

# THÈSE

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES,  
ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

Par **Anne-Emilie ALLAIN**

Pour obtenir le grade de

**Docteur**

Spécialité : Neurosciences

---

**Contrôle du développement embryonnaire des systèmes  
spinaux GABA/glycinergiques par les voies bulbo-spinales  
chez la souris : importance de la modulation sérotoninergique**

---

Soutenue le 20 Décembre 2005

Après avis de :

F. Clarac	Rapporteur
P. Gaspar	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

P. Branchereau	Maître de Conférences	Univ. Bordeaux 1	Examineur
F. Clarac	Directeur de Recherche	CNRS, Marseille	Rapporteur
P. Gaspar	Directeur de Recherche	INSERM, Paris	Rapporteur
P. Meyrand	Directeur de Recherche	CNRS, Bordeaux	Examineur
J. Micheau	Professeur	Univ. Bordeaux 1	Président
A. Privat	Directeur de Recherche	INSERM Montpellier	Examineur

## *Avant-propos.*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux, CNRS UMR 5816 et Université Bordeaux 1, dirigé par M. P. Meyrand.

Je voudrais remercier Pierre Meyrand qui m'a accueillie dans le laboratoire il y a sept ans. J'ai été une étudiante privilégiée pendant toute ces années : alors que les étudiants autour de moi se faisaient du souci pour leur avenir, vous m'avez offert une place dans ce laboratoire et quelques queues de homard. Je vous en suis très reconnaissante... Grâce à vous j'ai également rencontré des gens passionnés par leur métier : à Mount Sinaï à New York ; pendant les écoles internationales au labo (vous ne m'aviez d'ailleurs pas dit que l'on travaillerait autant pendant l'ENNS, j'en garde un souvenir douloureux !). Vous avez aussi su me mettre la pression avant les examens, juste ce qu'il faut : pas de mention, pas de DEA ; pas de bourse, pas de thèse. Ça a marché, vous avez bien fait ! Enfin, vous m'avez encadrée dans ce travail de thèse. Rigueur, clarté et précision seraient vos trois mots d'ordre, en bref vous m'avez appris à ne pas tourner autour du pot !

Un grand merci à Pascal Branchereau, responsable de l'équipe neurobiologie des réseaux locomoteurs de vertébrés, qui m'a co-encadré avec Pierre lors de mon travail de DEA et de Thèse. Tu m'as fait découvrir la préparation de moelle épinière embryonnaire. J'ai appris beaucoup en travaillant avec toi, en particulier à avoir le souci du détail. Tu m'as guidée pendant ces quatre années et je te remercie de t'être autant impliqué dans ce travail.

Je remercie Mme Gaspar, M. Clarac, M. Micheau et M. Privat d'avoir bien voulu prendre le temps de lire ce mémoire et de juger ce travail.

J'ai une pensée particulière pour Valérie Fénelon qui m'a encadrée lors de mon tout premier stage dans le laboratoire. Alors que j'étais étudiante en DEUG, tu m'as permis de découvrir le milieu de la recherche, sans toi je n'aurais sans doute pas poursuivi mes études aussi loin. Tu m'as appris à travailler avec méthode. Merci d'avoir eu confiance en moi pendant toutes ces années et de m'avoir toujours soutenue.

Moi qui oscille entre deux statuts, j'adresse une pensée chaleureuse aux étudiants du labo. D'abord aux anciens : Yves et Serge qui m'ont fait faire du PAF sous une hotte hors service lorsque j'étais en DEUG et qui m'ont de ce fait intoxiquée. Puis aux p'tits jeunes : Eric, pour les soirées pizzas (les problèmes d'imprimantes sont pas mal aussi), Alain et Sébastien. Pas beaucoup de filles dans ce labo... Une autre pensée va au personnel technique du laboratoire, mes super collègues : William et Alexia qui m'ont aidée à imprimer ce mémoire ainsi que Philippe, merci pour votre aide technique. Je n'oublie pas Françoise qui m'a commandé tellement de souris !

Je voudrais également remercier mes cop's du labo : William, Isabelle, Jean-Paul, Alexia, Claire, Jacques. Pour le thé à quatre heures, le resto japonais, le bowling, la fondue jurassienne non, savoyarde, les bonbons, la cabane à Bisca... tous ces moments de détente furent bien agréables.

Un grand merci à l'ensemble des membres du LNR qui ont chacun à leur manière contribué à ce travail. Merci à Jacqueline Chapron qui m'a formée sur les cultures organotypiques, à Louis Ségu qui nous a permis d'avoir accès aux lignées transgéniques, à Pierre Costet qui a entretenu ces lignées à Bordeaux II.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée.

*Il n'y a d'espérance que là où l'on accepte de ne pas voir l'avenir...*

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	9
1- Détermination des stades de développement embryonnaire chez la souris.....	10
2- Présentation de la préparation utilisée : la moelle épinière embryonnaire de souris... 12	
a. Différences morphologiques au cours du développement.....	12
b. Prélèvement de la moelle épinière.....	13
3- Coupes transversales de moelle épinière.....	14
4- Technique de culture organotypique.....	14
a. Mise en culture.....	14
b. Maintien en culture.....	16
c. Manipulations : transection et/ou pharmacologie.....	17
5- Techniques immunohistochimiques .....	18
6- Acquisitions des images en microscopie confocale.....	19
7- Analyse des images et quantifications.....	20
a. Expériences de marquages simples.....	20
b. Doubles marquages.....	21
8- Analyses statistiques.....	21
<b>Chapitre I MATURATION DES ACTIVITES RYTHMIQUES DANS LA MOELLE EPINIÈRE DE SOURIS AU COURS DU DEVELOPPEMENT</b> .....	23
A- MATURATION DES ACTIVITES SPONTANÉES DANS LA MOELLE EPINIÈRE DE SOURIS .....	25
B- MISE EN PLACE DES ACTIVITES DE TYPE LOCOMOTEUR.....	26
C- MISE EN PLACE DE LA TRANSMISSION INHIBITRICE GABA/GLYCINE DANS LA MOELLE EPINIÈRE.....	27
D- RÔLE DE LA SEROTONINE SUR LA MISE EN PLACE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GABA/GLYCINE INHIBITRICE.....	29
<b>Chapitre II MISE EN PLACE DES POPULATIONS SPINALES GABAÉRGIQUES ET GLYCINÉRGIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT <i>IN UTERO</i></b> .....	31
A- LOCALISATION DES MOTONEURONES SPINAUX AU COURS DU DEVELOPPEMENT.....	32
B- MISE EN PLACE DU SYSTÈME GABAÉRGIQUE A DIFFÉRENTS STADES DE DEVELOPPEMENT.....	35
1) Localisation préférentielle des premières cellules GABAérgiques dans la substance grise ventrale.....	36
2) Apparition du phénotype GABA dans toute la moelle .....	37
3) Localisation préférentielle des cellules GABA-ir dans la corne dorsale de la moelle épinière.....	38
C- MISE EN PLACE DE LA POPULATION GLYCINÉRGIQUE SPINALE AU COURS DE L'ONTOGENÈSE.....	43
1) Localisation préférentielle des premières cellules glycinérgiques dans la substance grise ventrale.....	44
2) Envahissement progressif de la corne dorsale.....	44

3) Localisation préférentielle du marquage glycine dans la corne dorsale et diminution du nombre de cellules Gly-ir dans la corne ventrale.....	46
D- ETUDE DES CO-LOCALISATIONS ENTRE LES POPULATIONS GABAERGIQUES ET GLYCINERGIQUES.....	49
E- DISCUSSION.....	52
1) Etude phylogénétique des systèmes GABA et glycine .....	53
a) Mise en place du système GABAergique au cours de l'ontogenèse.....	53
b) Mise en place du système glycinergique.....	58
2) Développement parallèle des populations spinales GABAergique glycinergique, existence de co-localisations.....	61
<b>Chapitre III CONTROLE DE LA MATURATION DU PHENOTYPE GABA PAR LES VOIES BULBO-SPINALES SEROTONINERGIQUES.....</b>	<b>63</b>
A- MISE EN PLACE DES VOIES DESCENDANTES SEROTONINERGIQUES EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.....	65
B- LA MISE EN PLACE DE LA POPULATION GABAERGIQUE EST SIMILAIRE <i>IN UTERO</i> ET EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.....	68
C- ROLE DE LA SEROTONINE SUR LA MISE EN PLACE DE LA POPULATION GABAERGIQUE SPINALE.....	71
1) Le délai rostro-caudal dans l'expression de la population GABAergique est dépendant de la 5-HT.....	72
2) La présence de 5-HT endogène retarde l'expression synchrone de la population GABAergique spinale.....	73
3) L'apport de 5-HT exogène provoque un retard plus important de mise en place de la population GABAergique spinale.....	74
D- ETUDE DES RECEPTEURS 5-HT IMPLIQUES DANS LA MISE EN PLACE TARDIVE DE LA POPULATION GABAERGIQUE SPINALE.....	76
1) Implication des récepteurs 5-HT1.....	77
2) Implication des récepteurs 5-HT1B.....	78
E- ROLE DES VOIES DESCENDANTES 5-HT SUR LA MATURATION DE LA POPULATION GABAERGIQUE.....	81
F- DISCUSSION.....	84
1) Régulation négative de la 5-HT sur le phénotype GABA.....	85
2) Récepteurs sérotoninergiques impliqués dans l'expression du phénotype GABA.....	86
3) Différence spatio-temporelle dans les effets de la 5-HT sur l'expression du phénotype GABA.....	88
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>90</b>
Rôle des activités électriques sur la mise en place phénotypes neuronaux.....	92
Rôle des informations sensorielles sur la mise en place des réseaux spinaux .....	93
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>96</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

BMP	Bone Morphogenic Protein
br	brachial
BSA	Bovine Serum Albumine
cc	canal central
cd	corne dorsale
com v	commissure ventrale
cv	corne ventrale
EGF	Epidermal Growth Factor
E10, E14...	stade embryonnaire 10, 14...
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
FITC	fluorescéine
GABA	Acide Gamma Aminobutyrique
GAD	Glutamate Acide Décarboxylase
GDPs	Giant Depolarizing Potentials
Gly	glycine
GlyR	récepteur de la glycine
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
5-HT	sérotonine
-ir	immunoréactivité
lomb	lombaire
Maoa	monoamine oxydase type a
P0	post-natal 0
pCPA	p-chlorophénylalanine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PAF	paraformaldéhyde
sb	substance blanche
Shh	Sonic hedgehog
sg	substance grise
SNC	Système Nerveux Central
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor
TRITC	rhodamine
TTX	tétradotoxine
v	ventricule
zi	zone intermédiaire
zm	zone marginale
zv	zone ventriculaire

# **INTRODUCTION**

De nombreuses fonctions physiologiques sont contrôlées par des réseaux de neurones très spécifiques qui interagissent entre eux de manière complexe à travers tout le système nerveux central. Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont été réalisés pour comprendre, en terme de propriétés cellulaires et synaptiques, le fonctionnement de ces réseaux neuronaux. Si sur certaines préparations d'invertébrés, la structure fonctionnelle de ces réseaux a pu être décrite (Marder and Calabrese, 1996), celle des réseaux numériquement plus nombreux tels qu'on les rencontre dans le système nerveux central des mammifères, reste à ce jour très partiellement comprise. Une des approches possibles pour mieux comprendre l'organisation de ces réseaux est d'analyser leur mise en place au cours du développement. De nombreux travaux indiquent que l'ontogenèse des réseaux de neurones comporte deux phases. La première, très précoce, consiste principalement en des multiplications, des migrations, des croissances cellulaires conduisant à la formation de réseaux immatures ou « proto-réseaux » (Lee and Pfaff, 2001; Lewis, 1996; Pearlman et al., 1998). La seconde phase, plus tardive, va permettre à ces « proto-réseaux » d'acquérir progressivement leurs propriétés adultes. Cette seconde phase a fait l'objet de nombreuses études qui se sont attachées à décrire la maturation de circuits nerveux telle que la rétine (Shatz, 1996), le cortex ou l'hippocampe (Ben-Ari et al., 1989; Khazipov et al., 2001; Leinekugel et al., 1999; Momose-Sato et al., 2003). Bien que ces travaux aient apporté un grand nombre de concepts importants, les données recueillies sur ces réseaux ne permettent pas toujours d'appréhender la signification fonctionnelle des activités générées par ces circuits neuronaux. Par contre, l'étude des réseaux spinaux moteurs permet d'avoir accès à des activités électriques facilement enregistrables et corrélables à des activités motrices connues aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte (Cazalets and Bertrand, 2000; Clarac et al., 2004; O'Donovan et al., 1992).

Le modèle de la moelle épinière, comme les autres modèles de réseaux, présente lui aussi deux phases de développement : une très précoce, basée sur des interactions moléculaires, est

souvent décrite comme exemple dans la mise en place précoce des constituants des futurs réseaux neuronaux (voir revues Jacob and Briscoe, 2003; Lee and Pfaff, 2001), et une autre, ultérieure, basée sur la mise en place de connections liées ou pas à des processus activité-dépendants.

Aux stades précoces de développement (stade embryonnaire (E) 9- E12, chez la souris), le tube neural incluant la future moelle épinière, contient des cellules multipotentes. Ces cellules, localisées dans la zone ventriculaire du tube neurale, peuvent être regroupées en domaines selon le type de gènes qu'elles expriment : on parle de domaines progéniteurs. Ainsi, dans la moelle ventrale, on peut distinguer 5 domaines (p0, p1, p2, pMN et p3) qui vont donner naissance à différents types cellulaires. Les motoneurons vont être parmi les premiers à se différencier à partir de la région pMN (par exemple au stade E10 chez le rat, Matsuda, 2002), les autres régions donnant différents types d'interneurones. Plus tard, des cellules gliales seront générées à partir de ces mêmes régions pMN et p3 (entre les stades E14 et E16 chez le rat, Hall et al., 1996). Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont démontré que la différenciation d'un type cellulaire approprié dépendait d'une signalisation intercellulaire complexe, sous tendue par des signaux inductifs extracellulaires. Ainsi, deux signaux inductifs majeurs sont impliqués dans la différenciation neuronale suivant l'axe ventro-dorsal de la moelle épinière : les protéines « Bone morphogenetic proteins » (BMPs), secrétées par l'ectoderme sus-jacent le tube neural (Lee and Jessell, 1999) et « Sonic hedgehog » (Shh), produite par la notocorde sous le tube neural (Roelink, 1996; Briscoe and Ericson, 1999). La protéine Shh, présente à partir de la plaque basale de la moelle épinière sous forme de gradient de concentration suivant l'axe ventro-dorsal, va contrôler la différenciation des différents types cellulaires dans la partie ventrale du tube neural (Ericson et al., 1996; Roelink et al., 1995). Ce facteur primaire inductif agit sur une cascade de signalisation secondaire constituée de facteurs de transcription qui interagissent également

entre eux par des relations antagonistes. Ces facteurs régulent ultérieurement des gènes effecteurs. L'expression d'une combinaison caractéristique de gènes définit enfin le phénotype neuronal des cellules différenciées. Dans la moelle épinière dorsale, des cascades de signalisation similaires, à partir des BMPs localisées dans la plaque du toit de la moelle épinière, contrôleraient également la genèse de types cellulaires multiples, comme par exemple des interneurons commissuraux et des neurones d'association (Lee and Jessell, 1999). Enfin, une source importante de signaux établissant l'axe rostro-caudal du tube neural a été identifiée dans le mésoderme paraxial, ces signaux, impliquant l'acide rétinoïque, seraient présents sous forme de gradients le long de l'axe rostro-caudal (Ensini et al., 1998; Lumsden and Krumlauf, 1996; Itasaki and Nakamura, 1996).

Alors que les mécanismes cellulaires et moléculaires de la mise en place précoce des éléments constituant les proto-réseaux font l'objet de très nombreux travaux, les processus impliqués dans leur maturation restent encore mal définis. Lors de cette seconde phase, les activités des réseaux peuvent être analysées par des approches électrophysiologiques. Ces dernières permettent d'enregistrer, dès le stade E10 chez la souris, des épisodes rythmiques spontanés impliquant de grandes populations de neurones actives simultanément. Ce type d'activité rythmique spontanée est un phénomène ubiquitaire, omniprésent dans de nombreuses structures du système nerveux central au cours du développement (rétine, hippocampe, moelle épinière, cortex : Ben-Ari, 2001; O'Donovan, 1999; Penn and Shatz, 1999). Cette activité a été démontrée comme jouant un rôle important dans la maturation des réseaux neuronaux, comme par exemple dans la mise en place de connections neuronales appropriées rétino-thalamiques (Shatz, 1996). Dans la moelle épinière de rongeur, des activités spontanées peuvent être enregistrées au niveau des sorties motrices (racines ventrales) ; ces activités, que l'on peut suivre tout au long du développement embryonnaire, sont caractérisées par des bouffées récurrentes de potentiels d'action se propageant

rapidement tout le long de l'axe rostro-caudal (Hanson and Landmesser, 2003; Nakayama et al., 1999; Nakayama et al., 2002; Nishimaru et al., 1996; Ren and Greer, 2003; Yvert et al., 2004). Ces épisodes d'activités, suivis de longues périodes de silence, impliquent presque simultanément les différents niveaux spinaux, et peuvent être qualifiés de « synchrones » par opposition à des activités ségréguées spatialement et impliquant une sous-population des réseaux spinaux (par exemple, les réseaux locomoteurs). Plus tard au cours du développement, les réseaux spinaux embryonnaires perdent leur capacité à générer des épisodes récurrents. Cependant, d'autres activités rythmiques peuvent être induites dans la moelle épinière embryonnaire par des traitements pharmacologiques. Ces activités sont de type locomoteur et correspondent à la mise en jeu de réseaux neuronaux relativement matures, localisés dans la moelle épinière ventrale (Branchereau et al., 2000a; Kudo and Nishimaru, 1998; Kudo et al., 2004; Nakayama et al., 2002; Nishimaru et al., 2000).

Pendant la phase de maturation, les premières activités rythmiques reposent principalement sur une transmission excitatrice. En effet, pendant cette phase de développement, les deux neurotransmetteurs inhibiteurs du système nerveux central adulte, le GABA et la glycine, exercent des effets excitateurs et interviennent dans la genèse des activités spontanées (Hanson and Landmesser, 2003; Branchereau et al., 2002). Lors de la maturation du système nerveux central, la transmission GABA/glycine excitatrice va progressivement basculer vers une transmission synaptique inhibitrice (Stein et al., 2004; Wu et al., 1992), ce basculement étant dû à la maturation de co-transporteurs  $K^+-Cl^-$  (Rivera et al., 1999).

Dans la moelle épinière, si les mécanismes impliqués dans le basculement de la transmission synaptique excitatrice/inhibitrice font l'objet de travaux, l'ontogenèse des populations neuronales intraspinales GABAergique et glycinergique sous-tendant ces inhibitions n'a pas été décrite. De plus, les facteurs inductifs ou répressifs de ce processus

ontogénétique restent également encore peu connus. De nombreux travaux montrent, chez les invertébrés, que les voies modulatrices centrales jouent un rôle prépondérant dans les processus de maturation des réseaux (Fenelon et al., 2003; Le Feuvre et al., 1999). Chez les vertébrés, pour aborder cette problématique, il est nécessaire d'avoir un système où les réseaux cibles et leurs voies modulatrices peuvent être manipulés expérimentalement. Dans cette perspective, là encore, les réseaux locomoteurs spinaux sont d'excellents candidats. En effet, la maturation des réseaux effecteurs moteurs, qui se développent dans la substance grise ventrale, peut-être suivie en parallèle avec la mise en place des voies descendantes bulbo-spinales modulatrices. Cependant, ces relations entre voies modulatrices et réseaux cibles n'ont encore été que peu abordées chez les vertébrés. Les travaux les plus remarquables ont été obtenus sur la moelle épinière du têtard de *Xenopus* démontrant l'implication des voies modulatrices centrales dans la maturation des réseaux moteurs embryonnaires (Sillar et al., 1993). Par contre, chez les mammifères, ces études sont très limitées, voire impossibles, lors du développement *in utero*.

Pour contourner ce problème, une nouvelle préparation de culture organotypique de moelles épinières embryonnaires entières de souris a été récemment mise au point (Branchereau et al., 2002). Cette préparation permet d'avoir un accès direct aux populations de neurones constituant les réseaux spinaux et de « manipuler » les voies descendantes en provenance des centres supraspinaux. Cette préparation unique permet donc pour la première fois d'aborder le rôle de la maturation des réseaux de neurones chez les mammifères et ceci, des niveaux moléculaire et cellulaire jusqu'au niveau intégré.

Récemment, il a été montré sur cette préparation que la suppression de toute innervation sérotoninergique est capable d'accélérer la mise en place des inhibitions intraspinales (Branchereau et al., 2002). Etant donné que ces voies descendantes sérotoninergiques sont parmi les premières à innover la moelle épinière au moment où les inhibitions GABA/glycine

se mettent en place (Ballion et al., 2002), l'hypothèse d'une interaction entre l'arrivée de ces voies 5-HT et la mise en place des phénotypes GABA/glycine a été avancée. Les travaux effectués au cours de cette thèse visent ainsi à étudier 1) la mise en place des populations spinales GABA/glycine dans la moelle épinière de souris, 2) le contrôle de la maturation du système GABAergique par les voies descendantes sérotoninergiques en provenance des noyaux du raphé.

Le premier chapitre présente rapidement les connaissances acquises sur la mise en place des activités rythmiques sur la préparation de moelle épinière embryonnaire de souris. Le second chapitre décrit la mise en place, chez l'embryon, des populations spinales GABAergiques et glycinergiques *in utero*. Enfin, le troisième chapitre démontre, sur des cultures organotypiques de moelle épinière, le rôle joué par les voies descendantes sérotoninergiques sur le développement de la population spinale GABAergique. Le point remarquable de ces travaux est que la sérotonine, contrairement à ce qui est classiquement admis, ne joue pas un rôle inducteur dans la mise en place de la population GABAergique mais au contraire freine son développement.

Une partie des résultats présentés dans le présent mémoire a fait l'objet des

**publications suivantes :**

Ontogenic changes of the GABAergic system in the embryonic mouse spinal cord

**Allain A.-E.**, Baïri A., Meyrand P. and Branchereau P., *Brain Research* 1000 (134-147), 2004

Ontogenic changes of the spinal GABAergic cell population are controlled by the 5-HT system: implication of the 5-HT1 receptor family

**Allain A.-E.**, Meyrand P. and Branchereau P., *J. Neuroscience* 25(38):8714-8724, 2005

Expression of the glycinergic system during the course of the embryonic development in the mouse spinal cord and its co-localization with the GABA immunoreactivity

**Allain A.-E.**, Baïri A., Meyrand P., Branchereau P., *J. Comp. Neurology*, en révision

**Résumés publiés :**

5-HT descending inputs control the maturation of the GABAergic neuronal population in the mouse spinal cord.

**Allain A.-E.**, Branchereau P., Meyrand P., 3<sup>rd</sup> Forum of European Neuroscience 207.1, 2002

Serotonin controls the maturation of the GABAergic neuronal population in the mouse spinal cord.

**Allain A.-E.**, Branchereau P and Meyrand P., *Inmed Conference: Nature and Nurture in Brain Development* 10, 2002

5-HT controls the maturation of the GABAergic neuronal population in the mouse spinal cord.

**Allain A.-E.**, Branchereau P and Meyrand P. *Society for Neuroscience Abstracts* 28, 23.15, 2002

Serotonin slows down the maturation of the GABAergic neuronal population in the mouse spinal cord through 5-HT1 receptor family

**Allain A.-E.**, Meyrand P. and Branchereau P., 4<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, 2004

Expression of the GABAergic system during the course of the embryonic development in the mouse spinal cord and its colocalization with the glycine immunoreactivity

Branchereau P., **Allain A.-E.**, Baïri A., Meyrand P., 4<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, 2004

Expression of the glycinergic system during the course of the embryonic development in the mouse spinal cord and its colocalization with the GABA immunoreactivity

**Allain A.-E.**, Baïri A., Meyrand P. and Branchereau P., *Society for Neuroscience Abstracts*, 2005

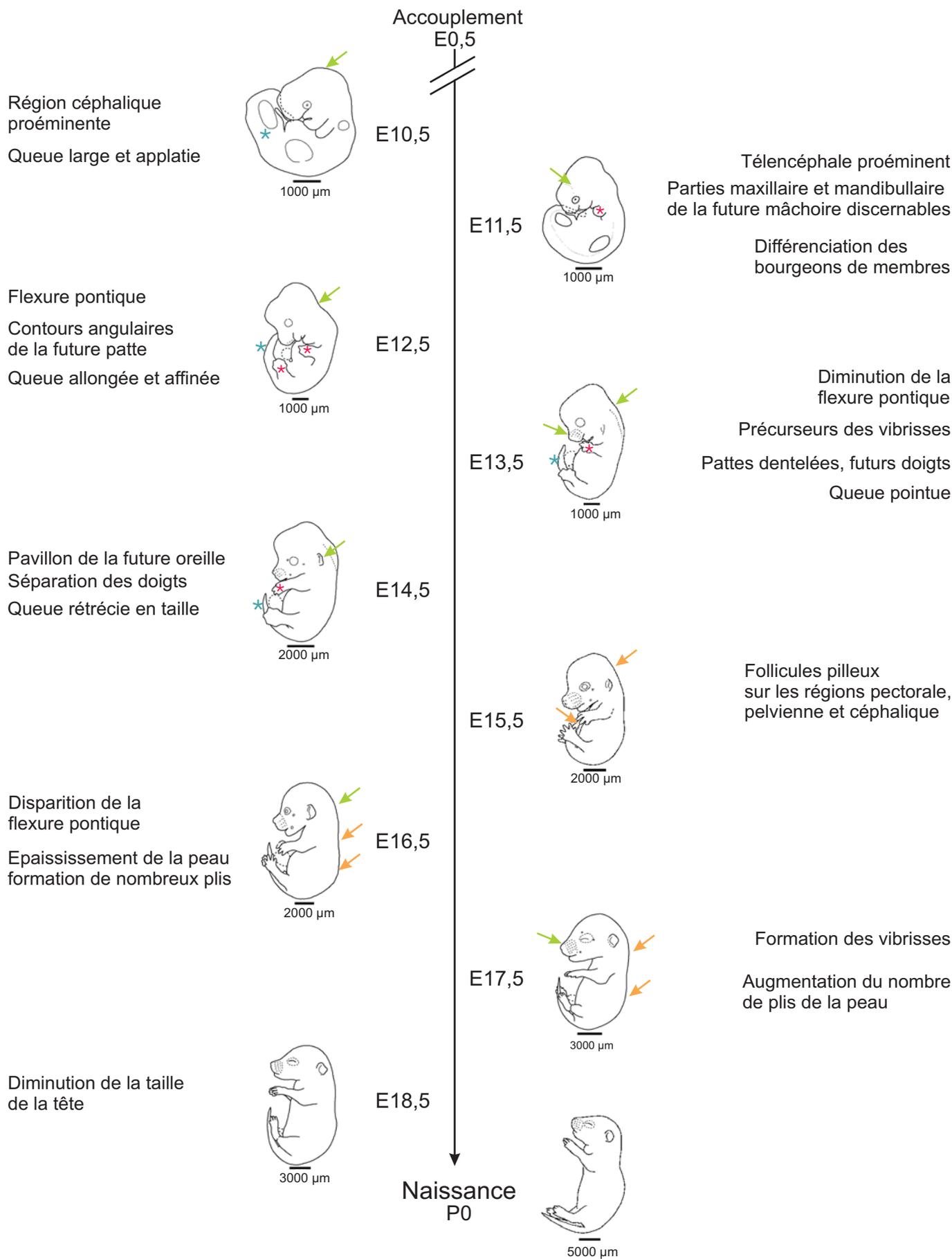
# **MATERIELS ET METHODES**

Les expériences présentées dans ce mémoire ont été réalisées principalement sur des embryons de souris blanches de souche OF1 et sur des nouveaux-nés. Les femelles gestantes ont été achetées chez Charles River Laboratories (Lyon). Des souris knock-out (KO) pour les récepteurs sérotoninergiques 1A ou 1B ont également été utilisées (souche 129-Sv-ter). L'accès aux lignées de souris KO, fabriquées par le Dr. R. Hen (New York) et entretenues au sein de l'animalerie transgénique de l'Université Victor Segalen Bordeaux II gérée par le Dr. Pierre Costet, a pu être possible grâce au Dr. Louis Segu (Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Bordeaux 1). Pour mener à bien cette étude, 620 embryons et 16 nouveaux-nés de souche OF1, ainsi que 76 embryons provenant des lignées KO ont été utilisés.

## **1- DETERMINATION DES STADES DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS**

La gestation chez la souris dure 19 à 20 jours et le jour de développement embryonnaire (E) 0,5 correspond au jour suivant la nuit d'accouplement. C'est l'observation d'un bouchon vaginal au jour 0,5 qui permet de déterminer si la gestation a débuté. Cette vérification a été effectuée chez Charles River Laboratories ou à l'animalerie transgénique de l'Université Bordeaux II. Des embryons de 10,5 à 17,5 jours (stades E10,5 à E17,5) ont été prélevés sur des femelles gestantes. Le jour de la naissance correspond au stade P0 (« post natal day » 0).

Bien que la date d'accouplement soit connue, l'âge des embryons présente une imprécision de 12 heures puisque les animaux sont accouplés la nuit. De plus, étant donné la grande quantité d'embryons présents *in utero* chez les souris gestantes OF1, des variabilités de taille peuvent exister entre les embryons d'une même portée. Pour palier à ce problème, des critères morphologiques (Kaufman, 1992) ont également été utilisés pour caractériser les stades embryonnaires (Figure 1).



**Figure 1 : Caractérisation des stades de développement embryonnaire chez la souris**

La gestation dure 19 à 20 jours, le jour de développement embryonnaire 0,5 (E0,5) correspond au jour suivant la nuit d'accouplement. Le jour de la naissance correspond au stade P0 (« post natal day » 0). L'observation de la région céphalique et de la face de l'embryon (flèches vertes), des membres (astérisques rouges), de la queue (astérisques bleues) et de la peau (flèches oranges) permet de déterminer le stade de développement embryonnaire.

