on agonists at the AMPA and kainate subtypes of ionotropic glutamate receptors. Chirality 15: 167-179.

Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet 2: 999-1001.

Jursky F, Nelson N (1996) Developmental expression of GABA transporters GAT1 and GAT4 suggests involvement in brain maturation. J Neurochem 67: 857-867.

Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben Ari Y (2001) Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. J Neurosci 21: 9770-9781.

Kidd FL, Isaac JT (1999) Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. Nature 400: 569-573.

Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z, Sawada T (2002)

Stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 138: 195-198.

Killisch I, Dotti CG, Laurie DJ, Luddens H, Seeburg PH (1991) Expression patterns of GABAA receptor subtypes in developing hippocampal neurons. Neuron 7: 927-936.

Kim MO, Li S, Park MS, Hornung JP (2003) Early fetal expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor mRNAs on the development of the rat central nervous system. Brain Res Dev Brain Res 143: 47-55.

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. J Neurosci 10: 1583-1591.

Kirson ED, Schirra C, Konnerth A, Yaari Y (1999) Early postnatal switch in magnesium sensitivity of NMDA receptors in rat CA1 pyramidal cells. J Physiol 521 Pt 1: 99-111.

Kölliker A (1896) Handbuch der Gewebelehre des Menschen, 6th ed., vol. II. Leipzig : W. Engelmann.

Komatsu S, Sakata-Haga H, Sawada K, Hisano S, Fukui Y (2001) Prenatal exposure to ethanol induces leptomeningeal heterotopia in the cerebral cortex of the rat fetus. Acta Neuropathol (Berl) 101: 22-26.

Komuro H, Kumada T (2005) Ca2+ transients control CNS neuronal migration. Cell Calcium 37: 387-393.

Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. Science 257: 806-809.

Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260: 95-97.

Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca2+ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. Neuron 17: 275-285.

Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. J Neurosci 21: 527-540.

Konovalov HV, Kovetsky NS, Bobryshev YV, Ashwell KW (1997) Disorders of brain development in the progeny of mothers who used alcohol during pregnancy. Early Hum Dev 48: 153-166.

Kornack DR, Rakic P (1995) Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. Neuron 15: 311-321.

Kosofsky BE, Wilkins AS, Gressens P, Evrard P (1994) Transplacental cocaine exposure: a mouse model demonstrating neuroanatomic and behavioral abnormalities. J Child Neurol 9: 234-241.

Kriegstein AR (2005) Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. Epilepsia 46 Suppl 7: 15-21.

Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci 27: 392-399.

Kumada T, Komuro H (2004) Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca(2+) transients. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 8479-8484.

Kumada T, Lakshmana MK, Komuro H (2006) Reversal of neuronal migration in a mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling second-messenger signalings. J Neurosci 26: 742-756.

LaJoie J, Moshe SL (2004) Effects of seizures and their treatment on fetal brain. Epilepsia 45 Suppl 8: 48-52.

Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. J Neurosci 12: 4151-4172.

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. J Neurosci 19: 7881-7888.

Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben Ari Y, Khazipov R (1997) Ca2+ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. Neuron 18: 243-255.

Leinekugel X, Tseeb V, Ben Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABAA activation induces Ca2+ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. J Physiol 487 (Pt 2): 319-329.

Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature 417: 645-649.

Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J Comp Neurol 193: 815-840.

Li G, Pleasure SJ (2005) Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. Dev Neurosci 27: 93-99.

Lidow MS, Bozian D, Song ZM (2001) Cocaine affects cerebral neocortical cytoarchitecture in primates only if administered during neocortical neuronogenesis. Brain Res Dev Brain Res 128: 45-52.

Lidow MS, Song ZM (2001a) Effect of cocaine on cell proliferation in the cerebral wall of monkey fetuses. Cereb Cortex 11: 545-551.

Lidow MS, Song ZM (2001b) Primates exposed to cocaine in utero display

reduced density and number of cerebral cortical neurons. J Comp Neurol 435: 263-275.

Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Maric D, Barker JL (2000) Persistent activation of GABA(A) receptor/Cl(-) channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. J Neurophysiol 84: 1392-1403.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. Science 271: 978-981.

Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z (2003) Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. Cereb Cortex 13: 932-942.

Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R (2002) Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. Eur J Neurosci 15: 1766-1778.

Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairen A, Lujan R (2004) Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. Hippocampus 14: 836-848.

LoTurco JJ, Blanton MG, Kriegstein AR (1991) Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. J Neurosci 11: 792-799.

LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. Neuron 15: 1287-1298.

Lovinger DM, White G, Weight FF (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. Science 243: 1721-1724.

Luskin MB, Pearlman AL, Sanes JR (1988) Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. Neuron 1: 635-647.

Ma W, Barker JL (1995) Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABAA receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. J Neurosci 15: 2547-2560.

Magini G (1888a) Nouvelles recherches histologiques sur le cerveau du foetus. Arch Ital Biol 10:384–387.

Magini G (1888b) Sur la neuroglie et les cellules nerveuses cerebrales chez les foetus. Arch Ital Biol 9:59–60.

Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. Neuron 37: 751-764.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development 127: 5253-5263.

Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci 26: 441-483.

Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. Science 293: 872-875.

Marin-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (Felis domestica). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. Z Anat Entwicklungsgesch 134: 117-145.

Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex.

Trends Neurosci 21: 64-71.

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.

Marret S, Gressens P, Evrard P (1996) Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 15463-15468.

Martin LJ, Furuta A, Blackstone CD (1998) AMPA receptor protein in developing rat brain: glutamate receptor-1 expression and localization change at regional, cellular, and subcellular levels with maturation. Neuroscience 83: 917-928.

Martin SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH (2004) Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. J Comp Neurol 473: 16-29.

Metin C, Denizot JP, Ropert N (2000) Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. J Neurosci 20: 696-708.

Miles R (1999) Neurobiology. A homeostatic switch. Nature 397: 215-216.

Miller MW (1986) Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. Science 233: 1308-1311.

Miller MW (1993) Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. Alcohol Clin Exp Res 17: 304-314.

Miller MW, Robertson S (1993) Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. J Comp Neurol 337: 253-266.

Minelli A, Alonso-Nanclares L, Edwards RH, DeFelipe J, Conti F (2003) Postnatal

development of the vesicular GABA transporter in rat cerebral cortex. Neuroscience 117: 337-346.

Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. J Neurosci 17: 2018-2029.

Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS, Jr. (1988) Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. Brain Res 466: 183-190.

Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron 31: 727-741.

Mongin AA, Kimelberg HK (2002) ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. Am J Physiol Cell Physiol 283: C569-C578.

Monuki ES, Walsh CA (2001) Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. Nat Neurosci 4 Suppl: 1199-1206.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron 12: 529-540.

Morrow BA, Elsworth JD, Roth RH (2003) Axo-axonic structures in the medial prefrontal cortex of the rat: reduction by prenatal exposure to cocaine. J Neurosci 23: 5227-5234.

Moya F, Valdeolmillos M (2004) Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. Cereb Cortex 14: 610-618.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. Nat Neurosci 5: 218-224.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2003) Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. Cereb Cortex 13: 607-611.

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci 4: 143-150.

Nakahira E, Yuasa S (2005) Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primoridium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. J Comp Neurol 483: 329-340.

Nassogne MC, Gressens P, Evrard P, Courtoy PJ (1998) In contrast to cocaine, prenatal exposure to methadone does not produce detectable alterations in the developing mouse brain. Brain Res Dev Brain Res 110: 61-67.

Neelands TR, Fisher JL, Bianchi M, Macdonald RL (1999) Spontaneous and gamma-aminobutyric acid (GABA)-activated GABA(A) receptor channels formed by epsilon subunit-containing isoforms. Mol Pharmacol 55: 168-178.

Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. Nat Neurosci 5: 1279-1287.

Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. J Neurosci 23: 3278-3294.

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.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001)

Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409: 714-720.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci 22: 3161-3173.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7: 136-144.

Oh WJ, Noggle SA, Maddox DM, Condie BG (2005) The mouse vesicular inhibitory amino acid transporter gene: expression during embryogenesis, analysis of its core promoter in neural stem cells and a reconsideration of its alternate splicing. Gene 351: 39-49.

Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Ikonomidou C (2002) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. Brain Res Dev Brain Res 133: 115-126.

Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J Neurosci 16: 6414-6423.

Owens DF, Kriegstein AR (2002) Developmental neurotransmitters? Neuron 36: 989-991.

Owens DF, Liu X, Kriegstein AR (1999) Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. J Neurophysiol 82: 570-583.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol 54: 581-618.

Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca2+ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. Nat Neurosci 4: 803-812.

Pasantes-Morales H, Murray RA, Sanchez-Olea R, Moran J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. Am J Physiol 266: C172-C178.

Perucca E (2005a) An introduction to antiepileptic drugs. Epilepsia 46 Suppl 4: 31-37.

Perucca E (2005b) Birth defects after prenatal exposure to antiepileptic drugs. Lancet Neurol 4: 781-786.

Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. Neuron 28: 727-740.

Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. Development 129: 3147-3160.

Poluch S, Drian MJ, Durand M, Astier C, Benyamin Y, Konig N (2001) AMPA receptor activation leads to neurite retraction in tangentially migrating neurons in the intermediate zone of the embryonic rat neocortex. J Neurosci Res 63: 35-44.

Poluch S, Rossel M, Konig N (2003) AMPA-evoked ion influx is strongest in tangential neurons of the rat neocortical intermediate zone close to the front of the migratory stream. Dev Dyn 227: 416-421.

Poulter MO, Barker JL, O'Carroll AM, Lolait SJ, Mahan LC (1992) Differential and transient expression of GABAA receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. J Neurosci 12: 2888-2900.

Price J, Thurlow L (1988) Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. Development 104: 473-482.

Rakic P (1971a) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. Brain Res 33: 471-476.

Rakic P (1971b) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. J Comp Neurol 141: 283-312.

Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol 145: 61-83.

Rallu M, Corbin JG, Fishell G (2002) Parsing the prosencephalon. Nat Rev Neurosci 3: 943-951.

Ramon y Cajal S (1911) Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine.

Ramos RL, Bai J, LoTurco JJ (2005) Heterotopia Formation in Rat but Not Mouse Neocortex after RNA Interference Knockdown of DCX. Cereb Cortex.

Reid CB, Tavazoie SF, Walsh CA (1997) Clonal dispersion and evidence for asymmetric cell division in ferret cortex. Development 124: 2441-2450.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature 397: 251-255.

Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat Rev Neurosci 3: 641-653.

Rozenberg F, Robain O, Jardin L, Ben Ari Y (1989) Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus. Brain Res Dev Brain Res 50: 177-187.

Sadikot AF, Burhan AM, Belanger MC, Sasseville R (1998) NMDA receptor

antagonists influence early development of GABAergic interneurons in the mammalian striatum. Brain Res Dev Brain Res 105: 35-42.

Sakata-Haga H, Sawada K, Hisano S, Fukui Y (2002) Administration schedule for an ethanol-containing diet in pregnancy affects types of offspring brain malformations. Acta Neuropathol (Berl) 104: 305-312.

Sauer FC (1935) Mitosis in the neural tube. J Comp Neurol 62: 377-405.

Schuurmans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. Curr Opin Neurobiol 12: 26-34.

Serafini R, Ma W, Maric D, Maric I, Lahjouji F, Sieghart W, Barker JL (1998) Initially expressed early rat embryonic GABA(A) receptor Cl- ion channels exhibit heterogeneous channel properties. Eur J Neurosci 10: 1771-1783.

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. Brain Res Brain Res Rev 45: 250-265.

Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL (1995) Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. Development 121: 3923-3933.

Sieghart W (2000) Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. Trends Pharmacol Sci 21: 411-413.

Soeda H, Tatsumi H, Katayama Y (1997) Neurotransmitter release from growth cones of rat dorsal root ganglion neurons in culture. Neuroscience 77: 1187-1199.

Sommer B, Keinanen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science 249: 1580-1585.

Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain

controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. Cell 67: 11-19.

Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, Mestikawy SE, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. Eur J Neurosci 19: 552-569.

Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J Physiol 562: 9-26.

Soria JM, Valdeolmillos M (2002) Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. Cereb Cortex 12: 831-839.

Stanfield BB, Cowan WM (1979) The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. J Comp Neurol 185: 423-459.

Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. FEBS Lett 441: 392-396.

Super H, Martinez A, Del Rio JA, Soriano E (1998a) Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. J Neurosci 18: 4616-4626.

Super H, Soriano E (1994) The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. J Comp Neurol 344: 101-120.

Super H, Soriano E, Uylings HB (1998b) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. Brain Res Brain Res Rev 27: 40-64.

Sutherland ML, Delaney TA, Noebels JL (1996) Glutamate transporter mRNA

expression in proliferative zones of the developing and adult murine CNS. J Neurosci 16: 2191-2207.

Tabata H, Nakajima K (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J Neurosci 23: 9996-10001.

Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. J Neurosci 17: 8313-8323.

Tamamaki N, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T (2001) Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. Neurosci Res 41: 51-60.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J Comp Neurol 467: 60-79.

Tanaka D, Nakaya Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. Development 130: 5803-5813.

Taylor J, Gordon-Weeks PR (1991) Calcium-independent gamma-aminobutyric acid release from growth cones: role of gamma-aminobutyric acid transport. J Neurochem 56: 273-280.

Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. Nat Rev Neurosci 4: 496-505.

Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB (2005) LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. J Cell Biol 170: 935-945.

Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L (1999) The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. J Neurosci 19: 10372-10382.

Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1997) Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. Eur J Neurosci 9: 1646-1655.

Valcanis H, Tan SS (2003) Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. J Neurosci 23: 5113-5122.

Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 9037-9042.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287: 864-869.

Wafford KA, Burnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofuji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM (1991) Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in Xenopus oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. Neuron 7: 27-33.

Wang DD, Krueger DD, Bordey A (2003) GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. J Physiol 550: 785-800.

Warr O, Takahashi M, Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. J Physiol 514 (Pt 3): 783-793.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. Neuron 18: 779-791.

Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. Development 128: 3759-3771.

Wonders C, Anderson SA (2005) Cortical interneurons and their origins. Neuroscientist 11: 199-205.

Xu Q, Cobos I, De La CE, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. J Neurosci 24: 2612-2622.

Yacubova E, Komuro H (2002) Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro. J Neurosci 22: 5966-5981.

Yan XX, Cariaga WA, Ribak CE (1997) Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. Brain Res Dev Brain Res 99: 1-19.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. J Neurosci 23: 3588-3596.

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 25: 7268-7277.