Concernant les stades embryonnaires utilisés au cours de ce travail, le premier critère morphologique concerne **l'évolution de la région céphalique et de la face de l'embryon**. Ainsi, au stade E10,5, la taille de la région céphalique est disproportionnée par rapport à l'ensemble du corps. C'est à ce stade également que se forment les vésicules optiques. Au stade E11,5, la région télencéphalique occupe une place très importante, les parties maxillaire et mandibulaire de la future mâchoire sont également beaucoup mieux discernables et les vésicules optiques se ferment pour se séparer de l'ectoderme de surface (future cornée). Au stade E12,5, une « bosse » caractéristique est observée au niveau de la région caudale du cerveau postérieur (rhombencéphale). On observe ainsi une flexure entre le cerveau moyen (mésencéphale) et le cerveau postérieur, c'est la flexure pontique. Cette démarcation entre ces deux régions diminue au stade E13,5 et disparaît au stade E16,5. A partir du stade E13,5, l'emplacement des futures vibrisses est discernable sur la face de l'embryon mais elles ne se formeront qu'au stade E17,5. A partir du stade E14,5, le pavillon de la future oreille s'agrandit. Enfin, la taille de la tête par rapport au reste du corps va diminuer progressivement jusqu'au stade E18,5.

L'**observation des membres** de l'animal au cours du développement constitue un deuxième critère morphologique. En effet, les bourgeons des membres sont visibles au stade E10,5. Ces bourgeons se différencient en deux régions distinctes à partir du stade E11,5 : une partie proximale (futur bras) et une partie périphérique (future patte). Le développement des membres antérieurs est toujours plus avancé que celui des membres postérieurs. Au stade E12,5, la future patte présente un contour angulaire, de forme polygonale. Les premiers signes de doigts, palmés, sont visibles au stade E13,5. Les doigts des pattes antérieures sont complètement indépendants au stade E14,5, un jour après pour les pattes postérieures. La différenciation des pattes se poursuit aux stades plus tardifs de développement.

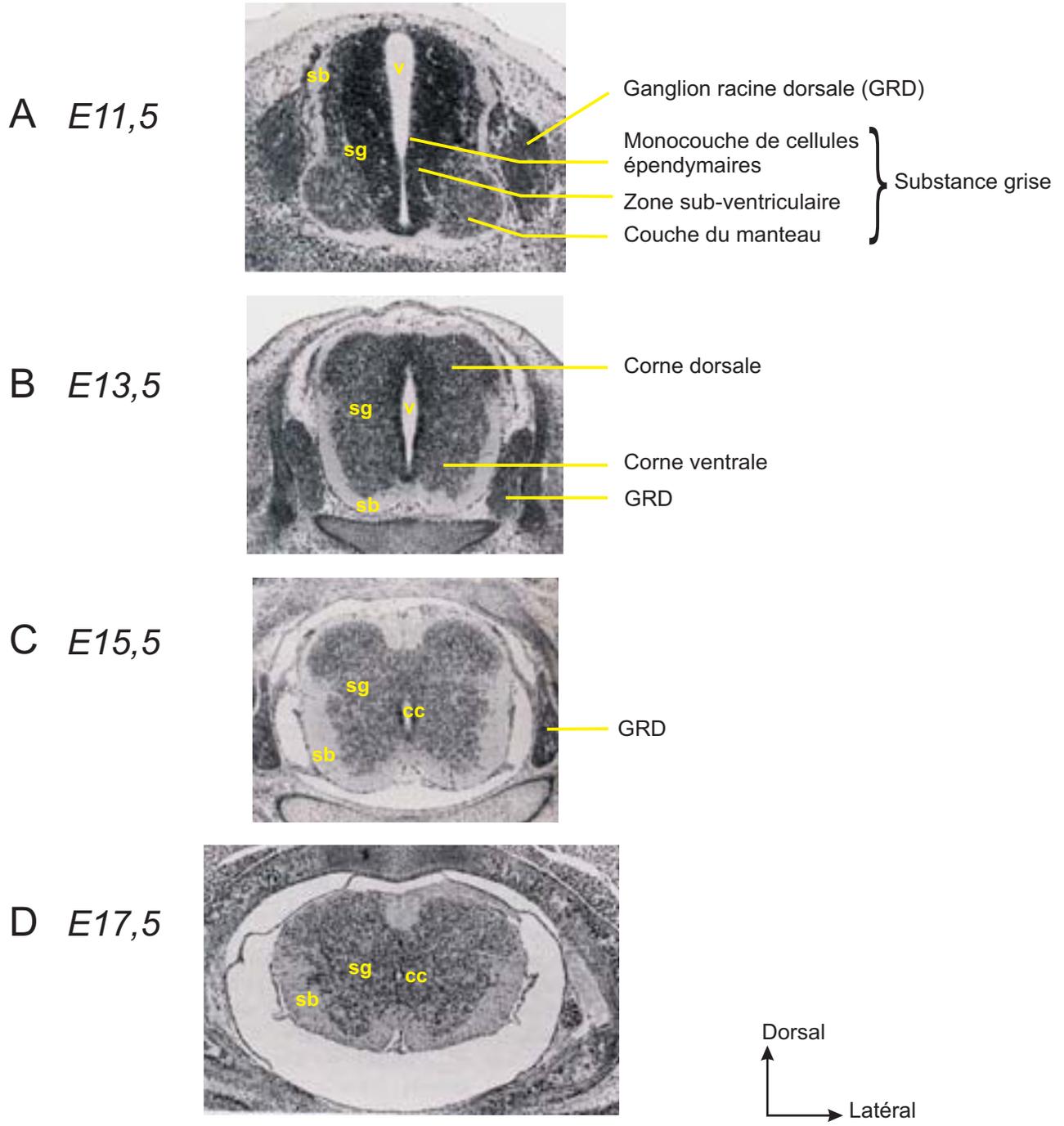
Le troisième critère se base sur l'**observation de la queue** de l'animal. Au stade E10,5, la queue est très large et aplatie. Elle devient plus étroite et s'allonge au stade E12,5, s'affine, se rétrécit et devient pointue au stade E13,5. Aux stades plus tardifs de développement, le tronc augmentant en taille, la queue devient proportionnellement plus courte mais en fait sa taille varie peu.

Enfin, nous nous sommes basés sur l'**évolution de la peau** de l'animal. Jusqu'au stade E13,5, la peau est très fine et transparente puis elle s'épaissit. Au stade E16,5, de nombreux plis sont visibles au niveau de la région pectorale et du tronc, puis au niveau du cou et des membres au stade E17,5. Des follicules pileux apparaissent également sur les régions pectorale, pelvienne et céphalique et au niveau du tronc au stade E15,5.

## **2- PRESENTATION DE LA PREPARATION UTILISEE : LA MOELLE EPINIÈRE EMBRYONNAIRE DE SOURIS**

### *a) Différences morphologiques au cours du développement*

Au cours de l'ontogenèse, l'organisation morphologique de la moelle épinière va changer drastiquement (Figure 2). La proportion entre substance grise et substance blanche et la forme du canal central vont varier énormément en fonction du stade de développement. Ainsi, au stade E11,5, la future substance grise, composée des cellules épendymaires progénitrices de la zone sub-ventriculaire et des cellules du manteau, constitue pratiquement la totalité de la moelle épinière (Fig. 2A). Le bord de la moelle, très fin, constitue la zone marginale qui deviendra la substance blanche. Le ventricule (futur canal central) a une forme caractéristique très allongée avec une partie dorsale beaucoup plus volumineuse que la partie ventrale. Entre les stades E12,5 et E15,5, la moelle épinière s'élargit. La largeur de la zone sub-ventriculaire ainsi que la taille du canal central diminuent progressivement alors que la proportion de



**Figure 2 : Remodelage morphologique de la moelle épinière entre les stades E11,5 et E17,5**

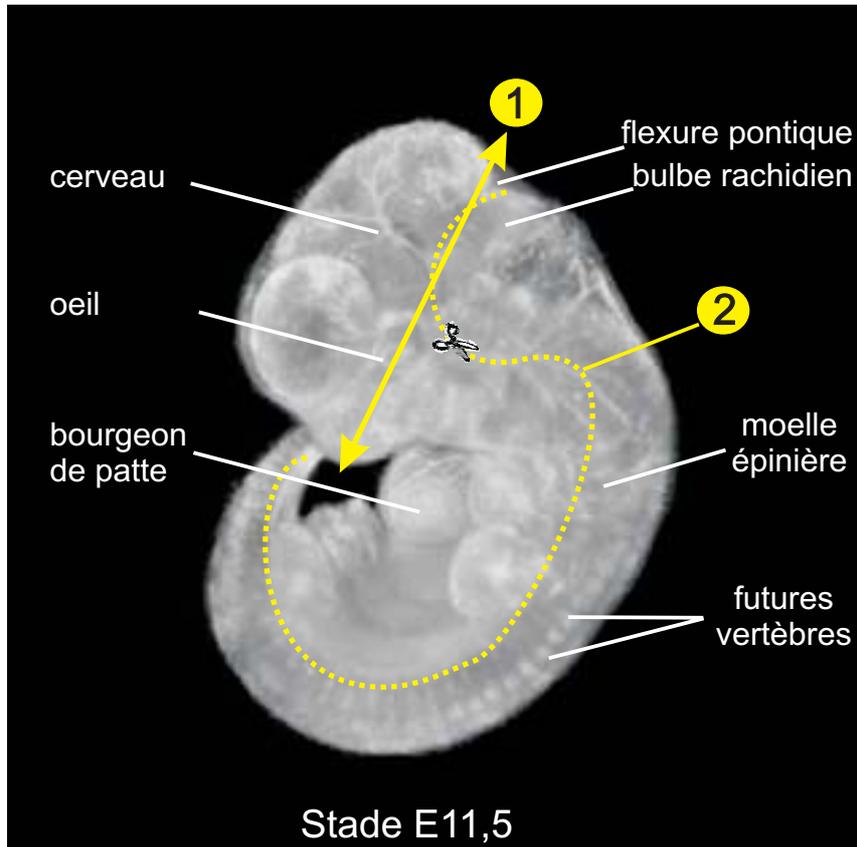
Sections transversales de moelle épinière thoracique de souris. (A) Au stade E11,5, la future substance grise est majoritaire (couche de cellules épendymaires et couche du manteau), la lumière du tube neural (futur canal central) est étendue et a une forme très allongée, avec une partie dorsale beaucoup plus volumineuse que la partie ventrale. (B et C) Aux stades E13,5 et E15,5, la moelle s'élargie, la proportion de substance blanche augmente graduellement et la taille du canal central diminue progressivement. La substance grise acquiert une forme caractéristique de « papillon » et la corne dorsale tend à avoir un volume plus important que la corne ventrale. (D) Au stade E17,5, la lumière du canal central est pratiquement obstruée.

Abréviations : v : ventricule, sb : substance blanche ; sg : substance grise ; cc : canal central

substance blanche augmente graduellement du fait de la mise en place progressive des voies ascendantes et descendantes qui parcourent cette région de la moelle suivant un axe rostro-caudal. La substance grise acquiert quant à elle progressivement sa forme caractéristique de « papillon » et la corne dorsale tend à avoir un volume plus important que la corne ventrale (Fig. 2B, 2C). Enfin, entre les stades E16,5 et E17,5, la forme définitive de la moelle est acquise, la lumière du canal central est pratiquement obstruée (Fig. 2D).

*b) Prélèvement de la moelle épinière*

Après anesthésie de la souris gestante au diéthyléther, l'utérus est prélevé par laparotomie. Les trompes utérines sont ensuite ouvertes dans le sens de la longueur. Les poches amniotiques contenant les embryons sont prélevées puis ouvertes pour en extraire les embryons (sans le placenta, le sac amniotique, le cordon ombilical). Enfin, les embryons sont « rincés » dans un tampon phosphate salin 0,1 M (PBS), pH 7,2 et maintenu entre 6 et 8°C. La suite de la dissection s'effectue sous une loupe binoculaire. Les animaux sont décapités au niveau de la flexure pontique (Figure 3, flèche jaune) et fixés à l'aide de minuties dans une boîte de Pétri recouverte de polymère (Silicone elastomer : Sylgard, Arrow électronique), contenant du PBS. Jusqu'au stade E15,5, la moelle épinière, avec le bulbe et les ganglions rachidiens, est détachée délicatement du cartilage de la future colonne vertébrale à l'aide de pinces fines (Figure 3, pointillés), puis elle est placée dans une boîte de Pétri dont le fond a été préalablement tapissé de Sylgard. Aux stades plus tardifs de développement, les vertèbres puis les racines nerveuses dorsales et ventrales sont coupées une à une pour dégager l'ensemble moelle épinière/bulbe rachidien. La préparation est alors isolée dans une boîte de Pétri au fond de laquelle une couche d'environ 1mm de Sylgard a été coulée.



**Figure 3 : Représentation schématique des principales étapes de prélèvement de la moelle épinière embryonnaire de souris**

Étape① : Les animaux sont décapités au niveau de la flexure pontique (flèche). Étape② : La moelle épinière est délicatement détachée du cartilage de la future colonne vertébrale (cf. pointillés) à l'aide de pinces fines.

### **3- COUPES TRANSVERSALES DE MOELLE EPINIÈRE**

Directement après prélèvement, la moelle épinière est fixée 2 heures dans du paraformaldéhyde (PAF) 2%, à température ambiante. Après trois rincages dans du PBS 0,1M, la moelle est cryoprotégée par des bains de sucrose : tout d'abord dans une solution de sucrose 15% (préparée dans 0,1M de tampon phosphate) pendant 24h à 4°C puis dans une solution de sucrose 30% pendant 24h à 4°C. La moelle épinière est ensuite sectionnée en plusieurs segments. Un segment brachial et un segment lombaire sont isolés. Ces segments sont inclus dans une résine plastique (Tissue-Tek, OCT compound 4583, Sakura, USA) et congelés dans de l'isopentane refroidi grâce à de l'azote liquide (à -80°C). Des coupes transversales de moelle épinière de 25µm peuvent enfin être effectuées à -20°C avec un cryostat (Kryostat 1720, Leitz). Ces coupes sont déposées sur des lames de verre préalablement gélatinées. Le protocole pour gélater les lames est le suivant : immersion des lames dans une solution de gélatine 2% + alun de chrome 0,1% (préparée dans de l'eau distillée) puis séchage à l'étuve à 40°C pendant 48h. L'utilisation des lames gélatinées est nécessaire pour améliorer l'adhésion des sections de moelle épinière. Des coupes séries de moelle épinière ont été réalisées afin de pouvoir comparer les marquages obtenus avec différents anticorps sur des mêmes niveaux spinaux. Une fois séchées à température ambiante, les lames peuvent alors être conservées à -20°C.

### **4- TECHNIQUE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE**

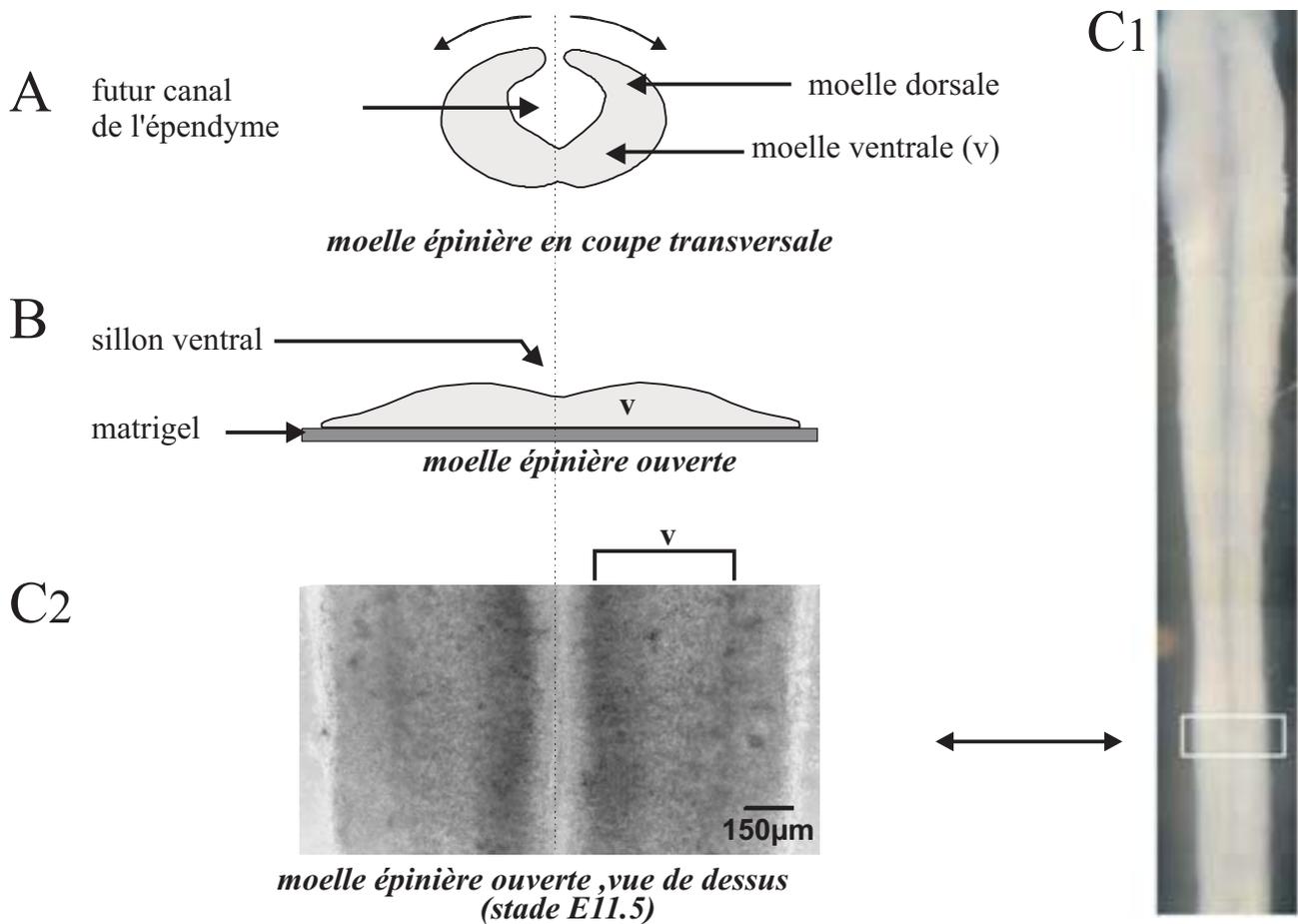
#### *a) Mise en culture*

Le prélèvement des embryons et des moelles épinières avec le bulbe rachidien s'effectue sous une hotte à flux laminaire en condition stérile. Des conditions strictes d'asepsie doivent

être respectées pendant toute la durée de la manipulation. Le matériel est ainsi stérilisé au préalable.

Les moelles épinières embryonnaires avec le bulbe rachidien, prélevées au stade E11,5 sont disposées dans une boîte de culture (35mm de diamètre, Falcon) sur un substrat (Matrigel, B-D) permettant l'attachement et la migration des cellules adhérentes ainsi que la différenciation cellulaire. Le Matrigel renferme des éléments de la matrice extracellulaire, éléments obtenus à partir de la tumeur murine Engelbreth-Holm-Swarm. Bien que tous les éléments présents dans le matrigel ne soient pas identifiés (milieu non défini), on sait que les principaux composants de ce gel sont : la laminine, le collagène de type IV, l'HSPG, l'entactine ainsi que plusieurs facteurs de croissance dont le TGF- $\beta$ , l'EGF, l'IGF-I. Ce substrat est utilisé dilué au  $\frac{1}{4}$  dans un milieu de culture de base contenant des sels, des acides aminés (dont la L-glutamine, source d'énergie indispensable pour les cellules de mammifères) et des vitamines indispensables (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Hank's Balanced Salt Solution 2/1 volumes). A ce milieu de culture, est ajoutée 10% de sérum de veau fœtal, contenant les facteurs de croissance et hormones nécessaires à la multiplication des cellules embryonnaires, et des antibiotiques pour éviter les contaminations bactériennes (pénicilline 20u/ml et streptomycine à 0,02mg/ml). Les moelles doivent être placées horizontalement dans le Matrigel / milieu de culture aussi profondément que possible afin de bien adhérer à la boîte. Elles sont ouvertes « comme un livre » le long du sillon dorsal ceci permettant l'accès direct à la face ventrale (Figure 4).

Les boîtes de culture sont enfin placées dans un incubateur à 37°C, réglé à 6-8% de CO<sub>2</sub> en saturation d'humidité.



**Figure 4 : Culture organotypique des moelles épinières embryonnaires de souris**

(A) La moelle épinière, prélevée au stade E11,5, est ouverte le long du sillon dorsal puis étalée sur un lit de matrigel afin d'avoir accès à la substance grise ventrale. (B) Représentation schématique d'une coupe transversale de la moelle épinière ouverte et maintenue en culture.

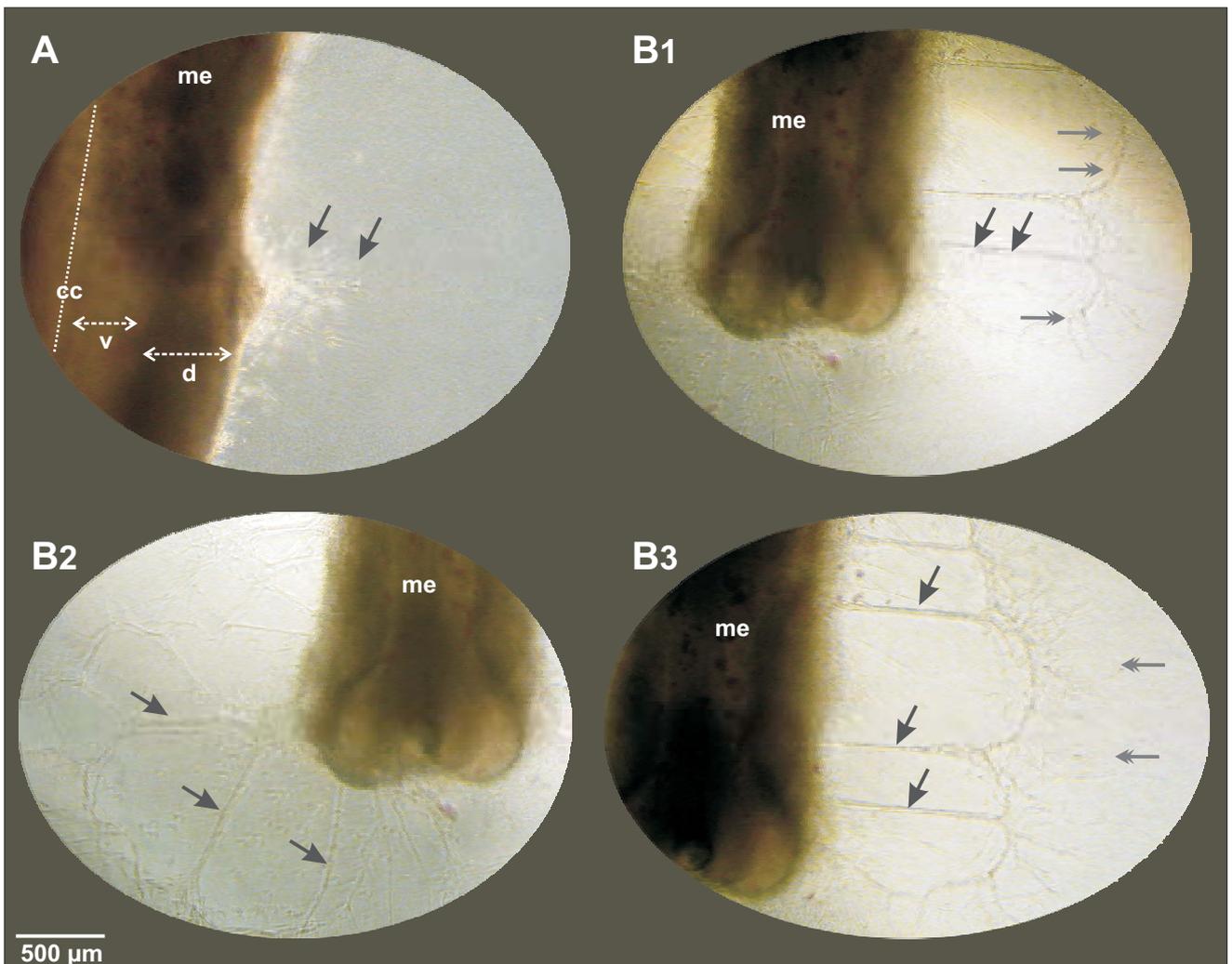
(C<sub>1</sub>) Photomicrographie d'une moelle épinière maintenue en culture organotypique. (C<sub>2</sub>) Détail de la photographie C<sub>1</sub> : portion de moelle épinière lombaire. A noter l'accessibilité de la substance grise ventrale et le sillon ventral (ligne pointillée).

Abréviation : v : substance grise ventrale

*b) Maintien en culture*

Tous les deux jours, les boîtes de culture sont délicatement sorties de l'incubateur afin d'y ajouter quelques microlitres de milieu de culture. Une observation au microscope permet d'apprécier si la préparation a survécu ou non en culture (Figure 5). En effet, cette observation permet de vérifier 1) l'ancrage de la moelle épinière au substrat, 2) l'absence de contaminations bactériennes et enfin 3) la croissance de neurites le long de la moelle épinière qui est un signe indéniable du bon développement de la culture. Ainsi, au bout de deux jours de culture (Fig. 5A), on peut observer des petits neurites partant des extrémités de la moelle et des ganglions rachidiens. Puis ces neurites poussent vers la périphérie de la boîte pour former des réseaux de petites fibres (Fig. 5B1-B3).

Parallèlement, des marquages immunohistochimiques de la population neuronale ont été réalisés sur les cultures organotypiques pour s'assurer que les neurones se différenciaient dans la moelle épinière maintenue en culture à partir d'un stade précoce de développement (E11,5). L'utilisation d'un marqueur spécifique des neurones, l'anticorps anti-Neuronal nuclei (NeuN), a ainsi été utilisé. En effet, il a été montré par immunohistochimie chez la souris, que cet anticorps marque la majorité des cellules neuronales dans toutes les régions du cerveau ainsi que dans la moelle épinière adulte (Mullen et al., 1992). Seules quelques neurones tels que les cellules de Purkinje du cervelet, les cellules mitrales du bulbe olfactif et les cellules photoréceptrices de la rétine ne sont pas NeuN positives. L'anti NeuN est également un marqueur de différenciation neuronale et son expression est aussi restreinte au système nerveux au cours de l'ontogenèse : l'antigène NeuN est exprimé dans le tube neural dès le stade de développement E9,5 ; au stade E12,5, l'immunoréactivité NeuN est détectée dans la corne ventrale, la corne dorsale et les ganglions des racines dorsales. En revanche, la zone ventriculaire qui contient les cellules progénitrices ainsi que les plaques du plancher, du toit et la zone marginale (future substance blanche) sont dépourvues de marquage (Mullen et al.,



**Figure 5 : Evolution des pousses neuritiques issues de moelles épinières maintenues en culture organotypique entre J2 et J4**

(A) Après deux jours de culture, des pousses neuritiques sont visualisées sur le bord de la moelle épinière brachiale, au niveau d'un ganglion rachidien. (B1-3) Après quatre jours de culture, formation de long neurites (flèches) et d'un maillage (doubles flèches) sur l'extrémité lombaire de la moelle épinière.

Abréviations : cc : canal central, d : moelle dorsale, me : moelle épinière, v : moelle ventrale

1992). Afin d'évaluer si les populations neuronales se différencient en culture organotypique, un marquage de la population neuronale a été réalisé sur 8 moelles épinières maintenues 2 à 6 jours en cultures organotypiques. Dans toutes les expériences, un nombre très important de cellules NeuN positives a été visualisé dans toute la moelle épinière (données non illustrées). Toutefois le nombre de cellules NeuN-ir semble beaucoup plus faible dans la zone ventriculaire comme cela a été décrit dans la littérature (Mullen et al., 1992).

*c) Manipulations : transsection et/ou pharmacologie*

Deux techniques nous ont permis de manipuler la moelle épinière en culture organotypique.

1. L'ablation du bulbe rachidien permet de supprimer toutes les informations venant des centres supraspinaux et prévient donc la mise en place des voies descendantes supraspinales.
2. La pharmacologie permet d'ajouter des substances actives dans le milieu de culture et ainsi d'observer les répercussions sur la moelle épinière. Les drogues suivantes ont été utilisées :

pCPA (p-chlorophénylalanine, Sigma, 10 $\mu$ M), inhibiteur de l'enzyme de synthèse de la sérotonine ; pCPA (10 $\mu$ M) + 5-HT (sérotonine, Sigma, 5 $\mu$ M) afin de n'avoir que de la sérotonine exogène dans la préparation ; WAY 100635 (Sigma, 5 $\mu$ M), antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ; SB 224289 hydrochloride (Tocris, 5 $\mu$ M), antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> ; ketanserin tartrate salt (Sigma, 5 $\mu$ M), antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2A/2B</sub> ; 3-tropanyl-indole-3-carboxylate methiodide (3-TI-3CM, Sigma, 5 $\mu$ M), antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> ; tétrodotoxine (TTX, Sigma, 1 $\mu$ M), bloquant des canaux sodiques voltage-dépendants. Un milieu haut potassium (8mM) (dépolairise le potentiel de membrane des cellules nerveuses) a été également utilisé.

## **5- TECHNIQUES IMMUNOHISTOCHIMIQUES**

Les moelles épinières entières sont fixées 2 heures à température ambiante dans une solution de paraformaldehyde 2% (dans du PBS 0.2M (pH 7,5) et sucrose 2%) directement après prélèvement ou après avoir été maintenues en culture organotypique. Puis elles sont rincées dans du PBS 0,1M. Les coupes transversales de moelles épinières sont réhydratées dans du PBS 0,1M, pendant 20 minutes à température ambiante.

Les différentes préparations peuvent alors être incubées 48 heures à 4°C avec un anticorps primaire dilué dans une solution de PBS 0,1M avec 0,2% de BSA (bovine serum albumin) et 0,1% de Triton X-100. Après rinçages, les préparations sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié. Après trois rinçages de 10 minutes, les moelles épinières ou les coupes de moelles sont montées dans 90% de glycérol et 10% de PBS auquel on ajoute 2,5% de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO, Dako Cytomation) pour réduire l'extinction du signal fluorescent.

Anticorps primaires utilisés : anti-GABA polyclonal fait chez le lapin (1/200, Sigma) ; anti-glycine polyclonal fait chez le rat (1/3000, fourni par Dr. D. Pow) ; anti-5-HT fait chez le lapin (1/5000, Fourni par Pr. G. Tramu, Université Bordeaux1) ; anti-NeuN (Neuronal nuclei) monoclonal fait chez la souris (1/500, Chemicon) ; anti-Islet1/2 monoclonal fait chez la souris (1/100, DSH Bank) ; anti-MAP1B-P (isoforme phosphorylée de la microtubule associated protein 1B) monoclonal fait chez la souris (1/150, fourni par Dr. F. Nothias, Université P. et M. Curie Paris V)

Anticorps secondaires utilisés : anti-IgG de lapin fait chez la chèvre, couplés à la fluorescéine (FITC) (1/100) ; anti-IgG de souris fait chez le lapin, couplés à la rhodamine (TRITC) (1/100) ; anti-IgG de souris fait chez la chèvre, couplés à la rhodamine (TRITC) (1/100) ; anti-IgG de rat fait chez la biche, couplés à la rhodamine (TRITC) (1/400).

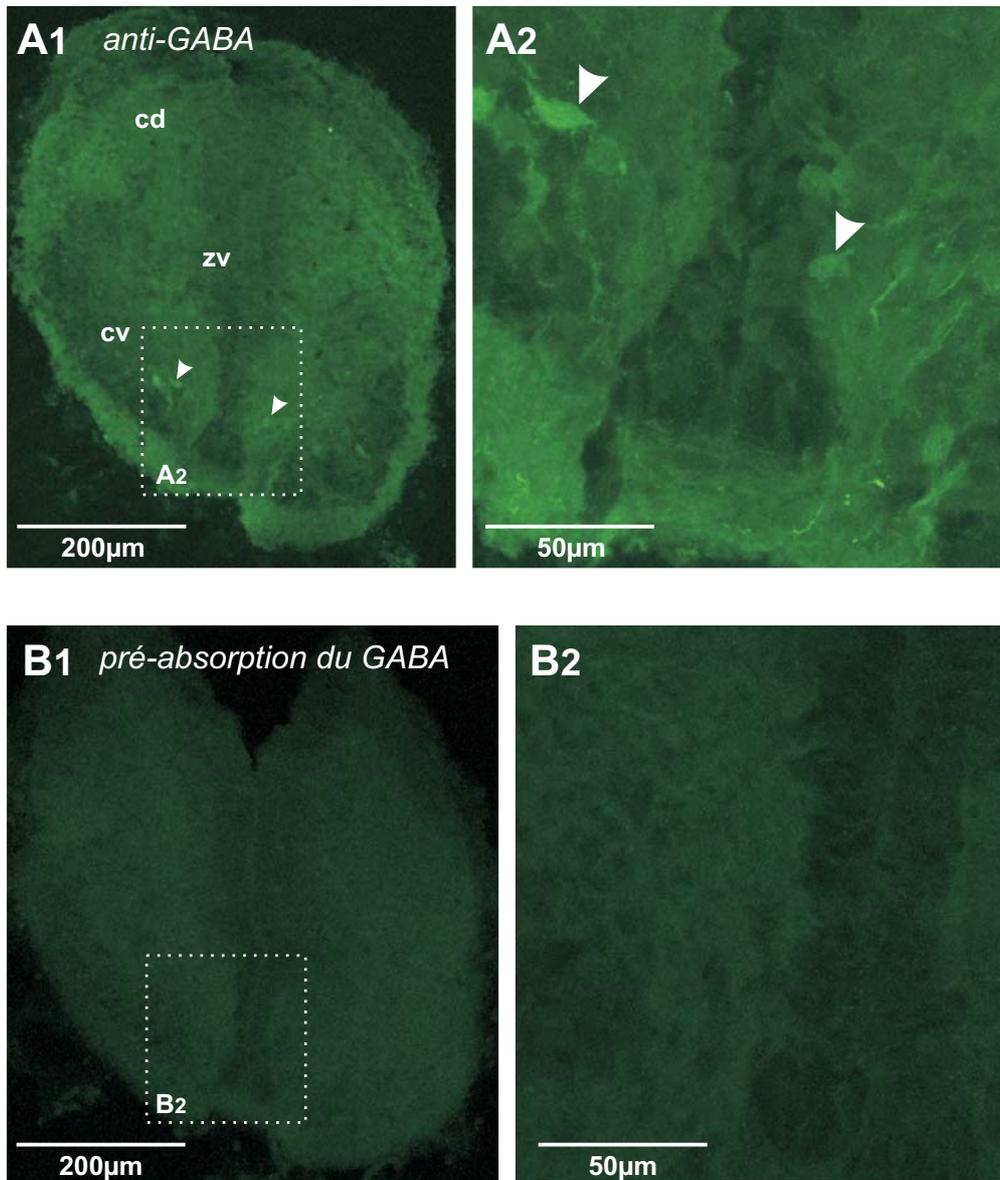
### **Vérification de la spécificité de l'anticorps anti-GABA**

Des expériences contrôles ont été effectuées pour vérifier la spécificité du marquage GABA. En effet, lors des manipulations présentées dans ce mémoire, les moelles épinières ont été fixées avec du paraformaldéhyde alors que l'anti-gène GABA-BSA utilisé par le fournisseur pour immuniser les lapins a été fabriqué en utilisant du glutaraldéhyde comme agent de couplage (GABA-glutaraldéhyde-BSA). Des coupes transversales de moelles épinières d'embryons au stade E12,5, E13,5 et E14,5 ont été incubées avec des concentrations croissantes du conjugué GABA-glutaraldéhyde-BSA (4 $\mu$ M, 40 $\mu$ M et 400 $\mu$ M) afin de pré-absorber le marquage GABA. Aucun marquage n'a été observé lorsque des concentrations de conjugué de 40 $\mu$ M ou plus ont été utilisées (Figure 6).

La spécificité des autres anticorps a été vérifiée dans différentes études : anti-glycine : (Pow et al., 1995; Vaney et al., 1998) ; anti-5-HT : (Tramu et al., 1983) ; anti-MAP1B-P (Black et al., 1994; Soares et al., 2002) ; anti-NeuN : (Mullen et al., 1992) ; anti-Islet1/2 : (Ericson et al., 1992).

## **6- ACQUISITIONS DES IMAGES EN MICROSCOPIE CONFOCALE**

Les préparations ont été observées avec un microscope confocal BX51 Olympus Fluoview 500 équipé d'un laser argon (émet à 488 nm), d'un laser hélium néon vert (émet à 543 nm) et d'un laser hélium néon rouge (émet à 633 nm). Des coupes optiques sériées de différentes épaisseurs ont été effectuées dans chaque préparation en fonction de l'objectif utilisé (1,6 $\mu$ m au x10, 1,2 $\mu$ m au x20, 0,6 $\mu$ m au x40, 0,4 $\mu$ m au x60). Sauf indication contraire, les images présentées dans ce mémoire sont en général des projections de 15-30 coupes optiques.



**Figure 6 : Préabsorption de l'immunoréactivité anti-GABA**

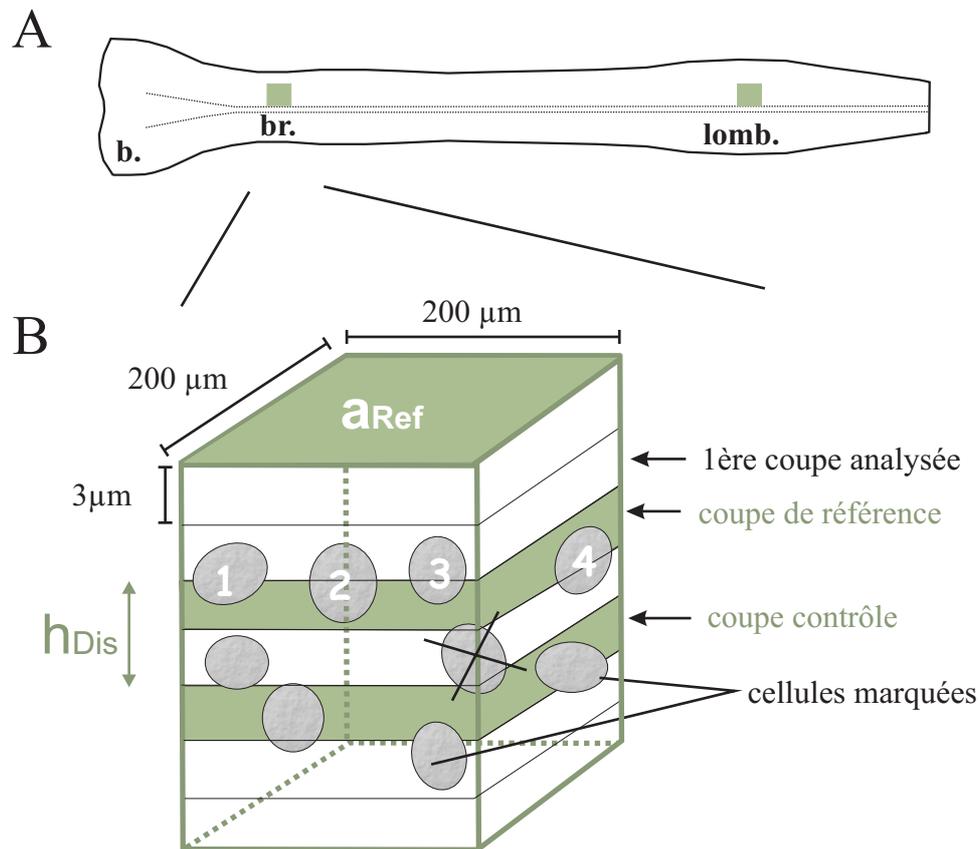
(A1-2) Cellules immunoréactives pour le GABA (têtes de flèches) dans la substance grise ventrale en situation contrôle. (A2) Vue élargie à partir de A1. (B1-2) Aucun marquage GABA n'est détecté lorsque l'anti-corp anti-GABA est pré-absorbé avec 40µM de conjugué GABA-glutaraldéhyde-BSA. (B2) Vue élargie à partir de B1. Coupes transversales niveau lombaire, stade E12,5.  
 Abréviations : cv : corne ventrale, cd : corne dorsale, zv : zone ventriculaire

## **7- ANALYSE DES IMAGES ET QUANTIFICATIONS**

### *a) Expériences de marquages simples*

La densité des cellules immunoréactives a été déterminée dans la substance grise de la moelle épinière brachiale et lombaire, sur moelles entières et sur coupes transversales. Les cornes dorsales et ventrales ont également été analysées sur coupes transversales alors que seule la zone ventrale a été étudiée dans les cultures organotypiques de moelles épinières entières. La moelle s'affaissant sur les côtés en culture organotypique, la partie dorsale est difficilement accessible. La méthode du « physical disector » a permis d'estimer le nombre de somata marqués en évitant de compter deux fois la même cellule (Coggeshall and Lekan, 1996). Pour cela, deux coupes optiques confocales ont été utilisées : la première à 6µm de profondeur (à cette profondeur, les anticorps pénètrent bien dans le tissu) sert de coupe de référence ; la deuxième à 12µm de profondeur est utilisée comme coupe contrôle. L'épaisseur des coupes (3µm) a été déterminée en fonction du diamètre moyen des cellules observées (diamètre moyen des cellules GABAergiques :  $6,4 \pm 0,17\mu\text{m}$ ,  $n = 40$ , diamètre minimum 4µm, maximum 9µm ; diamètre moyen des cellules glycinergiques:  $6,2 \pm 1,6\mu\text{m}$ ,  $n = 20$ , diamètre minimum 4µm, maximum 10µm), cette épaisseur devant être légèrement inférieure au diamètre moyen des cellules. Seules les cellules marquées sur la coupe de référence sont comptées, celles observées sur les deux coupes (référence et contrôle) ne sont pas comptabilisées (Figure 7). La densité est ensuite calculée en divisant le nombre de cellules marquées par le volume du « disector » ( $V_{\text{dis}}$ ), où  $V_{\text{dis}}$  est égale à l'aire de la section observée ( $200 \times 300\mu\text{m}^2$  pour les cultures organotypiques,  $200 \times 200\mu\text{m}^2$  pour les coupes transversales) multipliée par la hauteur du « disector » (6µm).

Pour chaque stade et chaque niveau étudié, ces quantifications ont été généralement réalisées sur 6 embryons provenant de 3 femelles différentes. Les histogrammes présentés dans les figures de ce mémoire correspondent donc à la moyenne de ces 6 valeurs.



**Figure 7 : Représentation schématique de la technique utilisée pour comptabiliser les cellules immunoréactives : « physical disector »**

(A) Les cellules marquées sont quantifiées dans la substance grise ventrale brachiale et lombaire. La localisation des niveaux spinaux analysés est indiquée par les carrés verts. (B) Les cellules présentes uniquement dans la coupe de référence sont comptabilisées (4 cellules numérotées de 1 à 4). Celles présentes à la fois dans la coupe de référence et la coupe contrôle ne sont pas comptées (voir cellule barrée). Epaisseur des coupes confocales : 3  $\mu\text{m}$

Abréviations : br. : niveau brachial ; lomb. : niveau lombaire ;  $a_{\text{Ref}}$  : aire des coupes optiques ;  $h_{\text{Dis}}$  : hauteur du disector.

b) Doubles marquages

Pour quantifier les cellules doublement marquées (par exemple double marquage GABA / glycine), 2 ou 3 différentes coupes confocales (d'épaisseur 0,6 $\mu\text{m}$  à l'objectif x40) provenant d'une même coupe transversale ont été analysées, ceci sur 3 embryons provenant de 2 mères différentes pour chaque stade étudié. Pour chaque coupe confocale, dans une aire de 200x200  $\mu\text{m}^2$ , toutes les cellules GABAergiques ou glycinergiques ont été comptées et dessinées sur une feuille transparente apposée à l'écran de l'ordinateur. Les cellules doublement marquées ont été détectées en comparant la localisation des cellules GABAergiques et des cellules glycinergiques sur le dessin et en utilisant le logiciel Fluoview 500 qui permet de superposer les deux images (l'une correspondant au marquage GABA en vert, l'autre à la glycine en rouge) et d'afficher les cellules doublement marquées en jaune.

## **8- ANALYSES STATISTIQUES**

Les valeurs présentées, dans ce mémoire, sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  écart type. Le logiciel Sigma Stat a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques. Lorsque la distribution des échantillons est normale (sous forme d'une courbe de Gauss) et que les variances sont comparables, des tests paramétriques ont été réalisés pour évaluer la signification statistique des différences observées (test t ou bien analyse de variance sur rang (Anova) suivie de comparaisons multiples appariées (test *post hoc* de Bonferroni)). Lorsque la normalité de la distribution des échantillons n'est pas vérifiable, des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés pour comparer les différentes valeurs. Ces derniers ont été préférentiellement utilisés car les effectifs des groupes comparés sont faibles (n=6). Une analyse de variance sur rangs (test de Kruskal-Wallis) suivie de comparaisons multiples appariées (test *post hoc*, méthode de Dunn) a ainsi été réalisée grâce au logiciel SigmaStat. La

différence entre deux valeurs est significative lorsque  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## **Chapitre I**

# **MATURATION DES ACTIVITES RYTHMIQUES DANS LA MOELLE EPINIÈRE DE SOURIS AU COURS DU DEVELOPPEMENT**

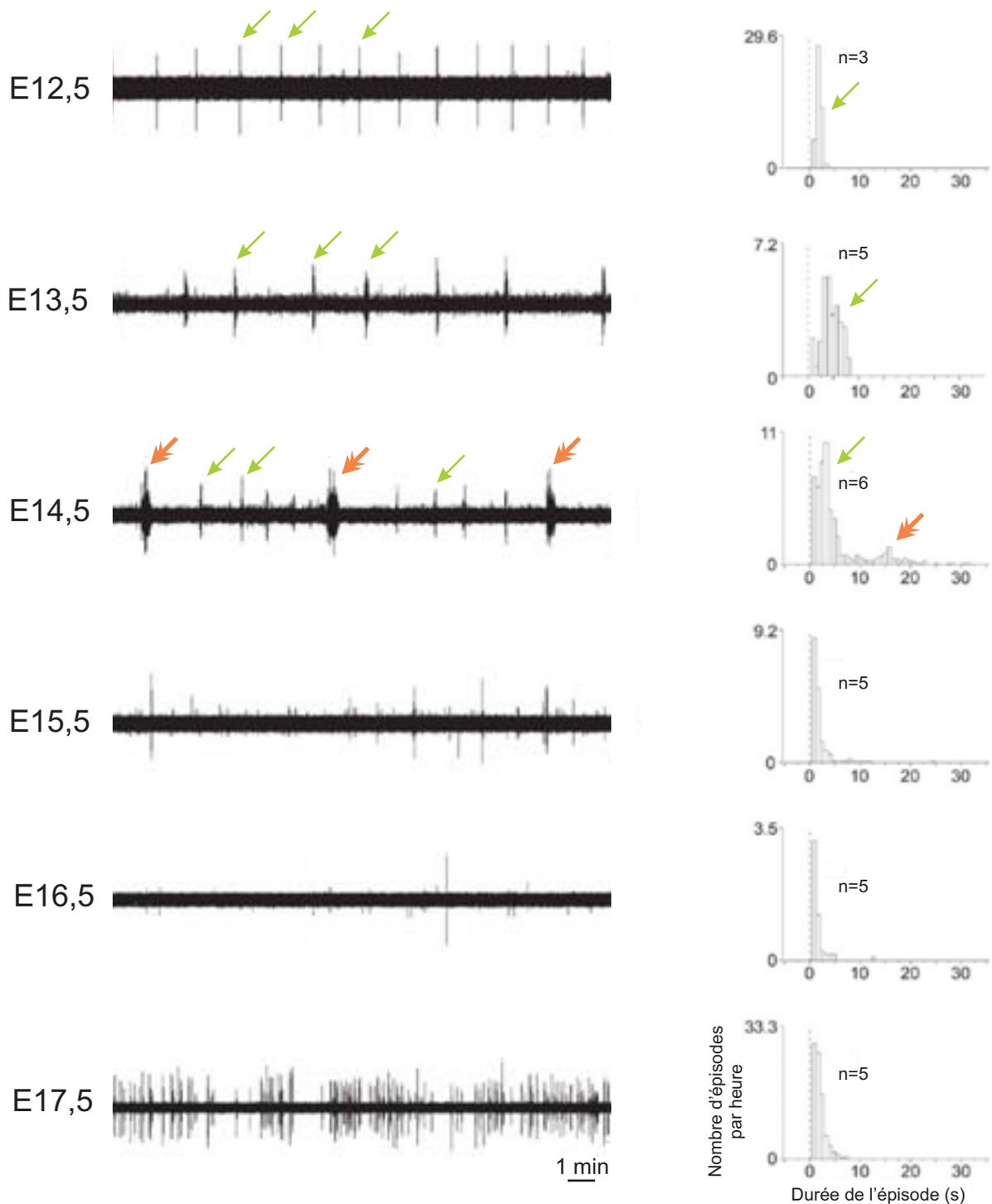
Il est maintenant clairement démontré que les réseaux de neurones en développement expriment des activités rythmiques spontanées et ceci quelque soit la structure du système nerveux et quelque soit les espèces (pour revue voir par exemple O'Donovan, 1999). La première mise en évidence de ces activités rythmiques spontanées a été réalisée chez l'embryon de poulet. En effet, l'observation de mouvements spontanés chez l'embryon, grâce à l'électromyographie et à l'électrophysiologie, a permis de montrer l'existence de ce phénomène (Hamburger and Balaban, 1963). Deux caractéristiques de ces activités précoces, sont qu'elles sont dans une période développementale définie et qu'elles expriment des bouffées d'activités suivies de périodes de quiescence. Ces activités rythmiques spontanées ont été décrites avant et après la formation des synapses chimiques. Avant la formation des synapses et donc des réseaux de neurones, ces activités sont sous-tendues par des vagues calciques qui favorisent l'extension des neurites au niveau des cônes de croissance (Gu and Spitzer, 1997). Après la formation des synapses chimiques, les activités spontanées mettent en jeu l'activation synchrone des différents composants d'un réseau, par le biais de leurs interactions synaptiques. De telles activités spontanées peuvent être enregistrées dans l'hippocampe de rat, entre les stades P0 (stade où les connections synaptiques commencent à être établies entre neurones pyramidaux et interneurons) et P10. Ces activités, désignées sous le nom de Giant Depolarizing potentials ou GDPs, sont caractérisées par de larges dépolarisations récurrentes et périodiques qui se propagent lentement et selon un gradient rostro-caudal dans tout l'hippocampe, à partir de la région CA3. Le GABA joue un rôle central dans la genèse des GDPs via son rôle dépolarisant mais d'autres systèmes neurochimiques sont impliqués en particulier les récepteurs glutamatergiques (pour revue, voir Ben-Ari, 2001). Dans la rétine, des activités spontanées ont également été observées grâce à des enregistrements multi-électrodes et à l'imagerie calcique (Meister et al., 1991; Wong et al., 1995). Les cellules amacrines de la rétine sont connectées entre elles par des

jonctions synaptiques et émettent des oscillations de façon spontanée. L'activation d'un nombre critique de cellules dans une même région est à l'origine de vagues d'activités qui se propagent dans toute la rétine. D'après le modèle de Feller (Feller et al., 1997), après la genèse d'une vague, les cellules amacrines présentent une période réfractaire de 40 à 60 secondes pendant laquelle elles ne peuvent pas être de nouveau recrutées. Ces vagues calciques se propagent très lentement (50-200 $\mu\text{m/s}$ ) et sont sous-tendues par une transmission essentiellement cholinergique mais le GABA joue également un rôle important. Ainsi, via les récepteurs GABA<sub>A</sub>, le GABA induit une réduction de la fréquence des vagues et peut même les bloquer.

#### **A- MISE EN PLACE DES ACTIVITES SPONTANEEES DANS LA MOELLE EPINIÈRE DE SOURIS**

Des activités spontanées, décrites comme étant très stéréotypées ont été également enregistrées dans la moelle épinière par des techniques électrophysiologiques (électrodes de succion) (Branchereau et al., 2002; Hanson and Landmesser, 2003; Nakayama et al., 1999; Nakayama et al., 2002; Nishimaru et al., 1996; Ren and Greer, 2003). Ces activités sont formées, aux stades précoces de développement, d'un rythme unique de bouffées d'activité (environ 2 à 5 s dans la durée) qui embrase toute la moelle épinière avec un léger décalage entre les différents niveaux spinaux.

Dans la moelle épinière de souris, une étude récente (Yvert et al., 2004) a montré que deux types de rythmes pouvaient également caractériser ces activités spontanées, mais seulement à un stade précis de développement (Figure 8). Dans cette étude, les activités motrices spontanées ont été caractérisées jour après jour entre les stades E12,5 et E17,5 grâce à des enregistrements au niveau des sorties motrices des réseaux spinaux par succion des racines ventrales au niveau cervical, thoracique et lombaire de la moelle épinière. Ainsi, les



**Figure 8 : Développement des activités motrices spontanées dans la moelle épinière embryonnaire de souris**

Enregistrement de racines ventrales au niveau lombaire. Un seul type d'activité régulière est enregistré aux stades E12,5 et E13,5 (flèches vertes). Au stade E14,5, deux rythmes, constitués de bouffées courtes pour l'un et de bouffées longues pour l'autre (doubles flèches orange), sont observés. Les activités spontanées tendent à disparaître aux stades E15,5 et E16,5. A noter qu'une activité erratique réapparaît à E17,5.

premiers stades étudiés E12,5 et E13,5 présentent un seul type d'activité régulière très synchrone entre les différents niveaux de la moelle épinière. Puis, au stade E14,5, deux rythmes différents coexistent : un rythme rapide constitué d'épisodes courts (bouffées de 3 à 4 secondes) et un rythme lent constitué d'épisodes longs (durée de 10 à 20 secondes). Après ce stade, les activités motrices spontanées tendent à disparaître à E15,5 et surtout à E16,5. Une autre forme d'activités spontanées beaucoup plus erratiques réapparaît au stade E17,5.

Les activités spontanées évoluent donc de manière importante au cours du développement embryonnaire et chaque stade présente une activité caractéristique. En outre, bien que les activités longues observées au stade E14,5 apparaissent de façon synchrone le long de la moelle épinière, des observations plus détaillées ont permis de remarquer que la structure temporelle de ces bouffées est différente d'un niveau à l'autre. En particulier, ces bouffées expriment une structure rythmique au niveau lombaire et une structure tonique au niveau thoracique. Ainsi, aux vues de ces résultats, le stade E14,5 serait un stade charnière où les réseaux, à l'origine synchrones, commenceraient à se ségréger. Dans la moelle épinière embryonnaire de souris, les activités spontanées sont donc enregistrées dans une fenêtre temporelle étroite, entre les stades E11,5 et E15,5.

Parallèlement, les réseaux neuronaux impliqués dans la genèse des comportements moteurs élémentaires tels que la respiration ou la locomotion vont s'organiser dans la moelle épinière. Ainsi, aux stades tardifs de développement, des activités locomotrices organisées, identiques à celles obtenues sur les réseaux complètement matures, peuvent être générées par les réseaux spinaux.

## **B- MISE EN PLACE DES ACTIVITES DE TYPE LOCOMOTEUR**

Grâce à des traitements pharmacologiques (5-HT et/ou NMDA), on peut induire, chez des nouveaux-nés, des activités de type locomoteur que l'on enregistre au niveau des racines

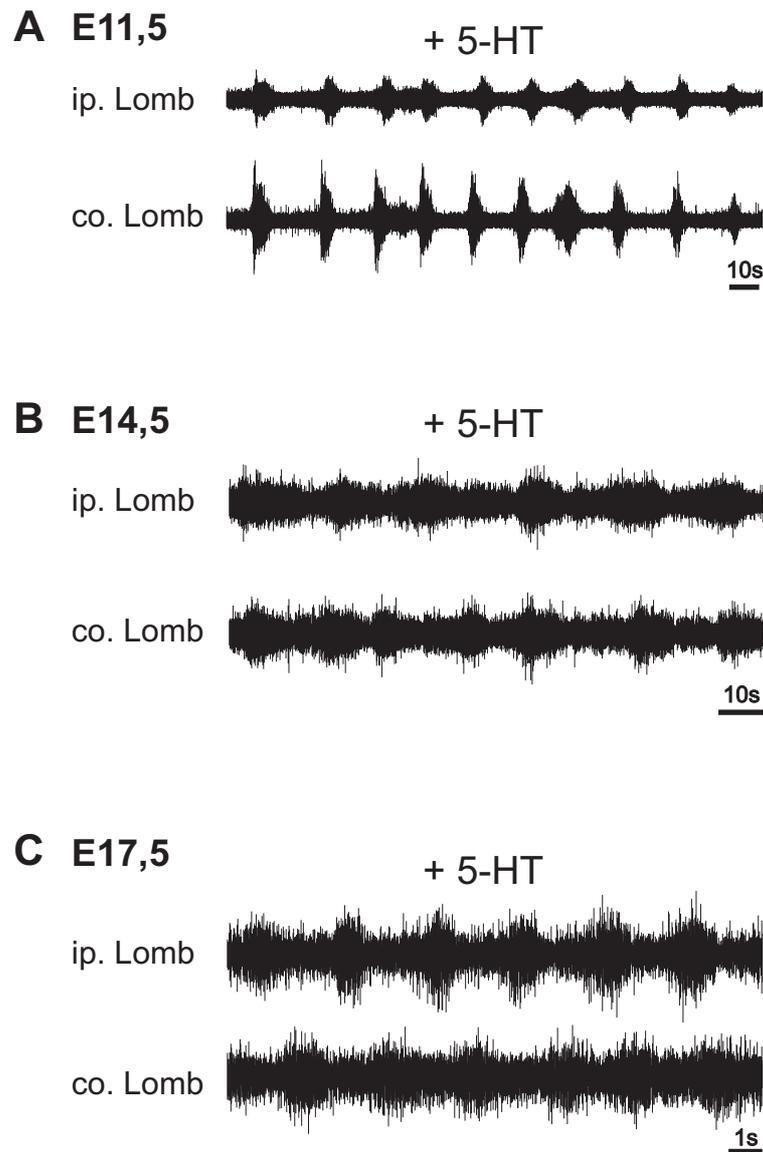
ventrales de la moelle épinière (locomotion fictive). Ces activités ont été caractérisées par des alternances droite/gauche et fléchisseur/extenseur (Cazalets et al., 1995). Au cours du développement embryonnaire, les premières activités induites par la 5-HT sont enregistrées au stade E11,5. La maturation de ces réseaux spinaux se fait progressivement pendant la vie embryonnaire. Chez le rat, l'alternance droite/gauche est observée au stade E18,5 alors que l'alternance fléchisseurs/extenseurs n'est enregistrée qu'au stade E20,5 (Iizuka et al., 1998; Kudo et al., 2004). La mise en place de l'alternance gauche/droite caractérisant ces activités de type locomoteur induites par la 5-HT a été également étudiée chez la souris (Branchereau et al., 2000a). Trois phases ont été discernées : (1) aux stades précoces de développement embryonnaire (E11,5 à E13,5), les activités rythmiques enregistrées au niveaux des racines ipsi- et contra-latérales lombaires sont synchrones (Fig. 9A); (2) au stade E14,5, l'activité rythmique est irrégulière et asynchrone (Fig. 9B); et enfin (3) l'alternance entre les deux racines ipsi-et contra-latérales est observée au stade E17,5 (Fig. 9C).

Les mécanismes à l'origine de cette alternance ne sont pas bien élucidés. Une des hypothèses privilégie le rôle des neurotransmetteurs GABA et glycine. En effet, ces deux neurotransmetteurs, classiquement inhibiteurs chez l'adulte, présentent des effets excitateurs au cours du développement embryonnaire (Wu et al., 1992).