Résumé : Les progrès récents des techniques d'imagerie cérébrale ont permis d'identifier les défauts de migration neuronale comme cause majeure de retards mentaux, d'épilepsies et de nombreux syndromes neurologiques. La connaissance des mécanismes intervenant dans la modulation de la migration neuronale est donc capitale afin de prévenir de telles anomalies du développement cérébral fœtal, dont le coût socio-économique est élevé. Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans le cadre de cette thématique.
De nombreuses études ont identifié les neurotransmetteurs comme des molécules porteuses d'informations à un niveau plus large que celui de la seule transmission synaptique. En effet, avant même la formation de synapses, les neurotransmetteurs sont présents au sein du tissu cérébral embryonnaire et exercent des actions variées, influençant les étapes de genèse, migration, différentiation et de mort neuronale. Nous avons évalué les rôles joués par les neurotransmetteurs GABA et glutamate au cours de la migration neuronale, ainsi que les conséquences de la perturbation de leurs actions durant la construction du cerveau fœtal.
Afin d'étudier la migration neuronale, nous avons mis au point des préparations originales permettant la visualisation directe de neurones fluorescents en migration. Grâce à elles, nous avons démontré l'existence d'une modulation de la migration neuronale par le GABA et glutamate, libérés selon un mode de sécrétion « non vésiculaire » et agissant par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Nous avons montré que les mécanismes modulant la migration sont caractéristiques du type neuronal et du mode migratoire considéré. Ainsi, la migration radiale des futurs neurones glutamatergiques est modulée majoritairement par l'activation de récepteurs $GABA_A$, alors que la migration tangentielle des futurs interneurones GABAergiques est modulée par l'activation de récepteurs glutamatergiques de type AMPA. Ces résultats suggèrent également l'existence d'une communication précoce entre neurones glutamatergiques et interneurones, pouvant contribuer à la construction cérébrale. Par la suite, nous avons évalué le risque de survenue de malformations cérébrales fœtales, suite à l'administration de médicaments anti-épileptiques, qui potentialisent l'action du GABA, limitent l'action du glutamate et modulent l'activité des canaux ioniques. Nous avons observé une incidence accrue de micro-dysplasies cortico-hippocampiques, à rapprocher de défauts de migration, suite à l'administration chez la rate gestante de valproate et de vigabatrin à des doses compatibles avec celles employées pour le traitement de la femme enceinte épileptique.
Ces résultats soulignent le rôle central joué par les neurotransmetteurs GABA et glutamate, en tant que signaux informatifs majeurs du cerveau en développement. De plus, ils suggèrent le besoin d'évaluer l'impact de l'exposition à des composés pharmacologiques interférant avec les actions de ces neurotransmetteurs lors de la maturation cérébrale.

Title: Paracrine transmitters as informative signals: GABA and glutamate modulate neuronal migration.

Abstract: Recent advances in neuroimaging techniques have identified neuronal migration disorders as major causes of mental retardation, epilepsies and other neurological syndromes. Understanding the mechanisms modulating neuronal migration is then crucial to prevent such brain maturation disorders. Many studies have identified the neurotransmitters as early informative signals, acting before synapse formation, and influencing several aspects of CNS construction - i.e. neurogenesis, migration and differentiation. We have investigated the roles played by the transmitters GABA and glutamate during neuronal migration, as well as the consequences of the disturbance of their actions on foetal brain construction.
We have developed in vitro models to visualize migrating neurons - hippocampal pyramidal neurons and hippocampal interneurons. We have demonstrated that ambient GABA and glutamate, both released in a calcium and SNARE-independent manner, differentially modulate the migration of these two neuronal subtypes: $GABA_A$ and NMDA receptors activation modulate the radial migration of glutamatergic pyramidal neurons, whereas AMPA receptor activation modulates the tangential migration of GABAergic interneurons. We have then investigated the impact of in utero exposure to antiepileptic drugs, which interfere with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and modulate ionic channels. We report that prenatal exposure to vigabatrin and valproic acid (two drugs acting on the GABA system) induces hippocampal and cortical dysplasias in rats. These alterations of the foetal brain construction are suggestive of neuronal migration disorders and were observed at plasma drug concentrations within the range encountered clinically.
Altogether, these results suggest the presence of an early mode of communication through transmitters contributing to an appropriate brain construction and highlight the central role played by GABA and glutamate as major informative signals in developing brain. Our data also revealed the crucial need for evaluating the consequences of prenatal exposure to pharmacological agents interfering with transmitters actions during cerebral maturation.

Discipline : Neurosciences
Mots-clés : GABA, glutamate, migration neuronale, antiépileptiques, hippocampe
Laboratoire : Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) / INSERM U29, 163 Route de Luminy BP 13, 13273 Marseille cedex 09