### **C- MISE EN PLACE DE LA TRANSMISSION INHIBITRICE**

#### **GABA/GLYCINE DANS LA MOELLE EPINIÈRE**

Aux stades précoces de développement embryonnaire, les activités rythmiques précoces reposent principalement sur une transmission excitatrice multiple. En effet, le GABA et la glycine ainsi que l'acétylcholine et le glutamate exercent des effets excitateurs aux stades précoces de développement. Aux stades plus tardifs de développement, la transmission excitatrice GABA/glycine va basculer vers une transmission inhibitrice. Ce



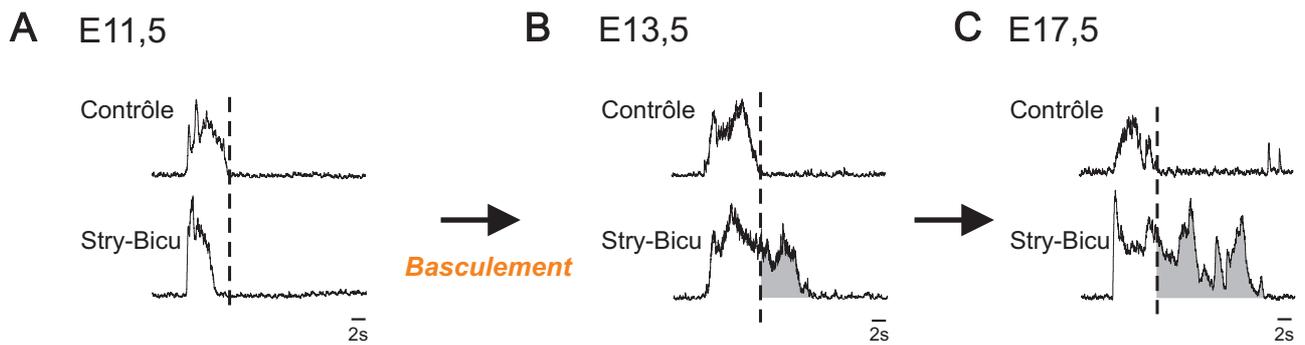
**Figure 9 : Mise en place des activités rythmiques de type locomotrices induites par la 5-HT dans la moelle épinière lombaire**

(A) Au stade E11,5, l'activité rythmique induite par la 5-HT est synchronisée entre les deux racines ventrales lombaires ipsi- et contra-latérales (ip. et co. Lomb). (B) Au stade E14,5, l'activité rythmique devient peu régulière et la synchronie n'est plus visible. (C) Au stade E17,5, la 5-HT induit un rythme moteur caractérisé par une alternance entre les deux racines lombaires ipsi- et contra-latérales.

basculement a été mis en évidence dans la moelle épinière de souris (Branchereau et al., 2002) par l'observation des effets de bloqueurs des récepteurs GABA<sub>A</sub> (bicuculline) et glycine (strychnine) sur les activités spontanées générées par les réseaux spinaux, à différents stades de développement (Figure 10). Au stade E11,5, l'application de bicuculline (30µM) et de strychnine (5µM) induit une diminution de la durée des bouffées d'activité spontanée (bouffées de potentiels d'action). A ce stade de développement, la transmission GABA<sub>A</sub>/glycinergique a donc un rôle excitateur dans la génération de l'activité spontanée. Par contre, aux stades E13,5 et E17,5, stades pendant lesquels la transmission excitatrice glutamatergique devient prépondérante, l'application de ces deux antagonistes augmente la durée des bouffées de potentiels d'action et donc bloque la transmission inhibitrice (désinhibition). Le passage d'une transmission excitatrice à inhibitrice se fait donc autour du stade E13,5 chez la souris.

Les mécanismes cellulaires responsables de l'apparition des inhibitions commencent à être connus. Ils reposent sur des modifications du gradient chimique des ions chlorures (Cl<sup>-</sup>) dont le potentiel d'équilibre ( $E_{Cl^-}$ ) varie durant la maturation. Aux stades précoces de développement,  $E_{Cl^-}$  a une valeur très supérieure au potentiel de membrane des neurones, ainsi lorsque les canaux chlorure s'ouvrent, la membrane se dépolarise pour tendre vers la valeur de  $E_{Cl^-}$  (excitation). En revanche, aux stades plus tardifs de développement,  $E_{Cl^-}$  a une valeur plus négative, ainsi l'ouverture des canaux chlorure n'entraîne plus une très forte dépolarisation mais exerce un rôle inhibiteur. La modification de ces gradients d'ions Cl<sup>-</sup> est sous tendue particulièrement par la mise en place du co-transporteur KCC2, responsable de l'extrusion des ions Cl<sup>-</sup> (Rivera et al., 1999).

Par contre, les facteurs inducteurs ou répresseurs contrôlant le passage d'une transmission GABA/glycine excitatrice à inhibitrice ne sont pas élucidés. Ces facteurs peuvent être génétiques et/ou épigénétiques. Parmi les facteurs épigénétiques, les voies



GABA/glycine excitateur

GABA/glycine inhibiteur

**Figure 10 : Passage d'une transmission synaptique excitatrice GABA/glycine vers une transmission inhibitrice à partir du stade E13,5 chez la souris**

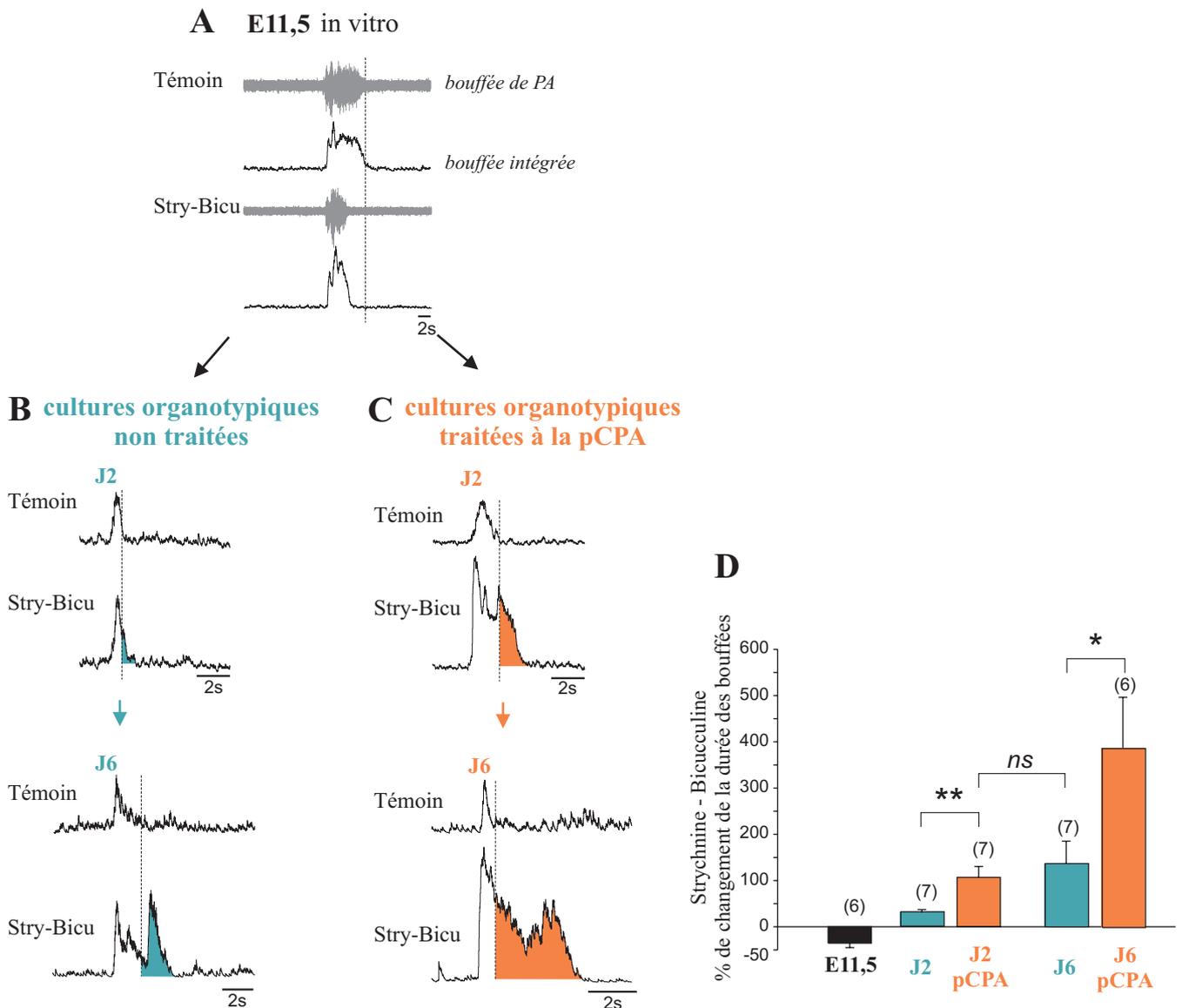
Au stade E11,5, l'application de Strychnine/Bicuculline (Stry-Bicu) entraîne une diminution de la durée des bouffées d'activité électrique (bouffées de potentiels d'action ; ici la trace est une intégration du signal). Au stade E13,5, la même application de Stry/Bicu induit une augmentation de la durée des bouffées. Au stade E17,5, l'augmentation de la durée des bouffées est plus importante qu'au stade E13,5. Le GABA et la glycine exercent un effet excitateur au stade E11,5 (en rouge) et inhibiteur à partir du stade E13,5 (en vert).

Modifiée d'après Branchereau et col., 2002

modulatrices 5-HT sont des candidates potentielles puisqu'on sait qu'elles envahissent progressivement le système nerveux central au cours du développement (Gaspar et al., 2003).

#### **D- ROLE DE LA SEROTONINE SUR LA MISE EN PLACE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GABA/GLYCINE INHIBITRICE**

La transmission synaptique inhibitrice GABA/glycine se met en place à partir des stades E13,5-E15,5. De plus, à partir de ces stades, les activités spontanées et les activités induites par la sérotonine dans les futurs réseaux spinaux locomoteurs présentent progressivement des caractéristiques nouvelles témoignant de leur maturation. Ces évolutions, observées au niveau spinal, sont concomitantes à l'arrivée des voies descendantes supraspinales dans la moelle épinière. Parmi ces voies descendantes, les axones contenant la bioamine 5-HT sont les plus précoces à envahir la moelle épinière (Ballion et al., 2002; Rajaofetra et al., 1989). Il a été montré, dans le laboratoire, que la sérotonine joue un rôle important dans la maturation de la transmission synaptique GABA<sub>A</sub>/glycine (Figure 11). Sur des cultures organotypiques de moelles épinières de souris traitées chroniquement par l'inhibiteur de synthèse de la 5-HT (la pCPA), les activités spontanées ont été enregistrées en présence ou non de strychnine 5µM/bicuculline 30µM (Branchereau et al., 2002). Sur des cultures non traitées à la pCPA, au stade E11,5, la strychnine/bicuculline entraîne une diminution de la durée des bouffées de potentiels d'action. Après 2 à 6 jours de culture, la même application de strychnine/bicuculline induit une augmentation de la durée des bouffées, augmentation d'autant plus importante que le stade de développement est avancé. Sur les cultures traitées à la pCPA, l'augmentation induite par le traitement strychnine/bicuculline est potentialisée. Ainsi, ces travaux ont permis de montrer que la sérotonine retarde la maturation des inhibitions dans la moelle épinière.



**Figure 11 : Mise en place plus précoce de la transmission synaptique inhibitrice GABA<sub>A</sub>/glycine en l'absence de 5-HT**

(A) Au stade E11,5, la Stry-Bicu entraîne une diminution de la durée des bouffées de potentiels d'action (traces en gris : bouffée de potentiels d'action ; trace en noir : traces intégrées). (B) Sur les cultures non traitées (présence de 5-HT), après 2 à 6 jours de culture (J2, J6), la même application de Stry-Bicu induit maintenant une augmentation de la durée des bouffée d'autant plus importante que le stade de développement est avancé. (C) Sur les cultures traitées à la pCPA (absence de 5-HT), aux mêmes stades de développement, l'augmentation induite par l'application de Sty-Bicu est potentialisée. (D) Analyse quantitative révélant une différence significative entre J2 et J2 pCPA (\*\*p<0,01) et entre J6 et J6 pCPA (\*p<0,05), différence non significative (ns) entre J2 pCPA et J6 (ns). Valeurs entre parenthèses : nombre de préparations.

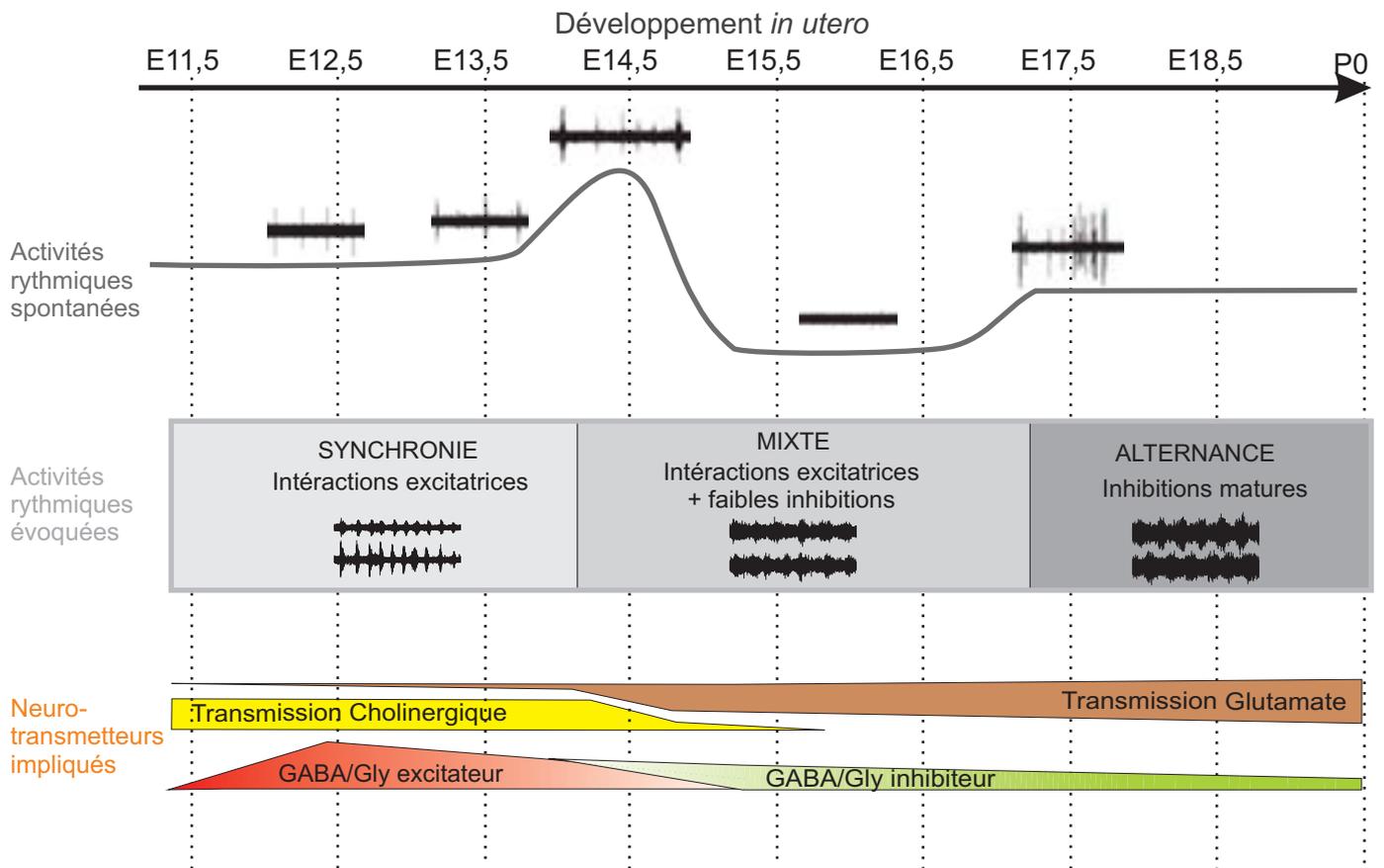
En conclusion, l'ensemble des connaissances acquises, au laboratoire, sur la préparation de moelle épinière embryonnaire de souris grâce à l'électrophysiologie est récapitulé sur la Figure 12. Quatre phases peuvent être distinguées :

- une phase précoce entre les stades E11,5 et E13,5 : les activités spontanées enregistrées au niveau des racines ventrales de la moelle épinière sont constituées d'un seul type de rythme rapide, les activités de type locomoteur induites par la sérotonine sont synchrones, et les systèmes neurochimiques sous-tendant ces activités, impliquent majoritairement l'acétylcholine, le GABA et la glycine, tous ces neurotransmetteurs étant excitateurs.

- le stade E14,5 présente des évolutions ontogéniques remarquables : à ce stade uniquement, les activités spontanées présentent deux types de rythmes (rythme rapide et rythme lent). De plus, les activités de type locomoteur commencent à présenter des signes d'alternances. Elles sont sous tendues par des interactions excitatrices mais aussi par de faibles inhibitions. C'est également vers ce stade de développement que le GABA et la glycine basculent d'une fonction excitatrice à inhibitrice. Enfin, la transmission cholinergique diminue au profit de la transmission synaptique glutamatergique.

- entre les stades E15,5 et E16,5 : aucune activité spontanée n'est enregistrée dans la moelle épinière, les activités de type locomoteur induites par la 5-HT présentent le même comportement qu'au stade E14,5. La transmission synaptique GABA/glycine devient inhibitrice et la transmission glutamatergique devient prépondérante.

- Enfin, à partir du stade E17,5, les systèmes spinaux présentent des caractéristiques typiques des réseaux matures : l'alternance est observée dans les activités de type locomoteur. La transmission est mixte : glutamatergique excitatrice et GABA/glycine inhibitrice. L'activité spontanée enregistrée est très erratique et peut présenter des épisodes d'activités locomotrices alternés.



**Figure 12 : Schéma synoptique de l'ontogenèse des principaux systèmes spinaux chez la souris**

Au stade E14,5, les activités rythmiques spontanées sont intenses et présentent sous deux formes de rythmes : un rythme rapide constitué d'épisodes courts et un rythme lent constitué d'épisodes longs (activités rythmiques spontanées, en gris foncé). C'est à ce stade également que les réseaux lombaires générateurs de rythme commencent à produire des activités électriques asynchrones entre les côtés gauche/droit (activité rythmique motrice, en gris clair). Les activités rythmiques sont sous tendues d'abord par une transmission majoritairement GABA/glycine et cholinergique puis par une transmission majoritairement glutamatergique, le GABA et la glycine basculant d'une fonction excitatrice à inhibitrice autour du stade E14,5 (transmission synaptique, en orange).

## **Chapitre II**

# **MISE EN PLACE DES POPULATIONS SPINALES GABA ET GLYCINERGIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT *IN UTERO***

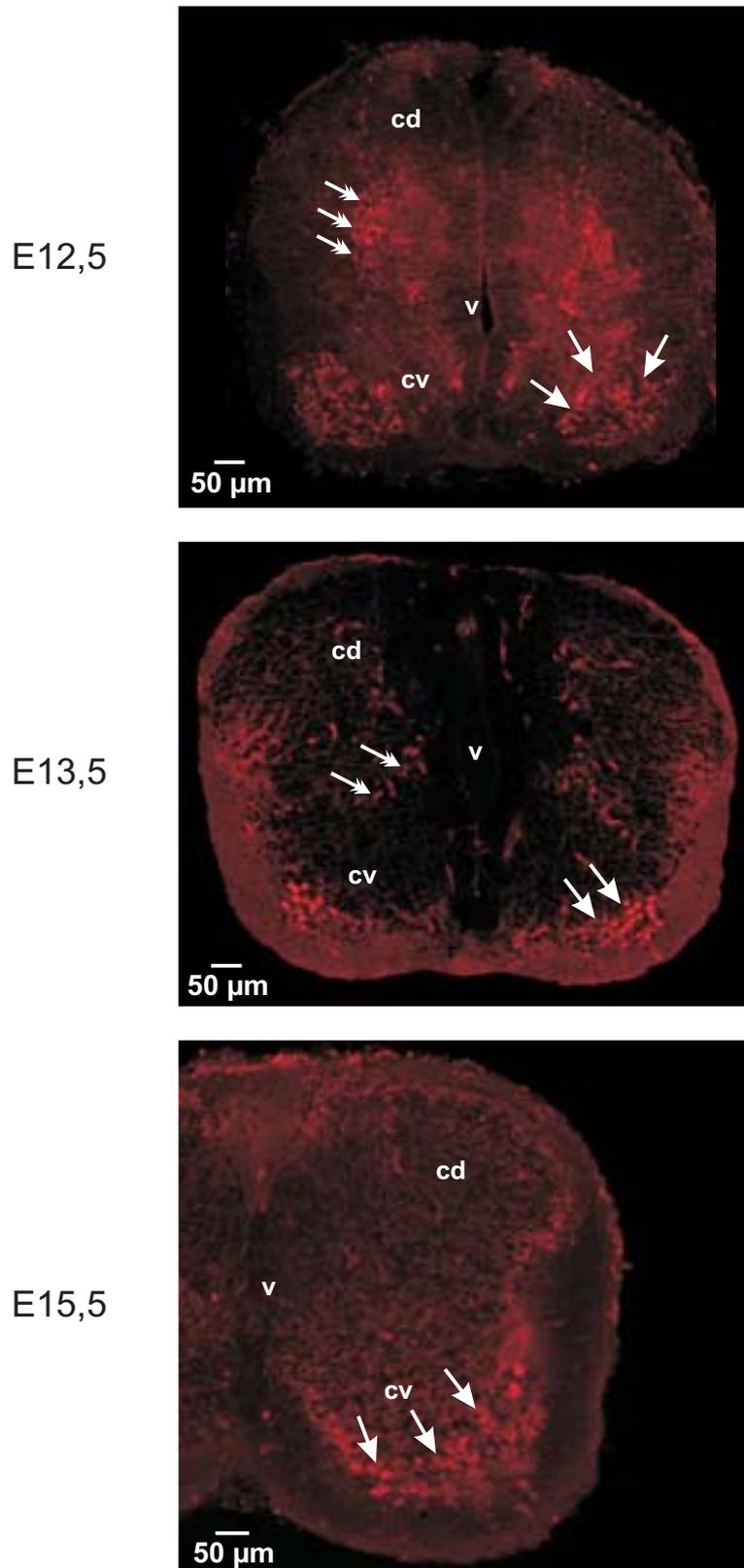
Chez les mammifères, au cours de l'ontogenèse, lors des phases précoces de développement, les réseaux neuronaux expriment des activités rythmiques spontanées qui reposent principalement sur une transmission excitatrice. En effet, à ces stades de développement, les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs chez l'adulte, le GABA et la glycine fonctionnent comme neurotransmetteurs excitateurs et jouent, avec l'acétylcholine et le glutamate, un rôle essentiel dans la génération de ces activités spontanées précoces au sein des réseaux neuronaux de la moelle épinière ventrale (Branchereau et al., 2002; Hanson and Landmesser, 2003). Lors de la maturation du système nerveux central des mammifères, cette transmission GABA/glycine excitatrice va progressivement basculer vers une transmission synaptique inhibitrice (Wu et al., 1992; Ganguly et al., 2001; Stein et al., 2004). Si le passage d'un mode excitateur (immature) vers un mode inhibiteur (mature) est déjà bien défini (voir revues Clarac et al., 2004; Kudo et al., 2004), les mécanismes qui sous-tendent cette évolution ontogénique ne sont pas élucidés. De même, l'ontogenèse du phénotype GABA et glycine dans les populations neuronales intraspinales n'a pas été décrite chez la souris. Il est donc essentiel de bien caractériser l'ontogenèse de ces deux populations. Cependant, au sein de la moelle épinière, il existe de nombreuses populations neuronales qui se mettent en place avec un timing différent. Pour avoir un point de référence, dans la mesure où les motoneurones sont les premiers neurones à se différencier, le développement embryonnaire des colonnes de motoneurones a d'abord été analysé dans la moelle épinière de souris.

#### **A- LOCALISATION DES MOTONEURONES SPINAUX AU COURS DU DEVELOPPEMENT**

Les motoneurones sont parmi les premières cellules nerveuses à se différencier (Nornes and Carry, 1978) et l'on sait que cette population va subir des modifications drastiques au

cours du développement principalement dues à un phénomène important de mort neuronale programmée. Ainsi, il a été décrit une perte de 60 à 67 % des motoneurones de la moelle épinière entre les stades E12,5 et E17,5 (Lance-Jones, 1982; Oppenheim, 1986; Yamamoto and Henderson, 1999). Dans la moelle épinière, il a également été montré que les jonctions neuromusculaires se mettaient en place vers le stade E11,5 chez la souris (Suzue and Shinoda, 1999), un jour avant l'apparition des premiers mouvements spontanés de l'embryon. Ces variations ontogénétiques posent alors la question de savoir où est localisée cette population de neurones moteurs à différents stades de développement. Dans cette perspective, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés avec le marqueur Islet 1/2 (marqueur des motoneurones précoces au cours de développement) (Ericson et al., 1992) sur des coupes de moelles épinières prélevées aux stades E12,5, E13,5 et E15,5 (n=3 à chaque stade) (Figure 13). Le but de cette démarche n'étant pas de faire une analyse exhaustive du développement des motoneurones, mais plutôt d'évaluer leur évolution, l'étude a été réalisée uniquement au niveau brachial.

Au **stade E12,5**, deux groupes de cellules sont marqués dans la substance grise : l'un situé en position ventro-latérale, l'autre situé beaucoup plus dorsalement en position médiane (Fig. 13, respectivement flèches et doubles flèches). L'emplacement de ces dernières cellules (en position médiane) ne correspondant pas à des motoneurones mais plutôt à des neurones moteurs viscéraux (cellules pré-ganglionnaires sympathiques) (Ericson et al. 1992). Au **stade E13,5**, les cellules marquées en position ventro-latérale sont regroupées dans une zone plus restreinte par rapport au stade précédent, cette zone bordant la substance blanche ventrale (Fig. 13, flèches). Il est intéressant de noter que les cellules marquées en position médiane dans la zone intermédiaire de la moelle épinière sont moins nombreuses (Fig. 13, double flèche). Au **stade E15,5**, la population de motoneurones est localisée de façon beaucoup plus



**Figure 13 : Mise en place de la population motoneuronale dans la moelle épinière en cours de développement**

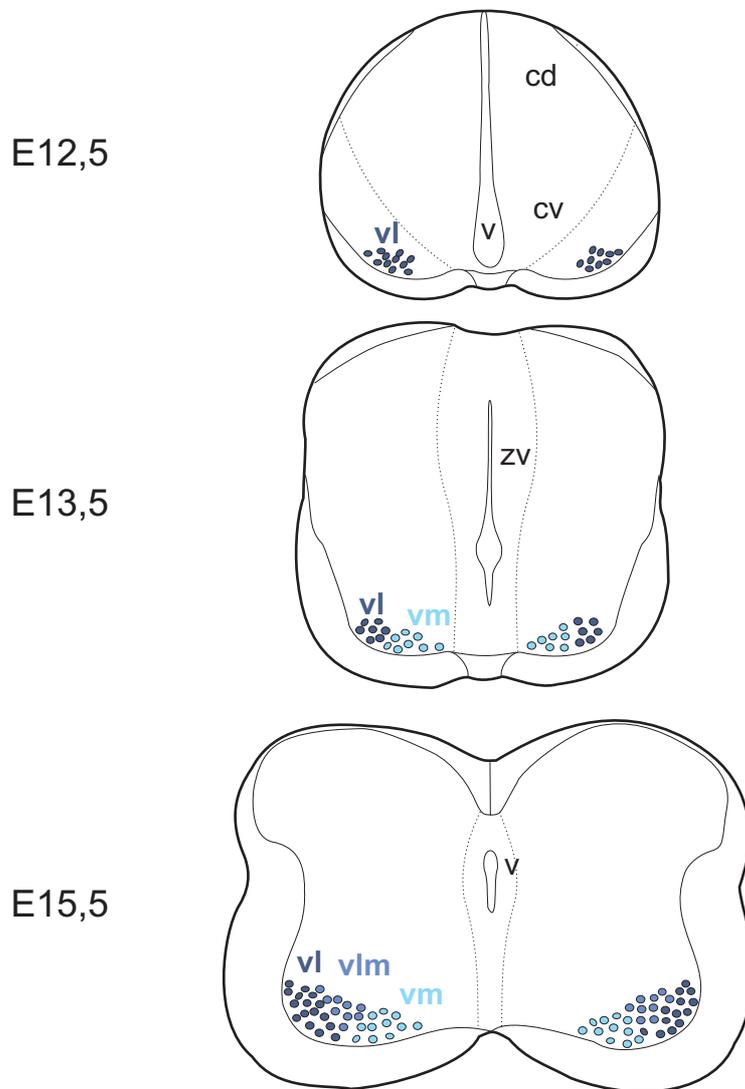
Au stade E12,5, deux groupes de cellules marquées sont observés, l'un en position ventro-latérale correspondant à une colonne motoneuronale (flèches), l'autre située beaucoup plus dorsalement en position médiane correspondant probablement à des neurones moteurs viscéraux (doubles flèches). Au stade E13,5, les cellules marquées sont dans une zone plus restreinte. La colonne de motoneurones ventro-latérale (flèches) borde la substance blanche ventrale. Quelques cellules non motoneuronales (doubles flèches) subsistent plus dorsalement dans la zone médiane. Au stade E15,5, les cellules marquées pour Islet 1/2 sont regroupées en trois colonnes dans la substance grise ventro-latérale et ventro-médiane en bordure de la substance blanche (flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, v : ventricule

définie. En effet, les cellules marquées pour Islet ½ sont regroupées en trois colonnes dans la substance grise ventro-médiane et ventro-latérale en bordure de la substance blanche.

Les données obtenues avec Islet ½ peuvent être complétées avec les données recueillies dans le laboratoire avec un anticorps dirigé contre l'  $\alpha$ -calcitonin gene related peptide (CGRP) (Alain Delpy, stage de maîtrise). L'  $\alpha$ CGRP étant une protéine exprimée dans le système nerveux central et périphérique avec plus de 90% de son expression totale dans les motoneurones embryonnaires (Juurlink et al., 1990). Ainsi, dès le stade E11,5, un pool unique ventro-latéral de motoneurones est détecté dans la moelle épinière brachiale. Puis la mise en place de cette population motoneuronale s'effectue suivant un axe rostro-caudal : au stade E13,5, on observe un pool ventro-médian et un pool ventro-latéral au niveau brachial mais un seul pool ventro-médian au niveau du plexus lombaire. Trois pools ventraux peuvent être visualisés au niveau brachial au stade E17,5 : un pool ventro-médian, et un pool ventro-latéral composé lui-même d'un pool médian et d'un pool latéral, en revanche seuls deux pools sont marqués au niveau lombaire.

La Figure 14 récapitule l'ensemble des observations effectuées sur la mise en place de la population motoneuronale dans la moelle épinière brachiale au cours du développement. Au stade E12,5, une colonne ventro-latérale (vl) de motoneurones est marquée. Une colonne ventro-médiane (vm) et une colonne ventro-latérale sont immunoréactives au stade E13,5. Trois colonnes de motoneurones sont observées au stade E15,5 : en position ventro-médiane, ventro-latérale-médiane (vlm) et ventro-latérale.



**Figure 14 : Schéma de la mise en place de la population motoneuronale dans la moelle épinière brachiale au cours du développement**

Au stade E12,5, une unique colonne de motoneurones est située en position ventro-latérale (vl). Une colonne ventro-médiane (vm) et une colonne ventro-latérale sont immunoréactives au stade E13,5. Trois colonnes de motoneurones sont observées au stade E15,5 : en position ventro-médiane (vm), ventro-latérale-médiane (vlm) et ventro-latérale (vl).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, v : ventricule

## **B- MISE EN PLACE DU SYSTEME GABAERGIQUE DANS LA MOELLE**

### **EPINIÈRE**

Afin de mieux comprendre le rôle ontogénique du GABA, il est indispensable de connaître l'évolution de la population de neurones GABAergiques au cours de la maturation embryonnaire. Cette maturation a été décrite dans différentes structures du cerveau et chez différentes espèces (cervelet (Yamashita and Hayashi, 1996), cortex visuel et préfrontal (Schwartz and Meinecke, 1992) chez le singe ; cerveau (Jong et al., 1986), pont (Code et al., 1989), télencéphale (Lundgren et al., 1995) chez le poulet ; cortex visuel chez le furet (Peduzzi, 1988) ; cerveau (Lauder et al., 1986), cervelet (Aoki et al., 1989), néocortex chez le rat (Chronwall and Wolff, 1980; Cobas et al., 1991; Van Eden et al., 1989) ; néocortex (Del Rio et al., 1992) chez la souris). Dans la moelle épinière, quelques données sont disponibles chez le xénope (Binor and Heathcote, 2001), le poulet (Antal et al., 1994) et le rat (Ma et al., 1992; Tran et al., 2003) ; mais chez la souris, la mise en place de la population GABAergique n'a jamais été décrite. Nous avons ainsi réalisé une étude immunohistochimique combinée à des observations en microscopie confocale pour décrire la mise en place de cette population dans la moelle épinière embryonnaire de souris.

La distribution des fibres et cellules immunoréactives pour le GABA a été analysée du stade E9,5 au stade P0, sur des sections de moelles épinières brachiales et lombaires (n=4 au stade E9,5, 3 portées différentes ; n=6 E11,5 - 3 portées différentes, n=7 E12,5 - 5 portées, n=9 E13,5 - 6 portées, n=10 E15,5 - 6 portées, n=6 E17,5 - 4 portées et n=4 P0 provenant de 3 portées différentes). Des observations sur des coupes transversales de moelle épinière ainsi qu'une quantification de la population de cellules marquées ont été réalisées à chaque stade de

développement étudié. Les résultats sont ainsi présentés d'abord sous forme descriptive puis sous forme d'analyse quantitative.

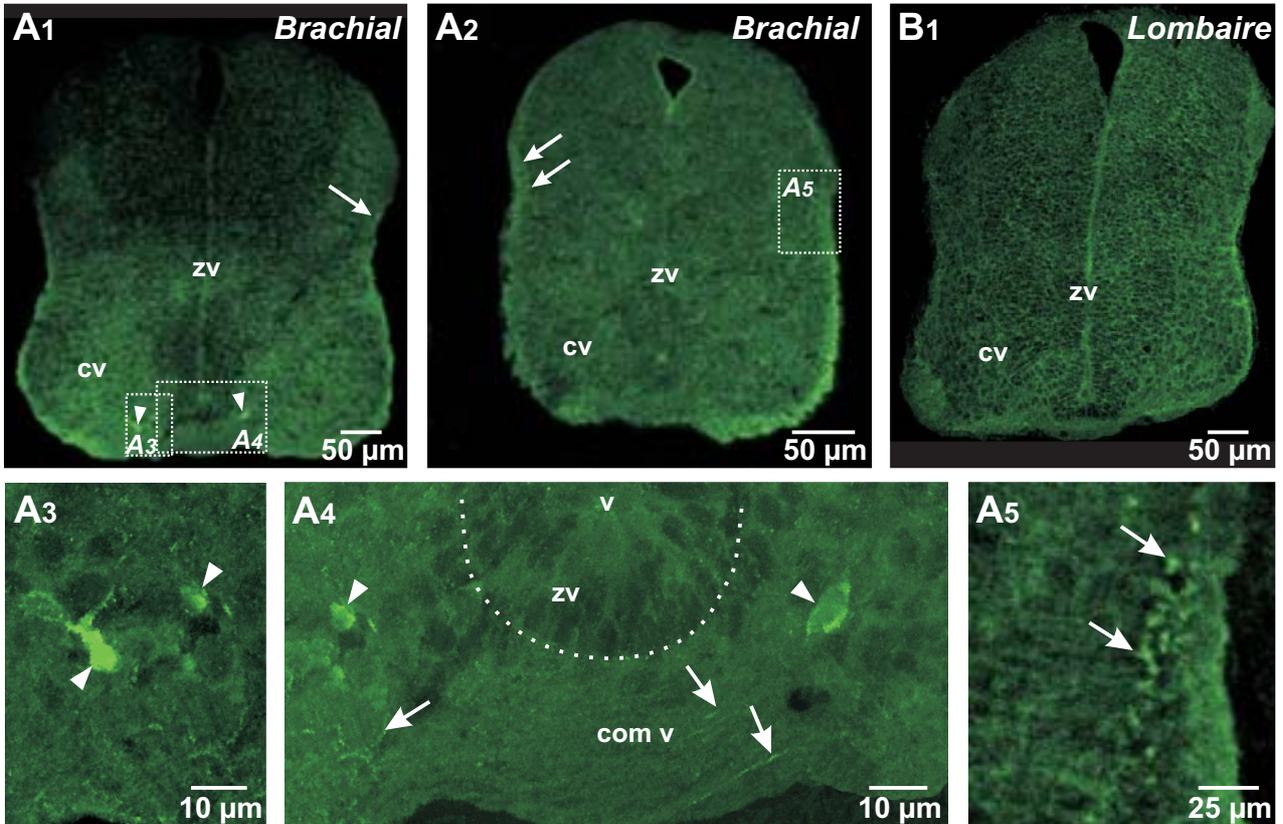
1) *Localisation préférentielle des premières cellules GABAergiques dans la substance grise ventrale*

Au **stade E9,5**, aucun marquage n'a pu être détecté aux deux niveaux étudiés (données non illustrées, n=4).

Les premiers marquages GABA sont observés au **stade E11,5**. En effet, quelques corps cellulaires immunoréactifs pour le GABA (GABA-ir) sont détectés dans la moelle brachiale sur certaines coupes mais pas de manière systématique (2 coupes / 6 observées). Ces somata sont localisés dans la partie médio-ventrale de la substance grise ventrale (Fig. 15A1, 12A3 têtes de flèches) et sont regroupés préférentiellement autour de la zone ventriculaire (Fig. 15A4, têtes de flèches). Quelques fibres marquées longitudinalement ont également pu être observées non loin des corps cellulaires GABA-ir, dans la commissure ventrale (voir flèches, Fig. 15A4). Bien que l'origine de ces fibres ne soit pas connue, le fait qu'elles soient positionnées proche des corps cellulaires GABAergiques suggère qu'elles seraient issues des corps cellulaires marqués et qu'elles pourraient correspondre à des axones commissuraux. Parfois, quelques rares fibres GABA-ir localisées dans la substance blanche en position médio-latérale ont pu également être observées (Fig.15A2, 15A5). Ces fibres qui n'ont été visibles qu'à des niveaux brachiaux supérieurs (non détectées aux niveaux brachiaux les plus bas) pourraient donc avoir une origine supraspinale. Dans la moelle lombaire, nous n'avons jamais observé d'immunoréactivité anti-GABA au stade E11,5 (n = 6, Fig. 15B1).

Par contre, au **stade E12,5**, des corps cellulaires GABAergiques sont détectés aux deux niveaux spinaux étudiés (Fig. 16A1, 13B1). Cependant, ces somata sont en quantité plus importante dans la moelle brachiale que dans la moelle lombaire. Dans la moelle épinière

E11,5

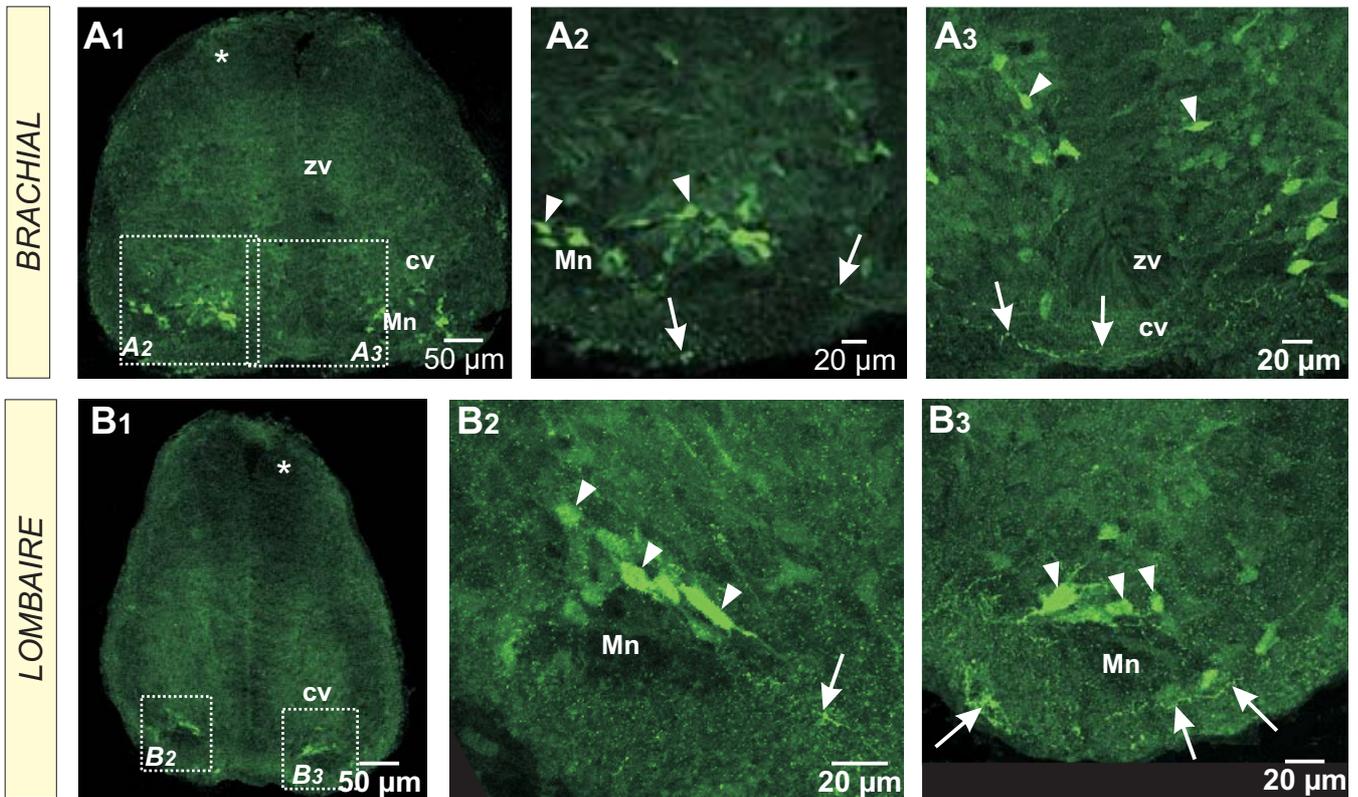


**Figure 15 : Premières visualisations d'une immunoréactivité anti-GABA au niveau brachial au stade E11,5**

Aux niveaux brachiaux les plus hauts, des fibres GABA-ir sont détectées en position dorso-latérale (flèches, A1) tandis que ces fibres sont beaucoup moins visibles aux niveaux brachiaux plus caudaux (flèche, A2). Sur certaines coupes, présence de quelques somata immunoréactifs pour le GABA dans la substance grise en position ventro-médiane (têtes de flèches, A2). (A3) Grossissement du plexus latéral de fibres GABA-ir illustrées en A1. Noter que ces fibres sont coupées transversalement et parcourent la moelle selon un plan rostro-caudal. (A4, A5) Vues élargies présentant les corps cellulaires GABA-ir marqués en A2 (têtes de flèches). Axones commissuraux parcourant la commissure ventrale (A5, flèches). Au niveau lombaire (B1), aucune immunoréactivité GABA n'est détectée. Sur cette figure, comme sur les suivantes, les rectangles en pointillés délimitent la localisation des images à plus fort grossissement. Les marquages immunohistochimiques anti-GABA (et anti-glycine dans les figures suivantes) sont réalisés sur des coupes transversales de moelles épinières.

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, com v : commissure ventrale, v : ventricule, zv : zone ventriculaire

E12,5



**Figure 16 : Au stade E12,5, expression d'une immunoréactivité anti-GABA au niveau brachial (A1-A3) et lombaire (B1-B3)**

Localisation des corps cellulaires GABA-ir au niveau brachial dans la corne ventrale autour de la colonne motoneuronale (Mn) et autour de la zone ventriculaire (vue globale, A1). Noter que la corne dorsale ne présente pas d'immunoréactivité GABA (voir astérisque). (A2) Grossissement à partir de A1 dévoilant des neurones GABAergiques (têtes de flèches) autour des motoneurones non marqués. Noter que des fibres sous forme de marquage ponctiforme sont détectées dans la zone marginale (flèches). (A3) Neurones marqués autour de la zone ventriculaire (têtes de flèches) et axones commissuraux GABAergiques parcourant la commissure ventrale (flèches). (B1) Au niveau lombaire, les cellules GABA-ir sont détectées au stade E12,5 dans la substance grise ventrale, mais la partie dorsale de la moelle ne présente pas de marquage (astérisque). Vue élargie des groupes de neurones ventraux GABA-ir à gauche (B2) et à droite (B3) de l'axe médian. Ces neurones sont situés au dessus de la colonne de motoneurones. Noter la présence de fibres GABAergiques dans la substance blanche ventrale (flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire

brachiale, des corps cellulaires GABA-ir sont détectés dans la substance grise ventrale autour de groupes de cellules non marquées correspondant à la colonne ventro-latérale motoneuronale (Fig. 16A1, 16A2). De nombreuses cellules GABAergiques ont également été trouvées dans les zones ventro-médianes de la substance grise, proche de la couche péri-épendymaire (zone ventriculaire, zv) (Fig. 16A3, têtes de flèches). De plus, on peut noter la présence de fibres commissurales GABA-ir dans la partie ventro-médiane de la moelle épinière ainsi que dans la commissure ventrale (Fig. 16A3, flèches). Dans la moelle épinière lombaire, des corps cellulaires GABAergiques ont été révélés exclusivement dans la substance grise ventrale (Fig. 16B1) autour des colonnes de motoneurones (Fig. 16B2, têtes de flèches). Un nombre important de fibres a été également détecté dans la zone marginale ventro-latérale, ces fibres parcourant la moelle soit sagitalement soit transversalement (Fig. 16B3, flèches). Enfin, au stade E12,5, la moelle dorsale ne présente pas d'immunoréactivité GABA au niveau brachial ni au niveau lombaire (Fig. 16A1, B1, astérisques).

## **2) Apparition du phénotype GABA dans toute la moelle épinière**

Au **stade E13,5**, le nombre de somata GABA-ir augmente dans la partie ventrale de la moelle épinière et les premières cellules GABA-ir apparaissent dans la substance grise dorsale. Les niveaux rostraux et caudaux de la moelle épinière présentent de nombreux corps cellulaires GABAergiques, comme illustré sur la Figure 17A1 et B1.

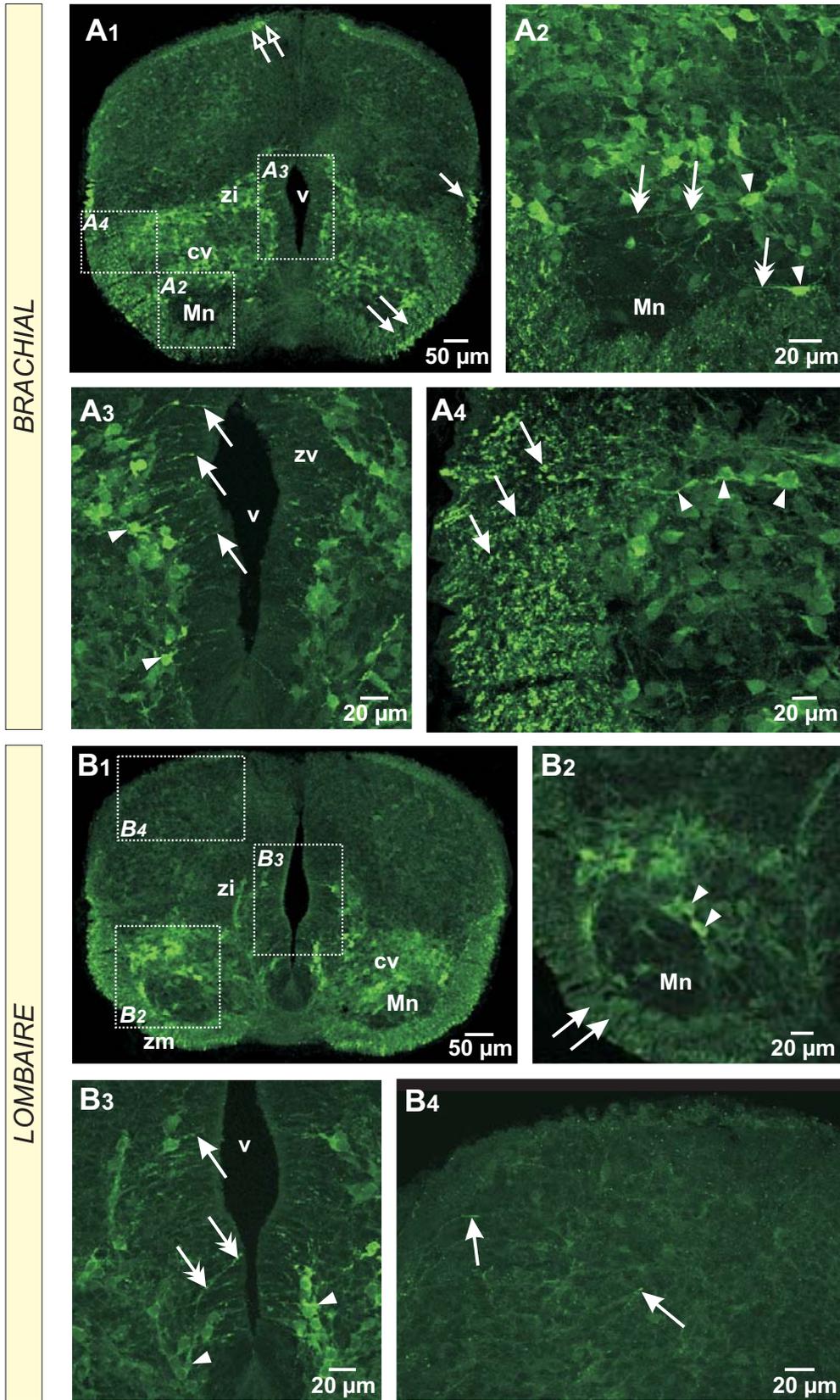
Dans la moelle épinière brachiale, des cellules GABAergiques réparties de manière homogène peuvent être visualisées dans les futures couches VII et VIII. Comme au stade E12,5, aucun marquage n'a pu être détecté dans les colonnes motoneuronales. L'absence de marquage dans les colonnes ventro-médianes de motoneurones est nettement visible sur la Figure 17A2. Au niveau de la zone intermédiaire, un réseau dense de neurones GABAergiques est visible proche de la zone ventriculaire médiane et à la périphérie. Ces

**Figure 17 : Stade E13,5, immunoréactivité anti-GABA confinée dans la moelle épinière ventrale**

(A1) Sur les sections brachiales, les cellules GABAergiques sont détectées dans toute la corne ventrale sauf dans la zone correspondant aux colonnes de motoneurones. Quelques rares fibres sont visibles dans la zone marginale dorsale (flèche ouverte). (A2) Vue élargie des neurones GABA-ir localisés dans la corne ventrale. Des cellules GABA-ir émettent des projections axonales vers les colonnes de motoneurones (Mn) (doubles flèches). (A3) Pattern d'immunoréactivité GABA dans la zone ventriculaire autour du ventricule. De nombreux neurites GABA-ir terminent leur course en bordure du ventricule (flèches). (A4) Plexus de fibres GABA-ir ponctiformes dans la zone marginale latérale. Noter que les corps cellulaires GABAergiques envoient des projections dans la zone marginale latérale (têtes de flèches). (B1) Au niveau lombaire, l'immunoréactivité GABA est moins étendue dans la corne ventrale par rapport au niveau brachial (comparer avec A1). (B2) Les cellules marquées (têtes de flèches) localisées autour des colonnes motoneuronales sont en nombre plus faible. Des fibres sont également détectées dans la zone marginale ventrale (flèches). (B3) Le nombre de cellules marquées autour du ventricule est moins important par rapport au niveau brachial (têtes de flèches), des projections axonales vers le ventricule sont observées (doubles flèches). (B4) Aucun corps cellulaire GABA-ir n'est détecté dans la corne dorsale alors que quelques fibres GABAergiques sont présentes (flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, v : ventricule, zi : zone intermédiaire, zm : zone marginale, zv : zone ventriculaire

E13,5



cellules possèdent des prolongements immunoréactifs au GABA vers le ventricule, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir des échanges avec le liquide épendymaire (voir têtes de flèches, Fig. 17A3). Un marquage GABA sous forme de ponctuations correspondant vraisemblablement à des terminaisons de fibres GABAergiques parcourant la moelle suivant un axe rostro-caudal, est également visible dans la zone marginale ventro-latérale. Enfin, quelques fibres présentent une immunoréactivité anti-GABA dans la zone marginale dorsale (voir flèches, Fig. 17A1).

Dans la moelle lombaire, de nombreuses cellules sont GABA positives dans la substance grise ventrale, ces cellules sont plus particulièrement localisées dans les zones ventro-latérales (Fig. 17B1), autour des colonnes motoneuronales dépourvues de marquage (Fig. 17B2). Dans la zone intermédiaire, on trouve moins de cellules GABAergiques autour de la zone ventriculaire qu'au niveau brachial (têtes de flèches, Fig. 17B3). Sur les sections lombaires, les zones marginales latérale et ventro-latérale sont marquées de façon similaire par rapport aux sections brachiales mais la zone marginale dorsale présente moins de terminaisons GABAergiques. Enfin, dans la corne dorsale de la moelle épinière, de rares cellules GABA-ir sont visualisées et quelques fibres GABAergiques ont pu être détectées (Fig. 17B4).

### **3) Localisation préférentielle des cellules GABA-ir dans la corne dorsale de la moelle épinière**

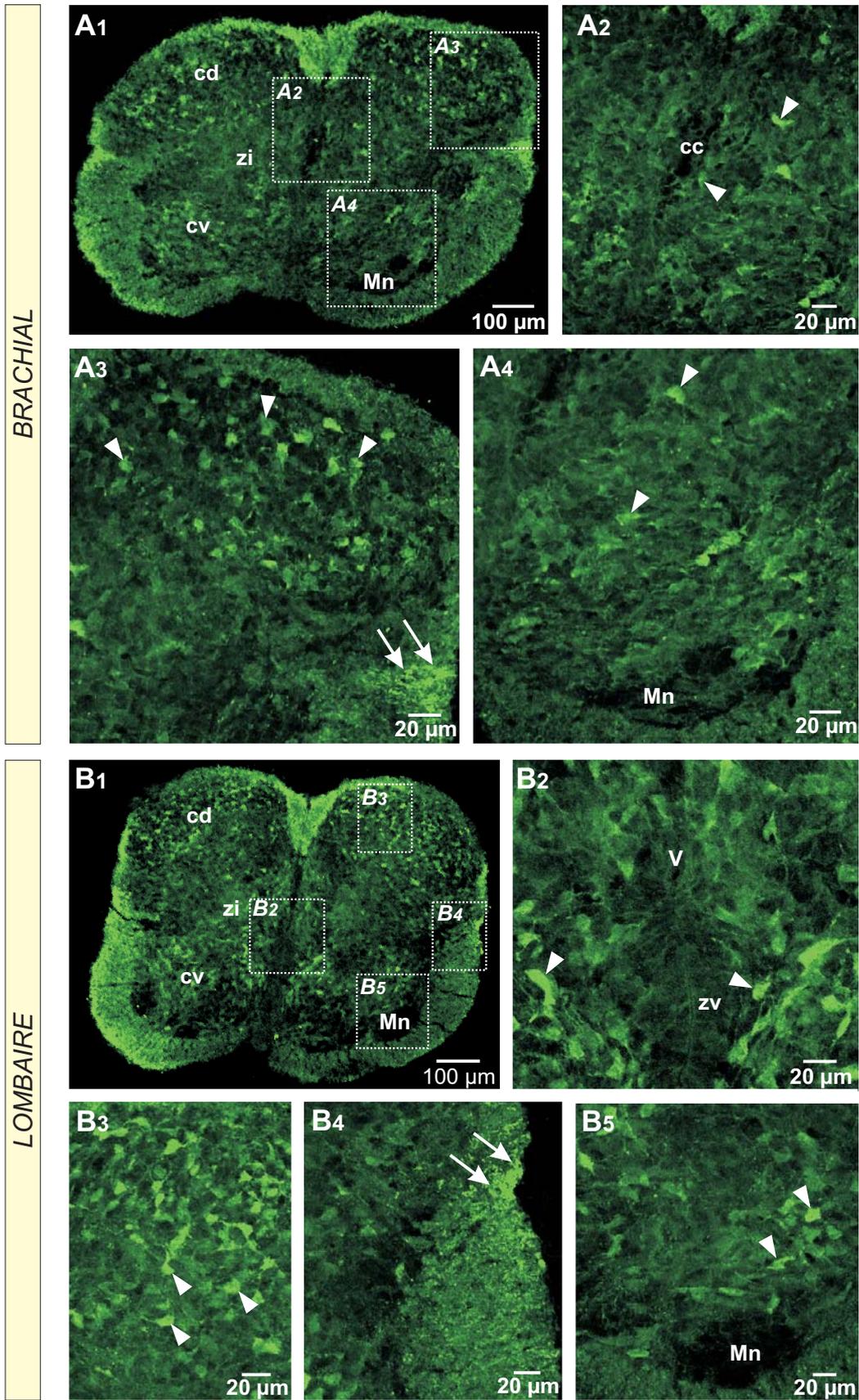
Le développement de la population GABAergique présente une modification remarquable qui a lieu autour du **stade E15,5**. En effet, au niveau brachial, les corps cellulaires GABAergiques sont localisés dans toute la substance grise ventrale (Fig. 18A1), cependant pour la première fois, le nombre de cellules marquées dans la moelle dorsale dépasse le nombre de cellules marquées dans la moelle ventrale (voir quantification Fig. 22). Dans la zone intermédiaire, les cellules GABAergiques sont détectées autour du canal central mais

**Figure 18 : Stade E15,5, extension de l'immunoréactivité anti-GABA dans la corne dorsale (A2)**

Au stade E15,5, la zone ventriculaire commence à se rétracter pour donner naissance au canal central qui est entouré de nombreuses cellules marquées. (A3) De nombreux somata GABA sont détectés dans la corne dorsale. Un plexus de fibres GABA-ir très dense est visible dans la zone marginale dorso-latérale (flèches). (A4) Les cellules GABA-ir, en nombre important, occupent toute la substance grise ventrale sauf la zone correspondant aux colonnes motoneuronales (Mn) (têtes de flèches). Les zones marginales dorsale et ventrale présentent une innervation GABA importante. (B1) Au niveau lombaire, le pattern d'immunoréactivité GABA est similaire à celui observé au niveau brachial. (B2) La zone ventriculaire est entourée de neurones GABA (têtes de flèches). (B3) Vue grossie de nombreuses cellules marquées dans la corne dorsale. (B4) Fibres GABA-ir remarquées dans la zone marginale dorso-latérale (flèches). (B5) Les cellules marquées restent en nombre important autour des colonnes motoneuronales.

Abréviations : cc : canal central, cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, v : ventricule, zi : zone intermédiaire, zm : zone marginale, zv : zone ventriculaire

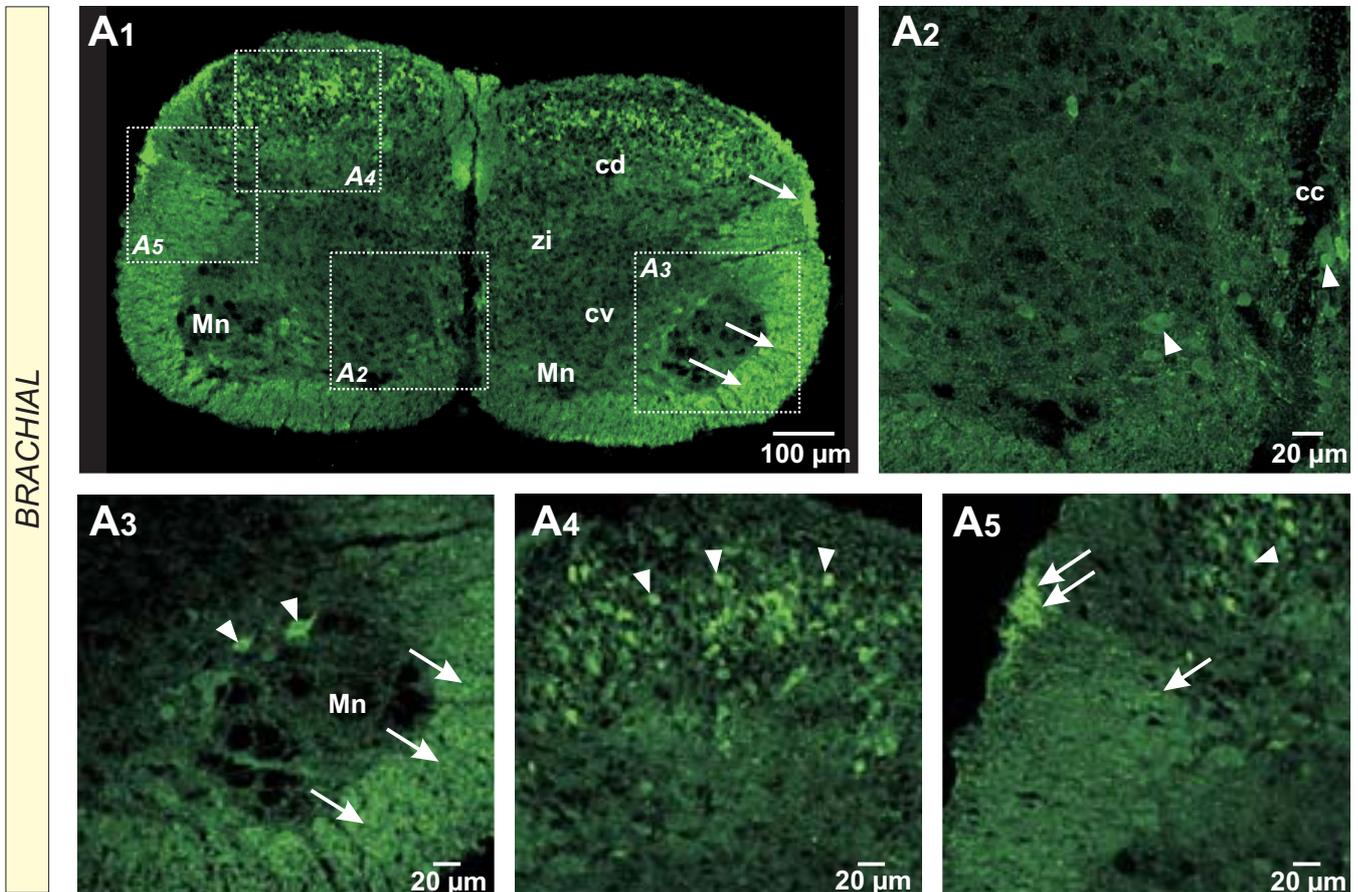
E15,5



leurs projections vers le ventricule sont moins claires (Fig. 18A2, têtes de flèches). De nombreuses fibres GABA-ir sont détectées dans toutes les couches de la future substance blanche de la moelle épinière mais avec une densité plus importante dans la zone marginale dorso-latérale (Fig. 18A3, flèches). Bien que les cellules GABAergiques soient encore présentes dans la moelle ventrale, elles ne sont plus situées préférentiellement autour des colonnes de motoneurones mais sont localisées dans les zones plus dorsales de la corne ventrale. Au niveau lombaire, les cellules GABA-ir semblent être réparties de façon uniforme dans les cornes ventrale et dorsale de la moelle épinière. A ce stade de développement, de nombreux corps cellulaires GABAergiques délimitent le pourtour de la zone ventriculaire comme au stade E13,5 (Fig. 18B2, tête de flèches; comparer avec Fig. 17A4). Comme illustré dans la Figure 18B3, un nombre important de somata GABA-ir a été trouvé au niveau lombaire dans la corne dorsale (comparer avec Fig. 18A3). A ce niveau, la zone marginale dorso-latérale de la substance blanche de la moelle épinière présente aussi un marquage GABA dense (Fig. 18B4). Comme au stade E13,5, de nombreuses cellules GABAergiques sont détectées autour des colonnes motoneuronales, comme par exemple autour de la colonne ventro-latérale sur la Figure 18B5.

Deux jours avant la naissance, au **stade E17,5**, le pattern d'immunoréactivité GABA évolue vers les parties dorsales de la moelle épinière (Fig. 19A1). Au niveau brachial, des corps cellulaires GABA-ir sont présents dans la partie ventrale de la moelle, autour du canal central (Fig. 19A2) et autour des colonnes de motoneurones ventro-latérales (Fig. 19A3), mais ces cellules marquées sont en nombre très faible. De la même façon, dans la zone intermédiaire, peu de cellules présentent un marquage GABA. En revanche dans la partie dorsale de la moelle épinière, un nombre très important de cellules GABA-ir est détecté, ces cellules occupant la corne dorsale dans sa totalité mais sont en densité plus importante au niveau des futures couches I et II (Fig. 19A4). Dans la substance blanche, des fibres

E17,5



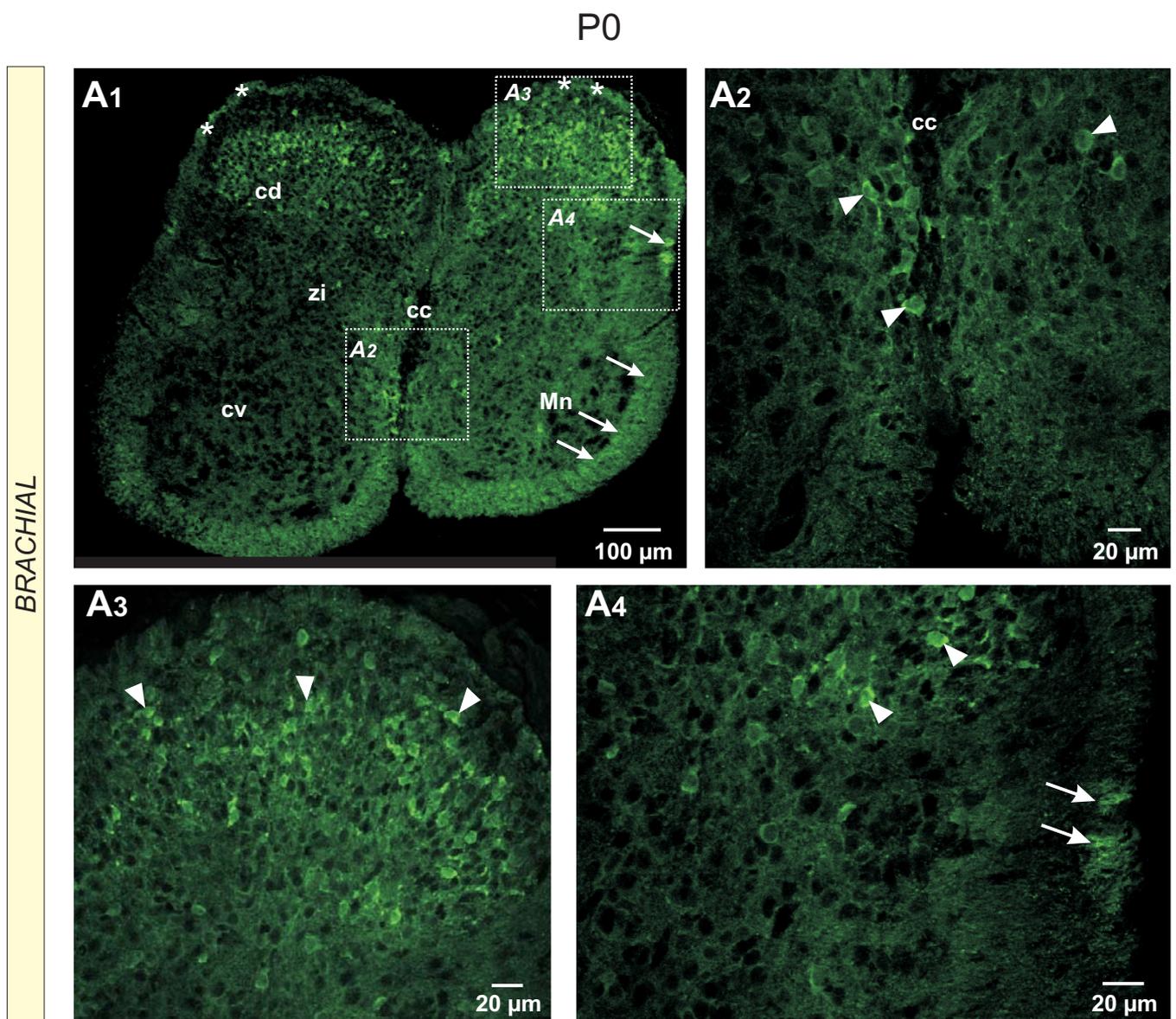
**Figure 19 : Stade E17,5, localisation préférentielle de l'immunoréactivité anti-GABA dans la corne dorsale**

(A1) Vue générale d'une section transversale brachiale : le nombre de cellules marquées dans la substance grise ventrale est très faible. Présence de nombreuses fibres GABA-ir dans la zone marginale (flèches). Un profil similaire est observé sur les coupes de moelle lombaire (non illustré). (A2) Quelques rares cellules (têtes de flèches) sont détectées dans la substance grise ventrale et autour du canal central. (A3) Au dessus des colonnes ventro-latérales de motoneurones, un nombre très faible de neurones GABA-ir est visible (têtes de flèches). De nombreuses fibres sont marquées dans la substance blanche ventrale (flèches). (A4) Vue élargie de la substance grise dorsale, la population de neurones GABA-ir est localisée en position médio-dorsale. (A5) Des fibres GABA-ir sont détectées dans la zone marginale, plus particulièrement dans les funiculi dorso-latéraux (doubles flèches).  
Abréviations : cc : canal central, cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zi : zone intermédiaire

GABAergiques sont détectées tout autour de la moelle épinière (Fig. 19A1, flèches). De plus, comme au stade E15,5, un funiculus de fibres est marqué de façon très dense dans la zone marginale dorso-latérale (Fig. 19A5), ces fibres devant correspondre à des axones ascendants ou descendants. Sur les coupes lombaires, le marquage GABA obtenu est identique à celui observé au niveau brachial (données non illustrées mais voir Fig. 21).

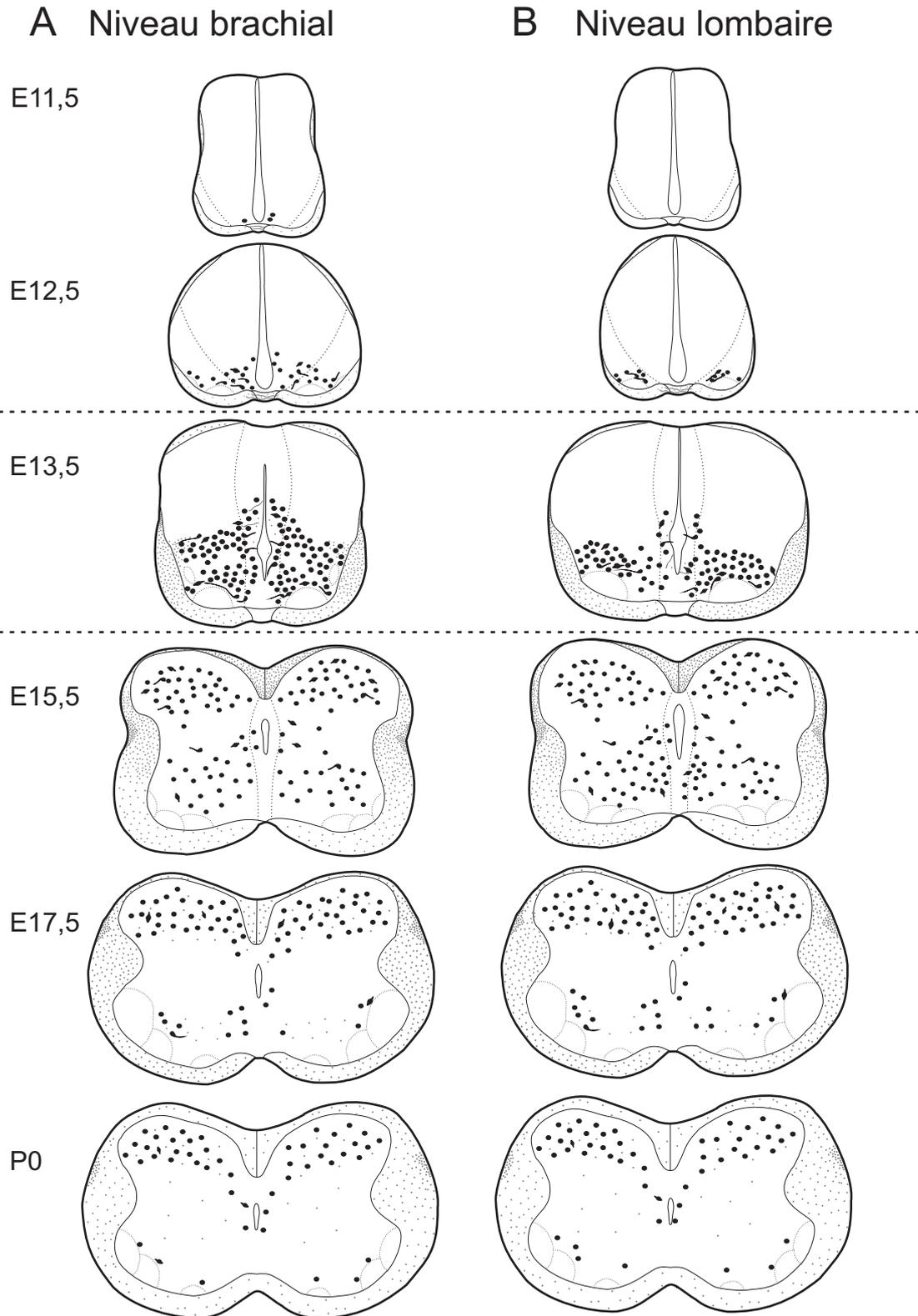
Lorsque l'on compare avec les stades de développement embryonnaire, le pattern observé au **stade post-natal 0** (P0) révèle une diminution du nombre de cellules marquées aussi bien dans la corne ventrale que dans la corne dorsale de la moelle épinière (voir quantifications Figure 22). La distribution du marquage GABA est également comparable au niveau brachial (Fig. 20A1) et au niveau lombaire (non illustré). En effet, à ces deux niveaux étudiés, on peut détecter 1) un nombre faible de cellules GABA-ir dans la zone intermédiaire et autour du canal central (Fig. 20A2), 2) un nombre important de cellules marquées dans les couches superficielles de la corne dorsale (Fig. 20A3), et 3) quelques cellules dans la corne ventrale de la moelle épinière (Fig. 20A1). Au stade P0, des fibres GABA-ir sont également révélées dans la future substance blanche avec une densité plus importante dans la zone marginale dorso-latérale (Fig. 20A4, flèches).

L'ensemble des observations réalisées jusqu'ici est synthétisé dans la Figure 21. Trois étapes importantes sont distinguées dans la mise en place du phénotype GABA. 1) Entre les stades E11,5 et E12,5, les premières cellules GABAergiques apparaissent dans la moelle ventrale. 2) Au stade E13,5, la population GABA-ir commence à envahir la moelle dorsale. 3) Enfin, entre les stades E15,5 et P0, le marquage GABA est préférentiellement localisé dans la corne dorsale et le nombre de cellules marquées dans la corne ventrale a diminué. Afin de mieux appréhender les dynamiques spatio-temporelles de mise en place de la population GABAergique dans la moelle épinière embryonnaire de souris, une analyse quantitative a été



**Figure 20 : Stade P0, localisation principale de l'immunoréactivité anti-GABA dans la corne dorsale**

(A1) Au niveau brachial, concentration des corps cellulaires GABA-ir dans les futures couches I à IV de la substance grise dorsale. Noter la présence de fibres GABA-ir dans la zone marginale ventrale (flèches), la zone marginale dorsale n'étant pas marquée (astérisques). (A2) Quelques rares neurones GABA-ir sont observés autour du canal central en position ventrale (têtes de flèches). (A3) Immunoréactivité dans les couches dorsales superficielles. (A4) Des fibres GABA-ir sont détectées dans la zone marginale dorso-latérale (flèches). Les têtes de flèches indiquent les neurones GABA-ir. Abréviations : cc : canal central, cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zi : zone intermédiaire



**Figure 21 : Représentation schématique de la mise en place du système GABAergique au cours du développement embryonnaire chez la souris**

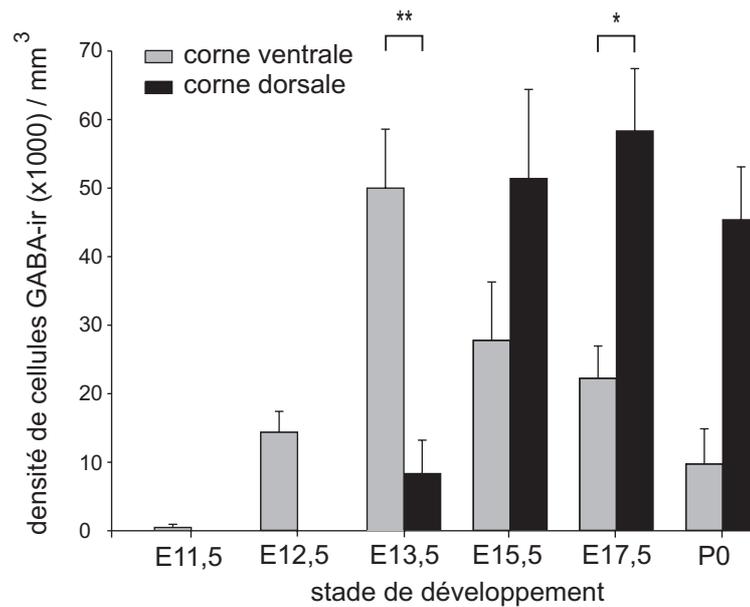
Les contours externes des schémas soulignent la forme générale des coupes transversales de moelles épinières, aux niveaux brachial (A) et lombaire (B), aux différents stades de développement. Les contours internes (trait fin) délimitent la substance blanche de la substance grise. Les lignes pointillées entourent les régions non marquées des colonnes motoneuronales. Les gros points noirs correspondent aux cellules GABA-ir, les petits points noirs aux fibres GABAergiques. Aux stades E11,5 et E12,5, les cellules GABA-ir sont localisées préférentiellement dans la substance grise ventrale. Elles envahissent la corne dorsale au stade E13,5. Entre les stades E15,5 et P0, les cellules GABAergiques occupent préférentiellement la substance grise dorsale. Chaque dessin a été établi à partir des acquisitions confocales.

réalisée grâce à la méthode du « physical disector » (voir § matériels et méthodes), dans la substance grise ventrale et dorsale de la moelle épinière aux niveaux brachial et lombaire.

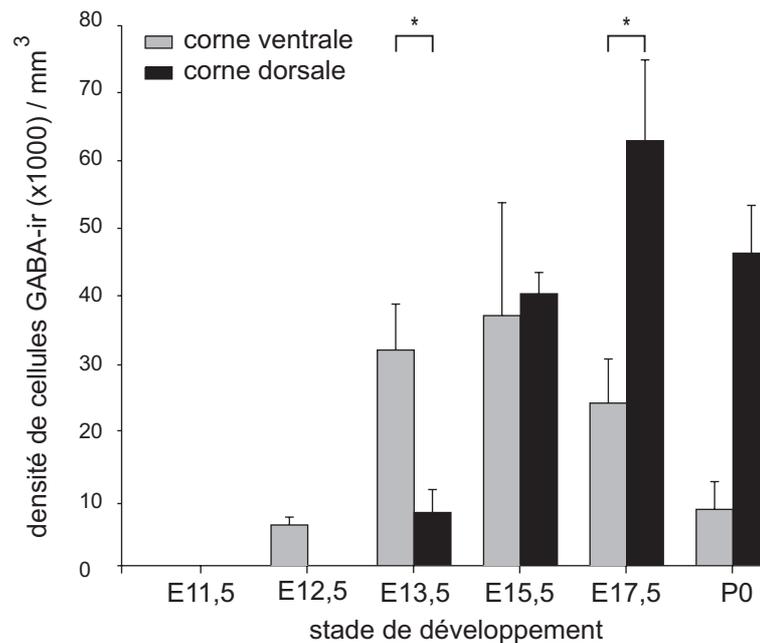
**Au niveau brachial**, l'analyse quantitative réalisée dans la corne ventrale nous permet d'affirmer que la densité de cellules GABA-ir commence à augmenter au stade E11,5 ( $0,46 \pm 0,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), atteint un pic au stade E13,5 ( $50 \pm 7,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) puis diminue aux stades plus tardifs de développement (P0 :  $9,72 \pm 3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 22A, barres grises). La même analyse, réalisée dans la corne dorsale, montre que les premières cellules immunoréactives pour le GABA apparaissent seulement au stade E13,5 ( $8,33 \pm 5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) et que le maximum de densité de cellules GABA-ir est détecté au stade E17,5 ( $58,4 \pm 8,8 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 22A, barres noires). De plus, nos données démontrent que l'immunoréactivité GABA dans la substance grise passe d'une localisation préférentiellement ventrale à dorsale entre les stades E13,5 et E17,5 : au stade E13,5, la partie ventrale de la moelle épinière contient une densité de cellules GABA-ir plus importante que dans la partie dorsale, cette différence étant statistiquement différente (Fig. 22A, \*\*P < 0,01 entre E13,5 ventral et E13,5 dorsal) ; tandis qu'au stade E17,5, c'est la moelle dorsale qui présente une densité de cellules GABA-ir plus élevée (Fig. 22A, \*P < 0,05 entre E17,5 ventral et E17,5 dorsal).

**Au niveau lombaire**, dans la moelle épinière ventrale, l'évolution de la densité de cellules GABA-ir est similaire à celle observée dans la moelle brachiale ventrale mais décalée dans le temps. En effet, les premières cellules GABA-ir apparaissent au stade E12,5 ( $6,02 \pm 1,77 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), le pic de densité de cellules GABA-ir est détecté au stade E15,5 ( $37 \pm 16,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) puis la densité de cellules diminue aux stades ultérieurs de développement (P0 :  $8,33 \pm 3,9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (barres grises Fig. 22B, comparer aux barres grises Fig. 22A). Dans la corne dorsale au niveau lombaire, les premières cellules émergent au stade E13,5 ( $7,87 \pm 3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), le maximum de densité est détecté au

### A niveau brachial



### B niveau lombaire



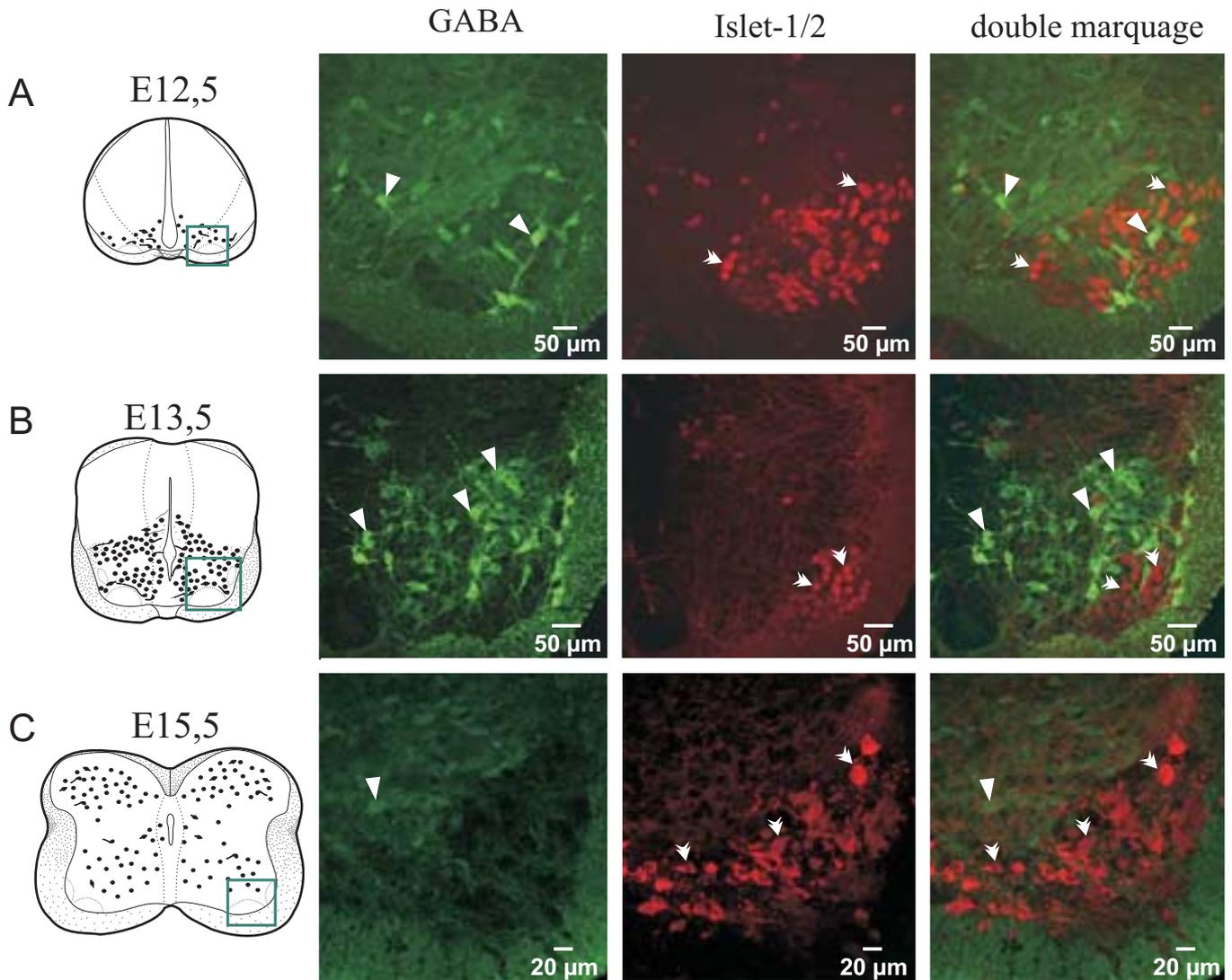
**Figure 22 : Evolution de la densité de corps cellulaires marqués pour le GABA, dans les cornes ventrale et dorsale de la moelle épinière, au cours du développement embryonnaire chez la souris**

La densité de cellules GABA-ir est relevée aux stades E11,5, E12,5, E13,5, E15,5, E17,5 et P0 dans la moelle ventrale (histogrammes gris) et dorsale (histogrammes noirs) au niveau brachial (A) et lombaire (B). Au stade E13,5, la corne ventrale contient plus de cellules GABA par rapport à la corne dorsale, en revanche au stade E17,5, l'inverse est observé. \*\*P<0,01 et \*P<0,05. Dans la corne ventrale, il existe un délai dans l'apparition du pic de densité entre le niveau brachial (E13,5) et le niveau lombaire (E15,5). Ce délai n'est pas observé dans la corne dorsale. n=4 pour chaque histogramme

stade E17,5 ( $63 \pm 3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) et la densité diminue au stade P0 ( $8,33 \pm 3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (barres noires, Fig. 22B).

Ainsi, un changement de localisation du phénotype GABA de la corne ventrale vers la corne dorsale de la substance grise est observé aux deux niveaux étudiés entre les stades E13,5 et E17,5. Par ailleurs, dans la corne ventrale, il existe un délai rostro-caudal important dans le développement de la population du système GABAergique : le nombre maximum de cellules GABA-ir est détecté au stade E13,5 au niveau brachial, alors que dans la moelle lombaire, ce maximum n'est atteint qu'au stade E15,5. Par contre, dans la partie dorsale de la moelle lombaire, la mise en place de la population GABA-ir est relativement synchrone le long de la moelle épinière : un pic unique est détecté au stade E17,5 aux deux niveaux analysés.

Enfin, dans la substance grise ventrale, la population de cellules GABAergiques est localisée autour des colonnes motoneuronales aux stades précoces de développement. Il a été montré chez les vertébrés, que les motoneurons immatures pouvaient exprimer du glutamate aux stades précoces de développement (Fu et al., 1998; Meister et al., 1993), des changements phénotypiques peuvent être possible dans la population de neurones GABAergiques au cours de l'ontogenèse (Gao et al., 2001). Le GABA étant synthétisé à partir du glutamate, les neurones GABAergiques pourraient ainsi devenir glutamatergiques. La question se posait donc de savoir s'il existerait à la frange de ces groupes de motoneurons immatures, des cellules motoneuronales qui exprimeraient transitoirement le GABA. Ainsi, des expériences de **double marquage** GABA / Islet1/2 ont été réalisés sur des coupes transversales de moelle épinière brachiale, aux stades de développements embryonnaires E12,5, E13,5 et E15,5, afin de détecter la présence éventuelle de GABA dans des motoneurons. Aucune cellule doublement marquée n'a été détectée aux trois stades étudiés (n=3 à chaque stade)



**Figure 23 : Absence de co-localisations GABA / Islet 1/2**

(A) Au stade E12,5, quelques cellules GABA-ir sont visualisées dans la substance grise ventrale (têtes de flèches, photo de gauche, GABA) tandis que de nombreuses cellules immunoréactives pour Islet1/2 sont observées en position ventro-latérale (têtes de flèches doubles, photo du milieu, Islet 1/2). L'image superposée ne révèle pas d'éléments doublement marqués (photo de droite, double marquage). (B) Au stade E13,5, le nombre de cellules GABA augmente dans la corne ventrale de la moelle épinière (têtes de flèches, photo de gauche, GABA) alors qu'une colonne de motoneurones est détectée en position ventro-latérale (têtes de flèches doubles, photo du milieu, Islet 1/2). Aucune cellule doublement marquée n'est observée (photo de droite, superposition GABA / Islet 1/2). (C) Au stade E15,5, de très rares cellules GABA-ir sont détectées en position ventrale (tête de flèche, photo de gauche) alors que les colonnes motoneuronales s'étendent dans la substance grise ventro-médiane et ventro-latérale (photo du milieu, Islet 1/2, têtes de flèches doubles). Aucun élément doublement marqué n'est détecté (photo de droite). Les photos présentées dans cette figure ont été prises au niveau brachial pour les stades E12,5 et E15,5 et au niveau thoracique haut pour le stade E13,5.

(Figure 23, têtes de flèches : cellules GABA-ir ; têtes de flèches doubles : cellules Islet1/2-ir). La population motoneuronale ne co-exprime donc pas le GABA aux stades précoces de développement dans la moelle épinière de souris.

### **C- MISE EN PLACE DE LA POPULATION GLYCINERGIQUE SPINALE** **AU COURS DE L'ONTOGENESE**

Aux stades précoces de développement, la glycine, comme le GABA, exerce un rôle excitateur sur les neurones (décharge de potentiels d'action) (Gao and Ziskind-Conhaim, 1995; Wu et al., 1992). A des stades plus tardifs, s'opère un basculement de ces effets excitateurs vers des effets inhibiteurs. Pour comprendre comment s'effectue le passage d'une fonction excitatrice à inhibitrice, il est nécessaire d'étudier, comme nous l'avons fait pour le GABA, la mise en place de la population glycinergique spinale au cours du développement. Peu de données anatomiques sont disponibles sur la mise en place de la population glycinergique. La maturation du système glycinergique dans la moelle épinière a été décrite uniquement chez le poulet (Berki et al., 1995) et le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004) mais aucune donnée n'est disponible chez la souris, peut-être dû au fait que la glycine est une molécule très fragile et la fabrication de bons anticorps a toujours été difficile. Beaucoup d'études ont ainsi reposé sur l'utilisation d'anticorps anti-GlyT2 (transporteur de la glycine de type 2).

L'obtention d'un excellent anticorps anti-glycine, fabriqué par le Dr. D. Pow, a permis l'étude de la mise en place de cette population. Des sections de moelles épinières brachiales et lombaires ont ainsi été traitées par immunohistochimie et observées en microscopie confocale. La distribution des fibres et des corps cellulaires glycinergiques a été analysée du

stade embryonnaire E11,5 au stade post-natal 0 (4 E11,5, 6 E12,5, 8 E13,5, 4 E14,5, 7 E15,5, 5 E16,5, 7 E17,5 et 6 P0).

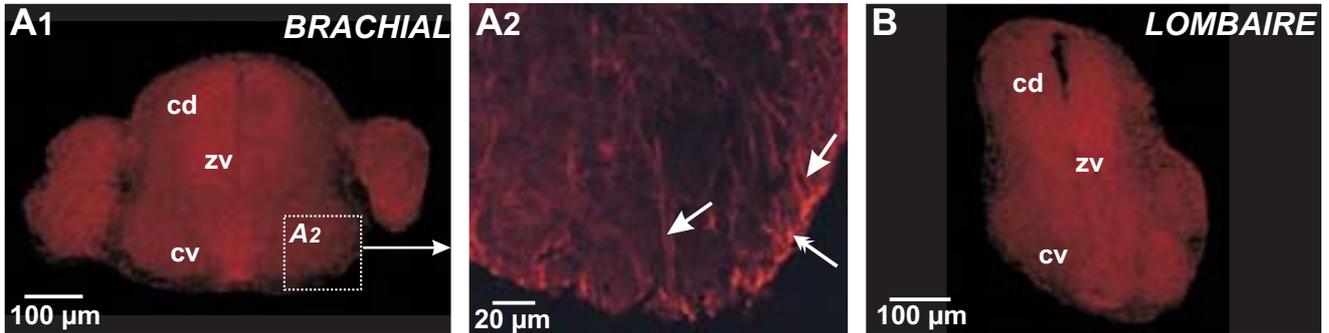
**1) Localisation préférentielle des premières cellules glycinergiques dans la substance grise ventrale**

Au stade E11,5, au niveau brachial, quelques fibres faiblement immunoréactives à la glycine ont été détectées aux niveaux des bordures de la région ventrale et latérale de la zone marginale (Fig. 24A1,A2). Par contre au niveau lombaire, aucun marquage glycine n'a été détecté au stade E11,5 (Fig. 24B). Les premières cellules glycinergiques sont détectées au **stade E12,5**, au niveau brachial, dans la partie ventro-médiane de la substance grise ventrale (Fig. 24C1-C2, têtes de flèches). Un réseau de fibres très dense apparaît également immunoréactif pour la glycine dans la future substance blanche ventrale, au niveau médio-latéral (Fig. 24C2). Ces fibres parcourent la moelle transversalement jusqu'à atteindre la zone marginale et former des extensions sur le bord de la moelle (Fig. 24C2, flèches et doubles flèches). Cependant, dans la moelle dorsale, aucun élément n'apparaît marqué pour la glycine (Fig. 24C3). Au niveau lombaire, un marquage similaire de fibres glycinergiques est observé dans la zone marginale, mais ces fibres Gly-ir sont en nombre moins important et présentent des prolongements moins longs dans la substance grise (Fig. 24D1-D2, flèche et doubles flèches). Par ailleurs, moins de corps cellulaires Gly-ir sont détectés à ce niveau lombaire (Fig. 24D2, tête de flèche). Enfin, au niveau lombaire comme au niveau brachial, la corne dorsale ne présente pas de marquage glycine (Fig. 24D3).

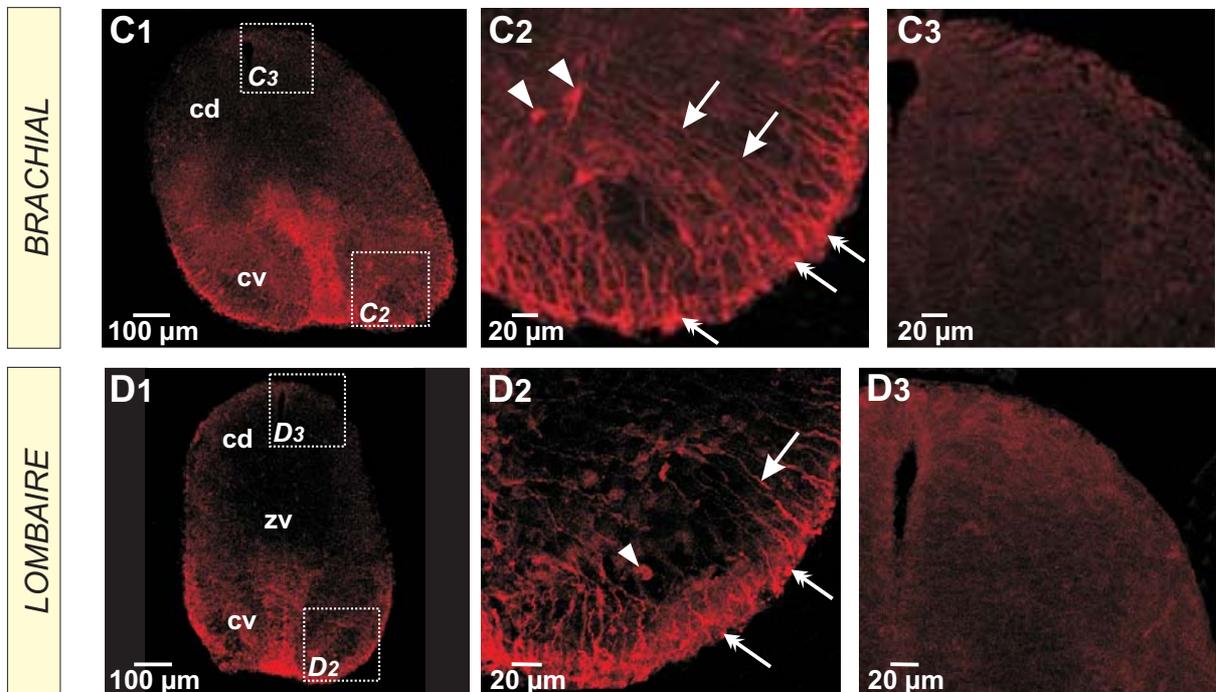
**2) Envahissement progressif de la corne dorsale**

Au **stade E13,5**, les premières cellules glycinergiques sont détectées dans la substance grise dorsale aux deux niveaux considérés (Fig. 25A1,A3 et B1,B3). C'est dans la substance grise ventrale que l'on trouve le plus de corps cellulaires Gly-ir (Fig. 25A1-2, B1-2).

## E11,5



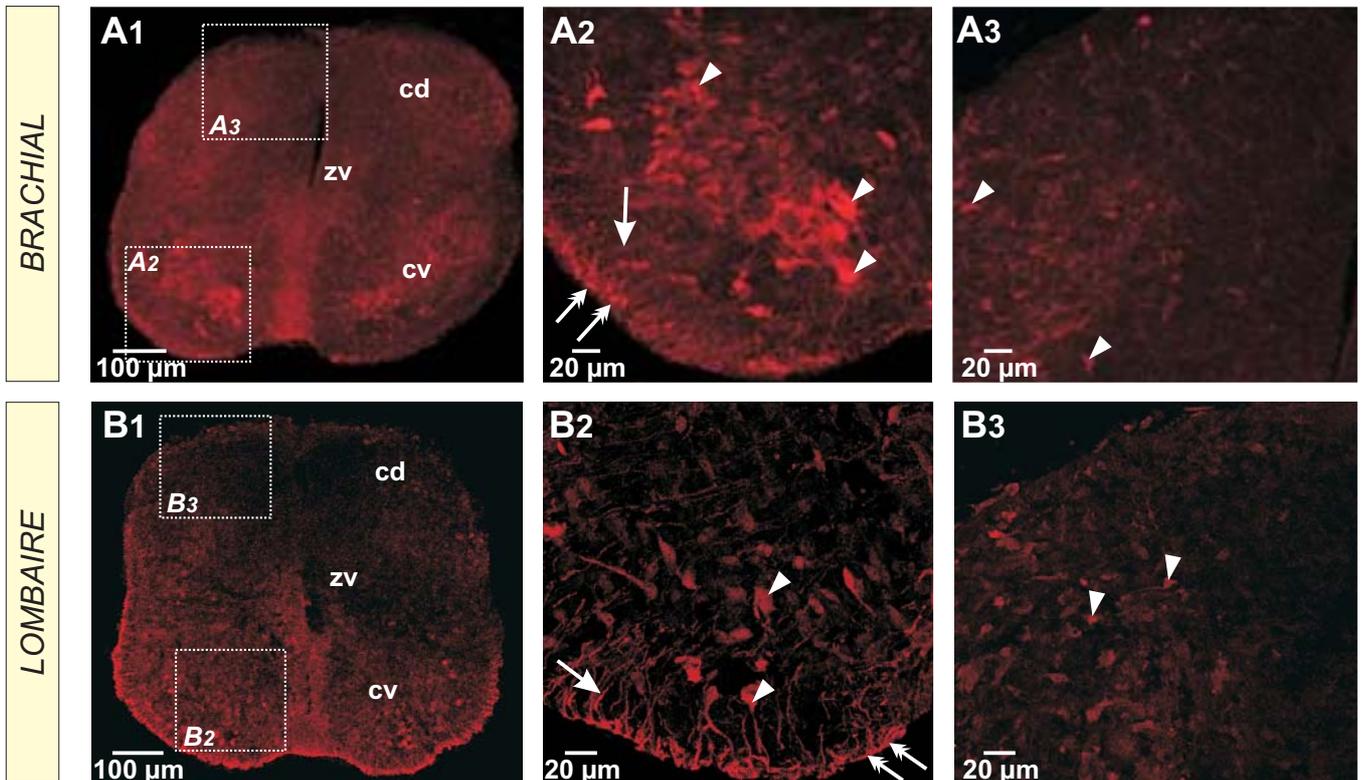
## E12,5



**Figure 24 : Première visualisation de fibres glycinergiques au stade E11,5, premiers corps cellulaires au stade E12,5**

Au stade E11,5, quelques fibres Gly-ir, localisées dans la substance blanche ventrale, sont observées au niveau brachial (A), aucun marquage n'est détecté au niveau lombaire (B). (C1, C2) Au niveau brachial, des cellules Gly-ir sont détectées dans la substance grise ventro-médiane (C2, têtes de flèches), les cellules marquées au niveau lombaire sont rares (D2, têtes de flèches). Un réseau dense de fibres Gly-ir est détecté dans la substance blanche ventrale en position médio-latérale, au niveau brachial et lombaire (C2, D2, flèches). Ces fibres parcourent la moelle transversalement et forment des extensions sur la bordure de la substance blanche (doubles flèches). Ces fibres sont en nombre plus important au niveau brachial. (C3, D3) Aucun marquage glycine n'est détecté dans la corne dorsale. Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, zv : zone ventriculaire

E13,5



**Figure 25 : Stade E13,5, localisation préférentielle de l'immunoréactivité glycine dans la corne ventrale**

(A1-A3) Au niveau brachial, les corps cellulaires Gly-ir sont localisés dans la substance grise ventrale en position ventro-médiane et ventro-latérale (têtes de flèches, A2) mais les premières cellules immunoréactives sont détectées aussi dans la corne dorsale (têtes de flèches, A3). Des fibres Gly-ir sont détectées dans la zone marginale ventrale (flèche et doubles flèches, A2). (B1-B3) Au niveau lombaire, le marquage glycine est faible. Dans la corne ventrale, de rares cellules GABA-ir sont détectées (têtes de flèches, B2) et de nombreuses fibres sont marquées (flèches et doubles flèches, B2). Peu de cellules Gly-ir sont observées dans la corne dorsale (B3, têtes de flèches).

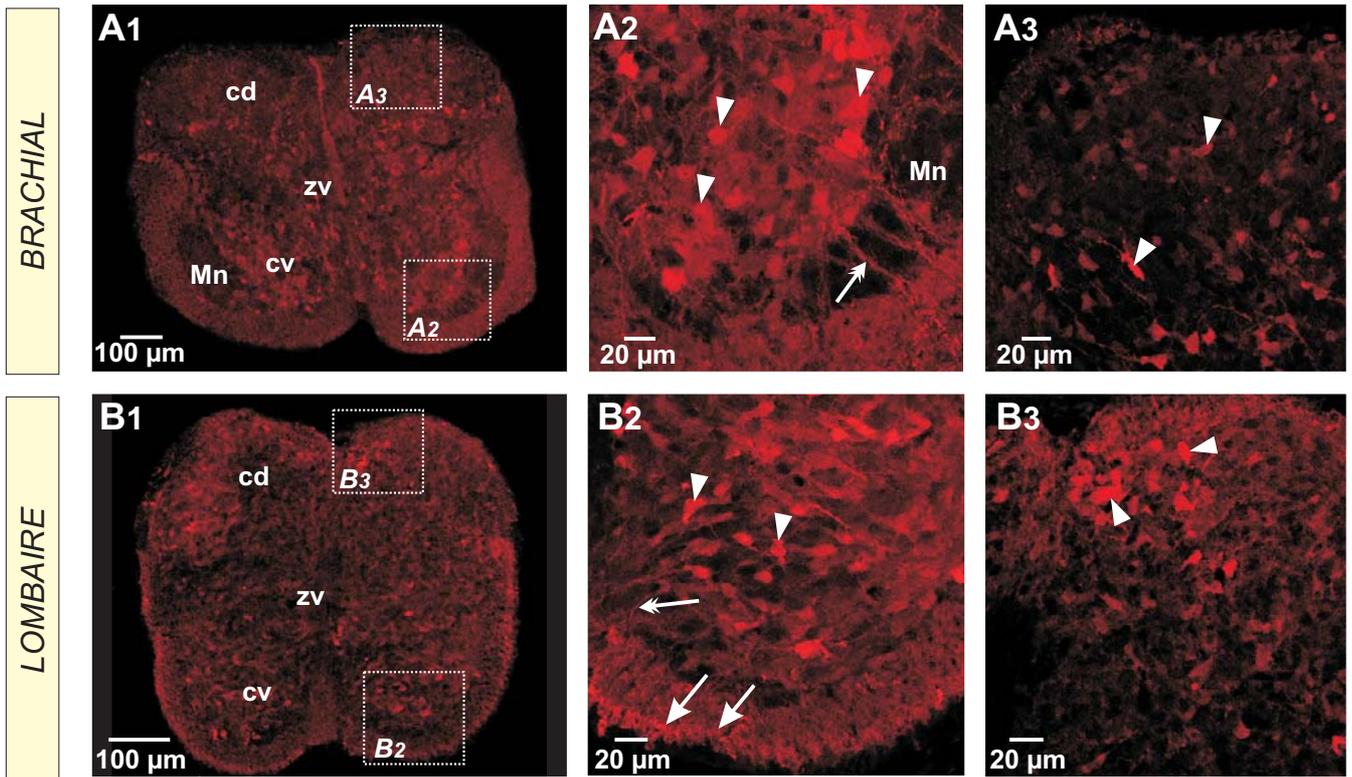
Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, zv : zone ventriculaire

Sur cette partie ventrale de la substance grise, un nombre plus important de cellules Gly-ir est observé au niveau brachial (Fig. 25A2, têtes de flèches) tandis que les somata immunoréactifs pour la glycine sont en quantité moindre au niveau lombaire et confinés dans la partie ventromédiane (Fig. 25B2, têtes de flèches). Des différences dans la distribution des fibres Gly-ir peuvent également être notées : au niveau brachial, dans la future substance blanche (zone marginale), un nombre moins important de fibres Gly-ir est détecté par rapport au stade de développement précédent (Fig. 25A2, flèche et doubles flèches). De plus, des fibres orientées longitudinalement commencent également à être détectées sous forme de marquage ponctiforme, au niveau brachial. Un funiculus de fibres Gly-ir très dense est aussi détecté dans la substance blanche dorso-latérale (Fig. 25A1). Au niveau lombaire, les fibres glycinergiques présentent la même morphologie qu'au stade E12,5. En effet, des fibres Gly-ir marquées de façon intense, provenant certainement de la substance grise, parcourent la moelle transversalement jusqu'à atteindre la pie mère (Fig. 25B2, flèches et têtes de flèches).

Au **stade E14,5**, au niveau brachial, un pattern similaire est observé par rapport au stade E13,5 (données non montrées) mais le nombre de somata Gly-ir augmente légèrement dans la corne dorsale. Au niveau lombaire, le nombre de cellules Gly-ir augmente dans les cornes ventrale et dorsale tandis que les fibres Gly-ir qui parcourent la moelle ventrale transversalement sont pratiquement absentes et sont « remplacées » par un marquage ponctiforme.

Au **stade E15,5**, comme le montre la Figure 26A1,B1, les niveaux rostraux et caudaux présentent de nombreux somata Gly-ir. Au niveau brachial, le nombre de corps cellulaires Gly-ir reste élevé dans la partie ventrale de la moelle épinière (Fig. 26A2, têtes de flèches) tandis que le nombre de cellules marquées augmente légèrement dans la substance grise dorsale (Fig. 26A3, tête de flèches) (voir quantifications Fig. 31). Le marquage a permis de mettre en évidence les zones non marquées correspondant aux colonnes motoneuronales

## E15,5



### **Figure 26 : Stade E15,5, expression de nombreuses cellules dans la substance grise**

Au niveau brachial, le nombre de cellules Gly-ir est important dans la moelle épinière ventrale (A1, A2, têtes de flèches) et augmente dans la substance grise dorsale par rapport au stade précédent (A1, A3, têtes de flèches). Noter la présence de fibres dans la substance grise ventrale latérale au niveau des colonnes motoneuronales non marquées (A2, doubles flèches). Au niveau lombaire, de nombreuses cellules sont marquées dans la substance grise ventro-latérale (B1, B2, têtes de flèches). Dans la corne dorsale, les cellules Gly-ir sont localisées essentiellement dans les couches les plus dorsales de la substance grise (B1, B3, têtes de flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire

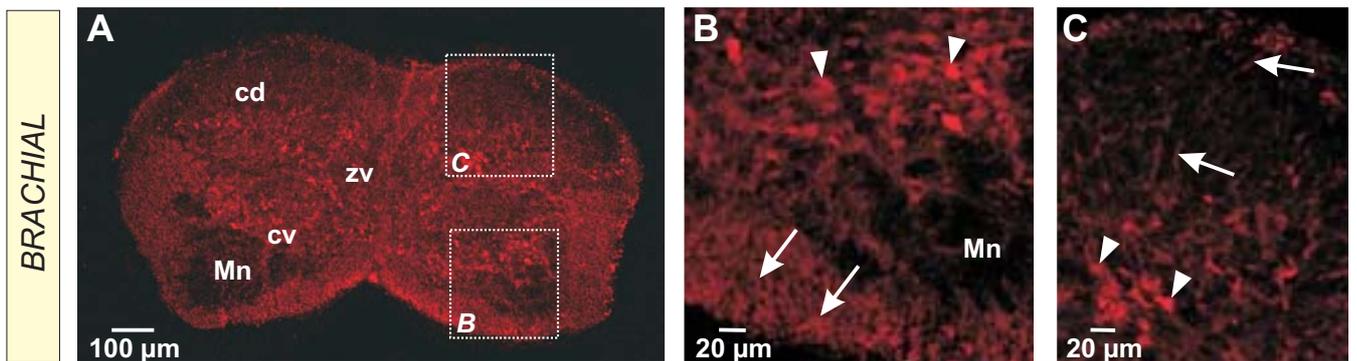
ventro-latérales et ventro-médianes. Au niveau lombaire, de nombreux corps cellulaires glycinergiques sont visibles dans la substance grise ventrale (Fig. 26B2). Si l'on compare avec le niveau brachial, on trouve, dans la zone intermédiaire, moins de cellules Gly-ir autour de la zone ventriculaire (comparer Fig. 26B1 à Fig. 26A1). Dans la corne dorsale, les cellules Gly-ir sont localisées essentiellement dans les couches supérieures de la future substance grise (Fig. 26B3, têtes de flèches). De nombreuses fibres orientées de façon longitudinale sont également détectées dans la future substance blanche (Fig. 26A2, B2, flèches).

Au **stade E16,5**, au niveau brachial, les cellules marquées sont distribuées de façon uniforme dans les deux cornes (Fig. 27A et voir quantification Figure 31). On peut remarquer tout de même que les cellules Gly-ir dans la corne ventrale ne sont plus localisées autour des colonnes de motoneurones mais sont positionnées plus dorsalement et autour de la zone ventriculaire (Fig. 27B, têtes de flèches). Des fibres Gly-ir ont également été détectées dans la substance blanche ventrale (Fig. 27B, flèches). Dans la corne dorsale, aucun marquage glycine n'a été observé dans les couches les plus dorsales (Fig. 27C) ; il a été montré précédemment (Chapitre II, paragraphe B) que ces couches les plus dorsales de la substance grise contenaient les neurones GABAergiques (voir Figure 21), ainsi les deux populations de neurones GABAergiques et glycinergiques ne semblent pas co-localisées dans la moelle dorsale. Les corps cellulaires Gly-ir de la corne dorsale sont en effet répartis dans les couches dorsales plus profondes (Fig. 27C, têtes de flèches).

### **3) Localisation préférentielle du marquage glycine dans la corne dorsale et diminution du nombre de cellules Gly-ir dans la corne ventrale**

Le **stade E17,5** marque le moment où, pour la première fois, la quantité de cellules Gly-ir est prépondérante dans la corne dorsale de la moelle épinière (Fig. 28A1 et voir quantifications Fig. 31) . Au niveau brachial, seuls quelques corps cellulaires Gly-ir sont

## E16,5

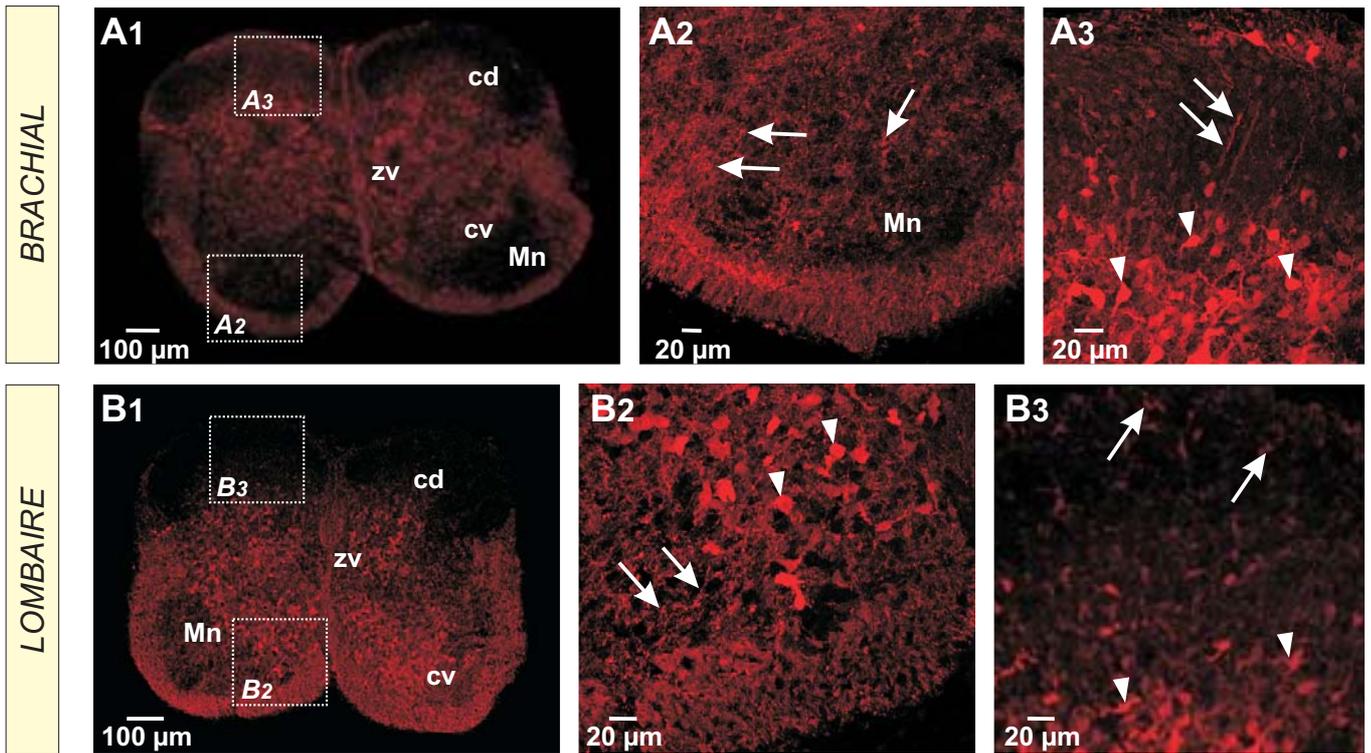


**Figure 27 : Stade E16,5, forte immunoréactivité anti-glycine dans la substance grise à l'exception des couches dorsales superficielles**

Au niveau brachial (A), les cellules marquées sont distribuées uniformément dans la substance grise ventrale (B, têtes de flèches) et dorsale (C, têtes de flèches). Noter la présence de fibres Gly-ir dans la substance blanche ventrale (A2, flèches) et dans les couches les plus superficielles de la substance grise dorsale (A3, flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire

## E17,5



**Figure 28 : Stade E17,5, localisation préférentielle de l'immunoréactivité anti-glycine dans la corne dorsale**

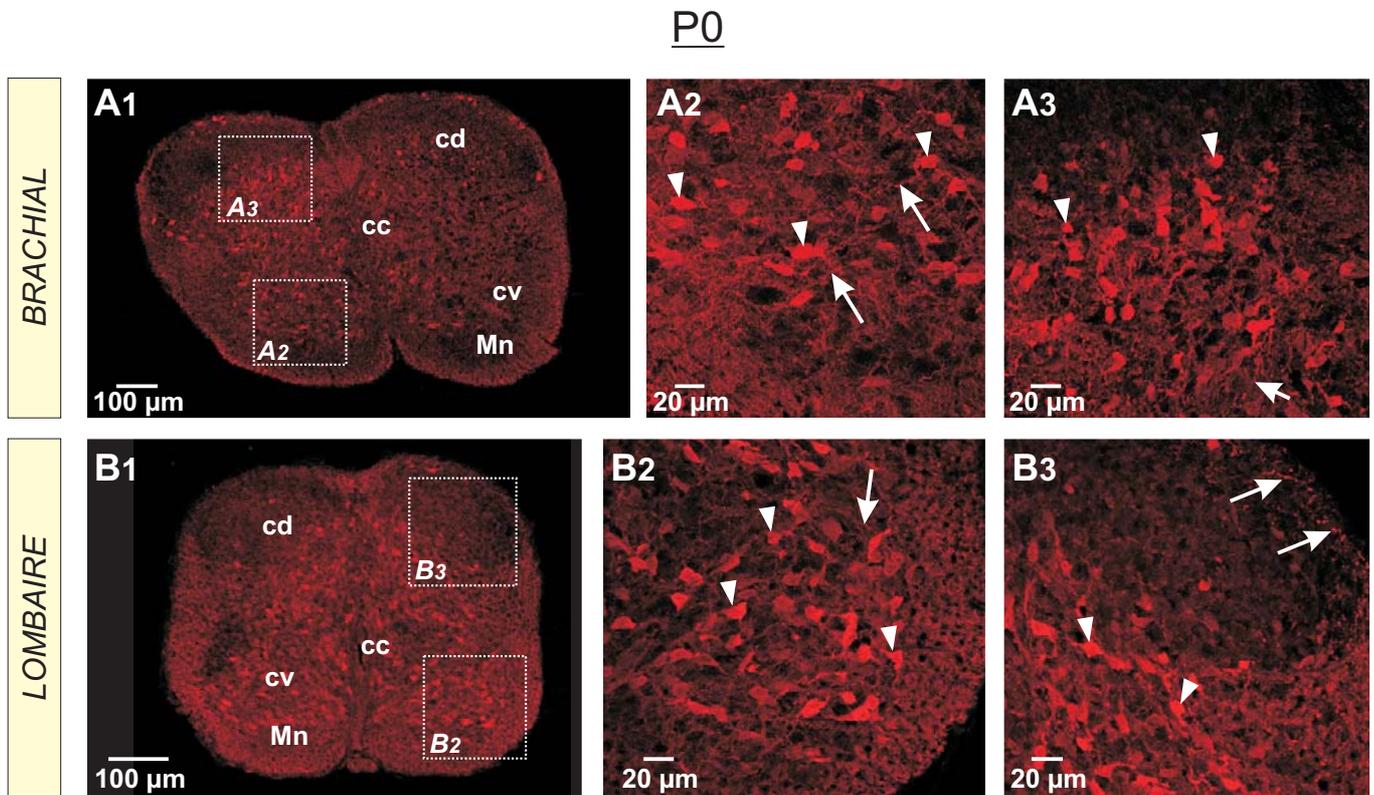
Au niveau brachial, l'immunoréactivité glycine est concentrée dans la corne dorsale de la moelle épinière (A1, A3, têtes de flèches). Des fibres Gly-ir (flèches A2) sont détectées dans la corne ventrale mais pas de corps cellulaires. Au niveau lombaire, les corps cellulaires Gly-ir sont distribués uniformément dans les cornes ventrale et dorsale de la moelle épinière (B1-3, têtes de flèches) sauf dans les couches dorsales les plus superficielles où aucun marquage n'est détecté (B3). Noter la présence de fibres Gly-ir dans la corne dorsale (B3, flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire

observés dans la partie ventrale de la moelle (Fig. 28A1-2), en revanche de nombreuses cellules marquées occupent la partie la plus profonde de la corne dorsale (Fig. 28A3, têtes de flèches). Au niveau lombaire, le marquage glycine est réparti de façon uniforme dans les cornes ventrale et dorsale de la moelle épinière sauf dans les couches les plus superficielles de la corne dorsale où aucun marquage n'est observé (Fig. 28B1). Cette distribution est identique à celle observée au stade E16,5 au niveau brachial (comparer Figures 28B1 et 27A). En effet, une quantité importante de corps cellulaires Gly-ir est détectée dans la corne ventrale au niveau brachial au stade E16,5 (Fig. 27A,B) et au niveau lombaire, au stade E17,5 (Fig. 28B1,2). Au stade E17,5, le nombre de somata Gly-ir est plus faible au niveau brachial, dans la moelle épinière ventrale (Fig. 28A1,2). Le nombre de fibres marquées augmente dans la substance grise ventrale et dorsale (Fig. 28A2-3 et B2-3) avec une densité plus importante dans la corne ventrale au niveau brachial (flèches, Fig. 28A2).

Enfin, lorsque l'on compare les stades de développement embryonnaire **au stade P0**, chez le nouveau-né, le profil observé est identique à celui observé au stade E17,5 (Fig. 29A1,B1). L'immunoréactivité glycine est relativement uniforme dans les cornes ventrales et dorsales aux deux niveaux étudiés (comparer les Fig. 28 et 29). De nombreuses fibres Gly-ir longitudinales sont également observées dans la substance grise et la substance blanche (flèches, Fig. 29A2-3 et B2-3).

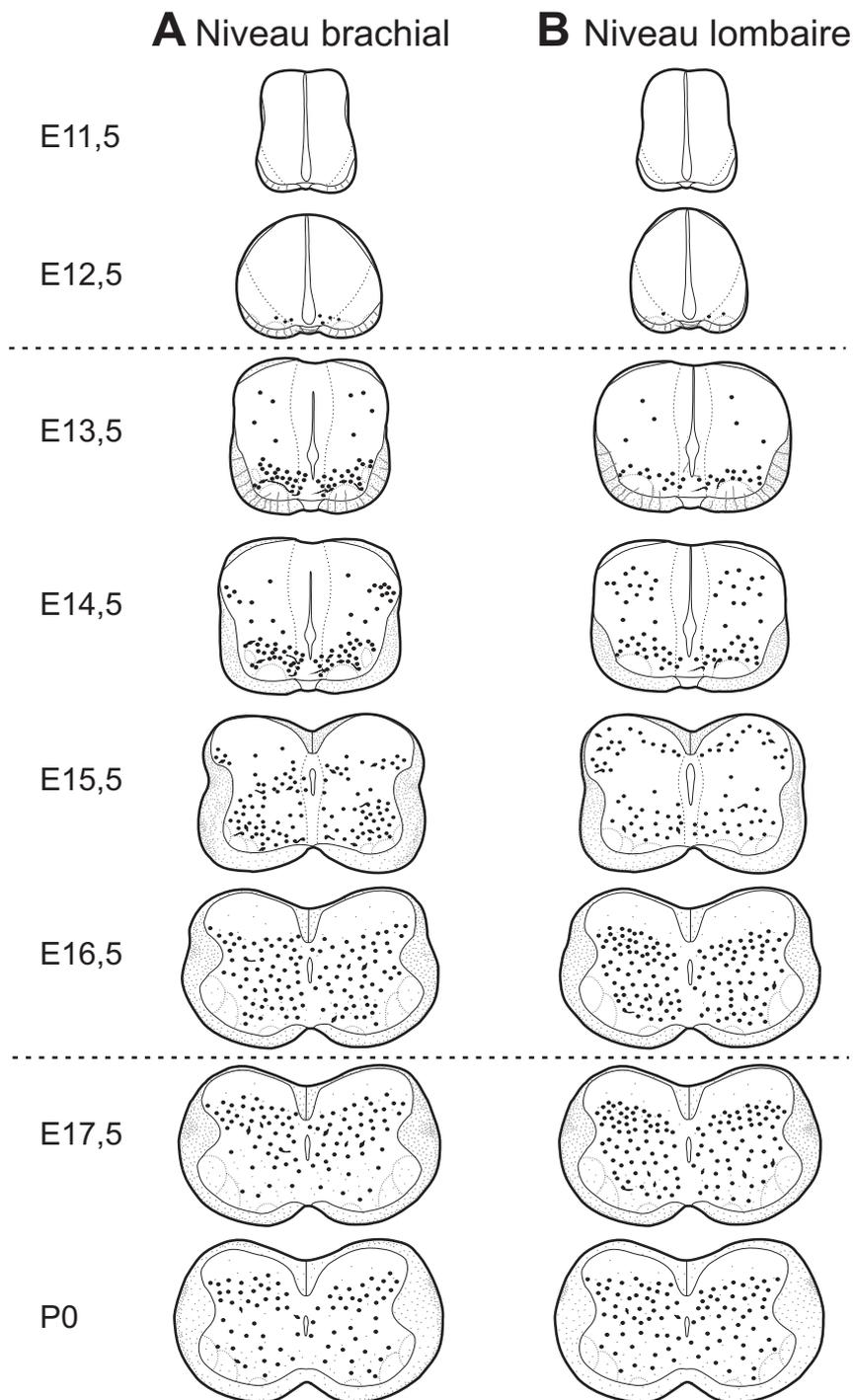
L'ensemble de ces données, concernant l'évolution spatio-temporelle de la population spinale glycinergique, est schématisé dans la Figure 30. Ainsi, ce schéma montre que les premières évidences de marquages glycine sont détectées dans la moelle ventrale entre les stades E11,5 et E12,5. Entre les stades E13,5 et E16,5, les cellules glycinergiques envahissent la corne dorsale. Les cellules glycine-ir sont enfin localisées préférentiellement dans les couches profondes de la corne dorsale entre les stades E17,5 et P0.



**Figure 29 : Stade P0, stabilisation de l'immunoréactivité anti-glycine**

Au niveau brachial (A1), les cellules Gly-ir sont localisées préférentiellement dans la corne dorsale. Au niveau lombaire (B1), le marquage glycine est uniforme dans les cornes ventrales et dorsales. De nombreuses cellules Gly-ir sont détectées dans la moelle ventrale (A2, B2, têtes de flèches) et la moelle dorsale (A3, B3, têtes de flèches). Dans les couches dorsales les plus superficielles, seules des fibres sont Gly-ir (B3, flèches).

Abréviations : cc : canal central, cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire



**Figure 30 : Représentation schématique de la mise en place du système glycinergique au cours du développement embryonnaire chez la souris**

Les contours externes des schémas soulignent la forme générale des coupes transversales de moelles épinières, aux niveaux brachial (A) et lombaire (B), aux différents stades de développement. Les contours internes (trait fin) délimitent la substance blanche de la substance grise. Les lignes pointillées entourent les régions non marquées des colonnes motoneuronales. Les gros points noirs correspondent aux cellules Gly-ir, les petits points noirs aux fibres glycinergiques.

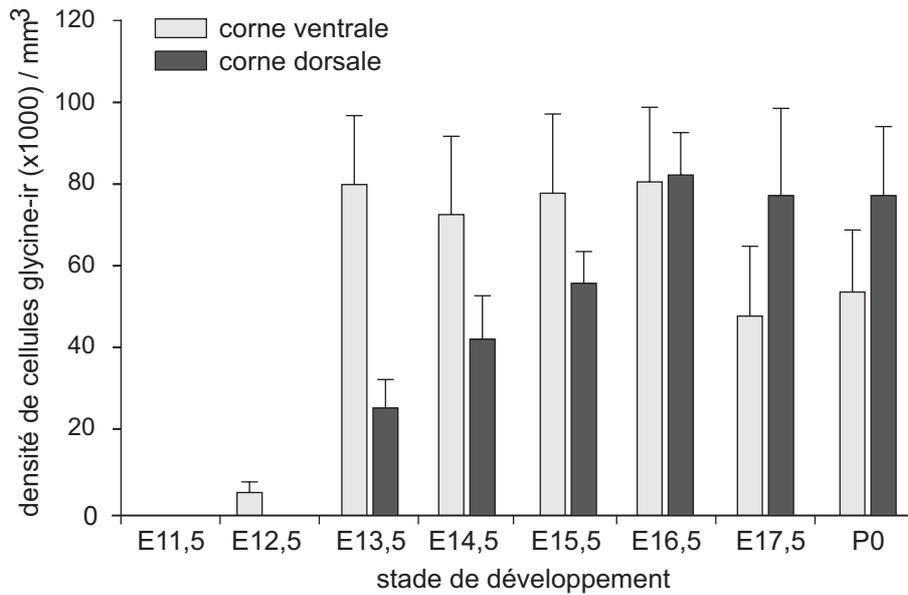
Aux stades E11,5 et E12,5, l'immunoréactivité glycine est préférentiellement localisée dans la corne ventrale. Le marquage glycine s'étend dans la corne dorsale entre les stades E13,5 et E16,5. Aux stades plus tardifs, les cellules Gly-ir sont localisées préférentiellement dans la corne dorsale. Chaque schéma a été établi à partir des acquisitions confocales.

Afin de préciser ces observations, une quantification a été réalisée grâce à la méthode du « physical disector » aux niveaux brachial et lombaire, dans la moelle épinière ventrale et dorsale (Figure 31). Au niveau brachial dans la corne ventrale, la densité de cellules glycinergiques est faible au stade E12,5 ( $5,5 \pm 2,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), atteint un maximum au stade E13,5 ( $80,2 \pm 16,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), reste stable jusqu'au stade E16,5 ( $80,8 \pm 18,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) puis enfin, diminue aux stades plus tardifs de développement ( $54,2 \pm 15 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 31A, barres grises). Dans la corne dorsale, les premiers somata gly-ir sont identifiés au stade E13,5 ( $26,1 \pm 6,9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), le maximum de densité de cellules glycinergiques est détecté au stade E16,5 ( $82,5 \pm 10,3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) puis cette densité de cellules reste haute jusqu'au stade P0 ( $77,5 \pm 16,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 31A, barres noires).

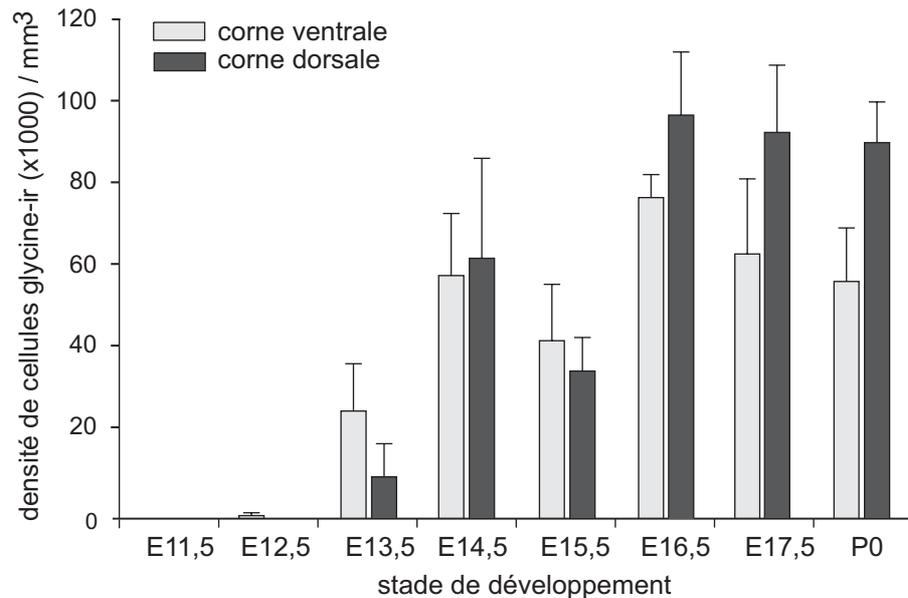
Au niveau lombaire dans la moelle ventrale, la densité de cellules Gly-ir est très faible au stade E12,5 ( $0,7 \pm 0,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), augmente aux stades ultérieurs de développement et atteint un maximum au stade E16,5 ( $77,1 \pm 5,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) enfin, cette densité diminue légèrement au stade P0 ( $56,9 \pm 12,8 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 31B, barres grises). Dans la moelle épinière dorsale (Fig. 31B, barres noires), une évolution similaire a été observée mis à part le fait que les premières cellules glycinergiques n'ont été détectées qu'au stade E13,5 ( $10 \pm 7,9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>). Le pic de densité de cellules Gly-ir est observé au stade E16,5 ( $96,8 \pm 15,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) puis cette densité diminue légèrement jusqu'au stade P0 ( $90,3 \pm 9,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>).

Ainsi, l'analyse quantitative permet de révéler un délai dans l'apparition des premières cellules glycinergiques entre les cornes ventrales et dorsales : premières cellules à E12,5 dans la corne ventrale, E13,5 dans la corne dorsale. Au niveau brachial, un changement de localisation de l'immunoréactivité glycine de la corne ventrale vers la corne dorsale de la substance grise est également observé entre les stades E13,5 et E17,5. Par contre, au niveau lombaire, la mise en place du phénotype glycine suit le même pattern. Enfin, un délai rostro-

### A niveau brachial



### B niveau lombaire



**Figure 31 : Evolution des densités de corps cellulaires glycinergiques dans les cornes ventrales et dorsales dans la moelle épinière embryonnaire de souris à différents stades de développement : analyse quantitative**

La densité de cellules Gly-ir est relevée des stades E11,5 à P0 dans la moelle épinière ventrale (histogrammes gris) et dorsale (histogrammes noirs) au niveau brachial (A) et lombaire (B). Au niveau brachial, la densité de cellules Gly-ir est plus importante dans la corne ventrale entre les stades E13,5 et E16,5 alors qu'après le stade E16,5, la densité est plus importante dans la corne dorsale. Au niveau lombaire, la densité de cellules Gly-ir évolue de la même façon avec une inversion du ratio de densité entre la moelle ventrale et la moelle dorsale au stade E16,5. Dans chaque graphe, chaque barre correspond à une moyenne de 4 à 6 mesures.

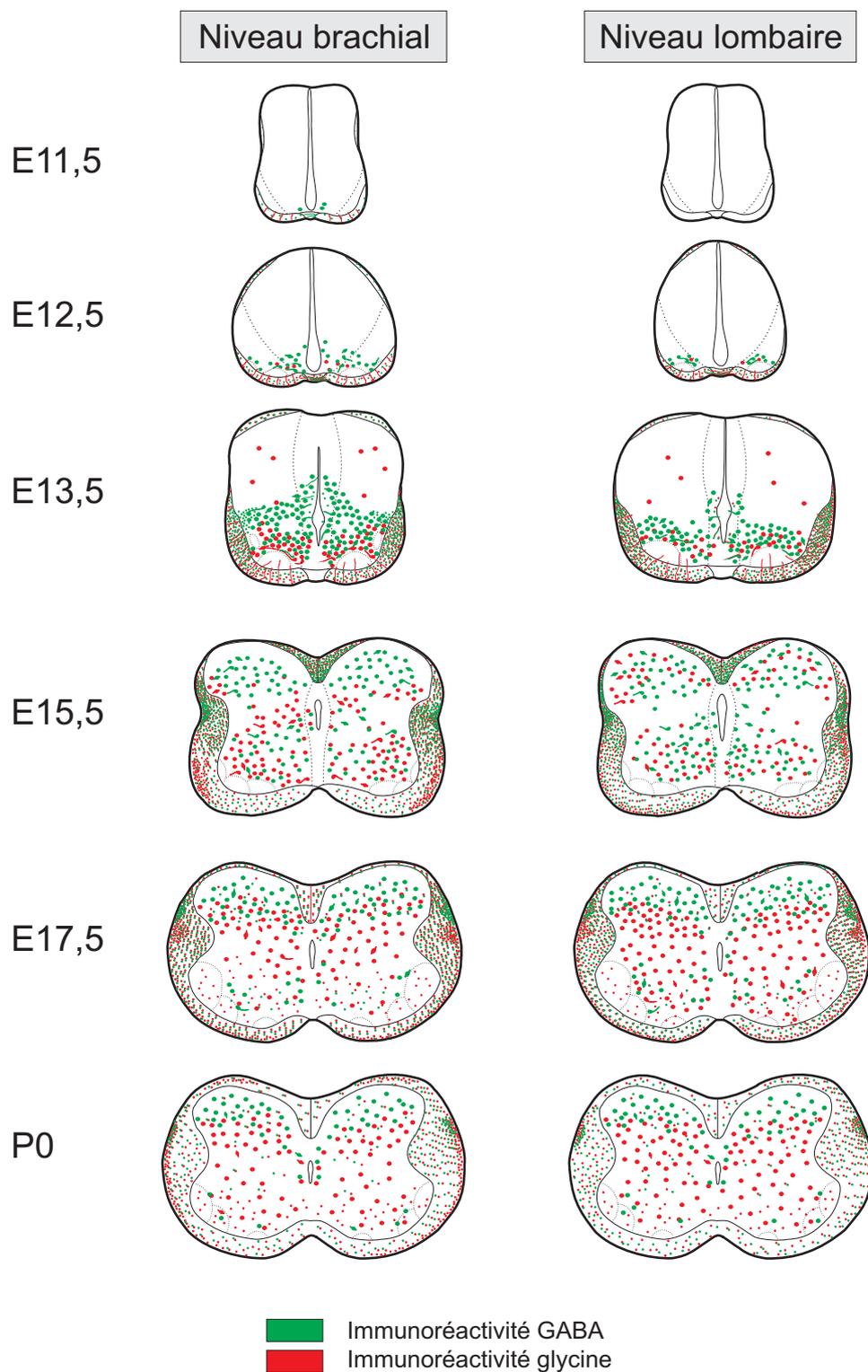
caudal de trois jours est observé dans la mise en place de l'immunoréactivité glycine dans la moelle épinière ventrale : le pic de densité de cellules Gly-ir est détecté au stade E13,5 dans la moelle épinière brachiale ; au stade E16,5 dans la moelle épinière lombaire. Dans la corne dorsale, le délai rostro-caudal est difficile à observer puisque le pic de densité est atteint au stade E16,5 aux deux niveaux étudiés.

#### **D- ETUDE DES CO-LOCALISATIONS ENTRE LES POPULATIONS GABAERGIQUES ET GLYCINERGIQUES**

Bien que l'ontogenèse des systèmes glycinergiques et GABAergiques décrite précédemment expriment des différences, en particulier le moment d'apparition des premières cellules ou encore la localisation finale des ensembles de cellules contenant du GABA ou de la glycine, des similarités dans le développement de ces deux populations peuvent être remarquées (Figure 32). En effet, ces deux systèmes apparaissent tôt au cours du développement embryonnaire et leur maturation s'effectue selon un gradient rostro-caudal et ventro-dorsal.

De nombreux travaux ont décrit des co-localisations entre les systèmes GABAergiques et glycinergiques dans la moelle épinière : en particulier, des co-localisations dans les corps cellulaires, les axones et les terminaisons neuronales (Ornung et al., 1994; Todd, 1996; Todd and Sullivan, 1990), ou des co-localisations des récepteurs glycinergiques et GABA<sub>A</sub> dans la moelle épinière (Bohlhalter et al., 1994).

Dans ce contexte, l'existence de doubles marquages GABA/glycine a été recherchée dans la moelle épinière. Une analyse immunohistochimique et une étude quantitative ont donc été réalisées sur des coupes transversales de moelle épinière brachiales à trois stades de développement : au stade E13,5 (n = 4) où le GABA et la glycine ont une action purement



**Figure 32 : Comparaison de la mise en place des systèmes glycinergiques et GABAergiques au cours du développement embryonnaire**

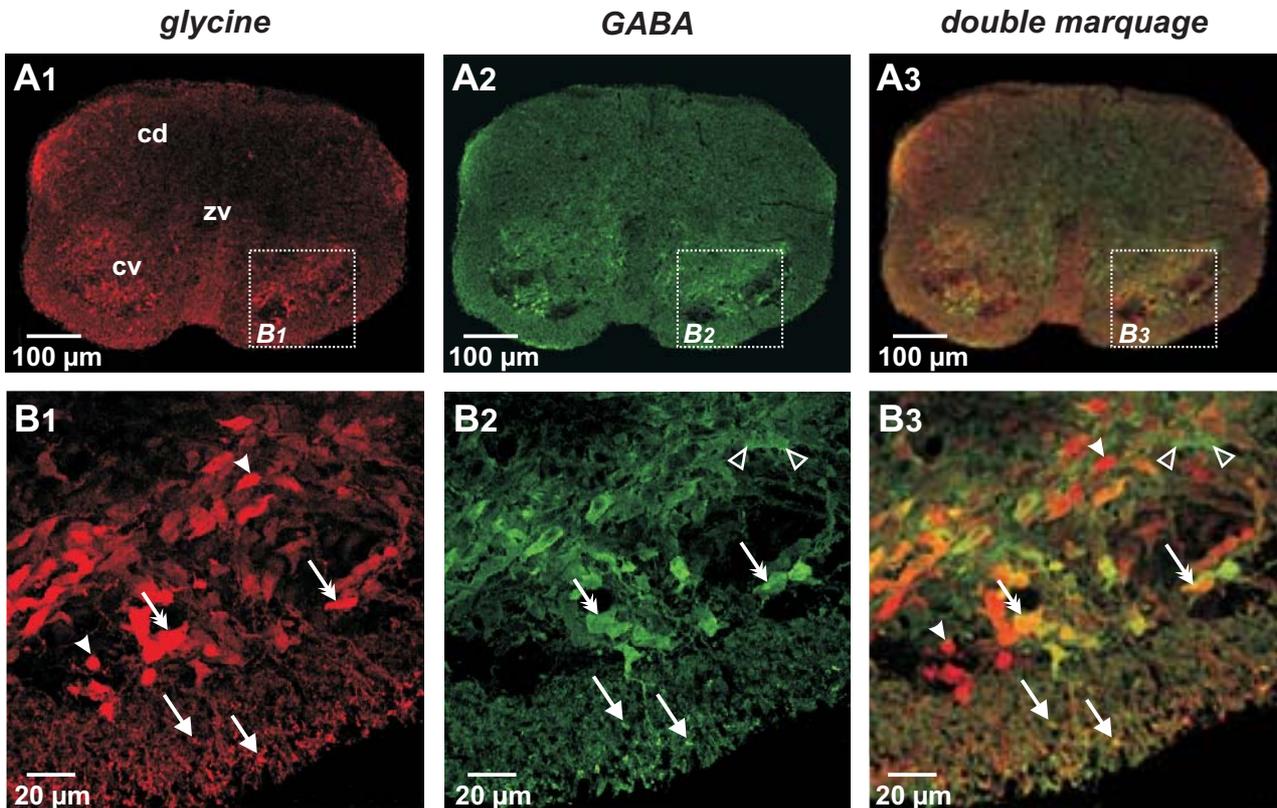
Les systèmes GABA et glycinergiques apparaissent tôt au cours du développement embryonnaire, d'abord dans la moelle épinière brachiale : les premières cellules GABA-ir sont détectées au stade E11,5 alors que les premières cellules glycinergiques apparaissent au stade E12,5. Dans la moelle lombaire, les cellules GABA-ir et Gly-ir sont détectées au stade E12,5 en faible quantité : la mise en place des populations GABA et glycinergiques s'effectue selon un axe rostro-caudal. La maturation de ces deux populations s'effectue également selon un gradient ventro-dorsal : les cellules GABA et glycinergiques sont d'abord localisées préférentiellement dans la corne ventrale aux stades E11,5 et E12,5. Puis, les cellules envahissent la totalité de la substance grise : au stade E13,5 pour les cellules GABA-ir, au stade E15,5 pour les cellules Gly-ir. Enfin, les immunoréactivités GABA et glycine sont préférentiellement localisées dans la corne dorsale aux stades plus tardifs de développement. La localisation finale des deux populations est différente : les cellules GABA-ir occupent les couches dorsales les plus superficielles alors que les cellules Gly-ir sont localisées dans les couches dorsales les plus profondes.

excitatrice sur les réseaux neuronaux qui expriment alors des activités rythmiques synchrones, au stade E15,5 (n = 3) où les activités GABA/glycine sont mixtes (excitation et inhibition) et où apparaissent les premières activités rythmiques évoquées alternées (Branchereau et al., 2000a), et enfin au stade E17,5 (n = 4), les deux neurotransmetteurs étant alors inhibiteurs et les activités rythmiques de type locomoteur complètement alternées (Branchereau et al., 2000a; Hanson and Landmesser, 2003; Myers et al., 2005).

Nos résultats montrent qu'au **stade E13,5**, les éléments immunoréactifs pour le GABA ou la glycine sont localisés essentiellement dans la corne ventrale. Parmi les cellules marquées pour le GABA ou la glycine, des cellules doublement marquées pour les deux neurotransmetteurs peuvent être détectées (comparer Fig. 33A1-A2 avec Fig. 33A3). Ces co-localisations sont observées dans la partie ventro-latérale de la substance grise (Fig. 33A3, B3). Dans cette région, trois types de cellules ont pu être observées : des cellules Gly-ir (Fig. 33, têtes de flèches), des cellules GABA-ir (Fig. 33, têtes de flèches ouvertes) et des cellules mixtes GABA/glycine (Fig. 33, doubles flèches). De même, un grand nombre de fibres doublement marquées a été détecté sur la bordure externe de la zone marginale (Fig. 33B1-3, flèches).

Au **stade E15,5**, la localisation des cellules doublement marquées est identique à celle observée au stade E13,5 (comparer Fig. 34A1-A3 avec Fig. 33). En effet, les cellules mixtes GABA/glycine sont localisées essentiellement dans la corne ventrale (Fig. 34A1-3, B1-3) bien que les deux populations de cellules soient retrouvées dans la totalité de la substance grise. Quelques rares cellules doublement marquées sont observées dans la corne dorsale (Fig. 34C1-3). Des fibres doublement marquées sont également décelées dans la zone marginale.

## Stade E13,5

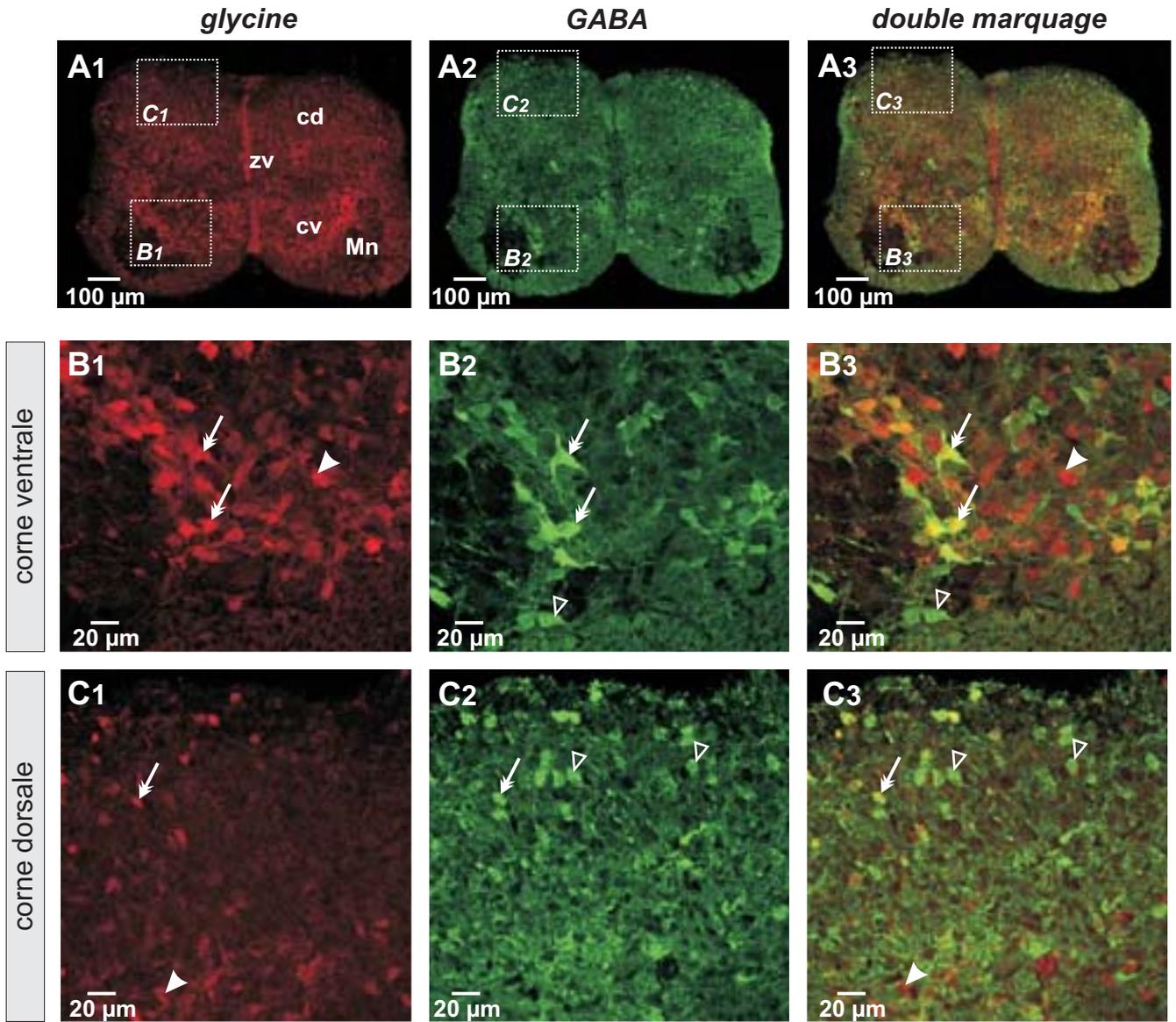


### **Figure 33 : Co-localisations GABA/glycine au stade E13,5**

Immunoréactivité glycine (A1), GABA (A2) et double marquage GABA/glycine (A3) sur une coupe transversale de moelle épinière brachiale. Dans la corne ventrale, trois populations de cellules peuvent être visualisées : des cellules Gly-ir (B1, B3, têtes de flèches), des cellules GABA-ir (B2, B3, têtes de flèches ouvertes), des cellules mixtes GABA/glycine (B1-3, doubles flèches). Les co-localisations GABA/glycine sont observées dans la substance grise ventro-latérale (A3, B3, doubles flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, zv : zone ventriculaire

## Stade E15,5



**Figure 34 : Double marquage glycine (A1, B1, C1) et GABA (A2, B2, C2) au stade E15,5**

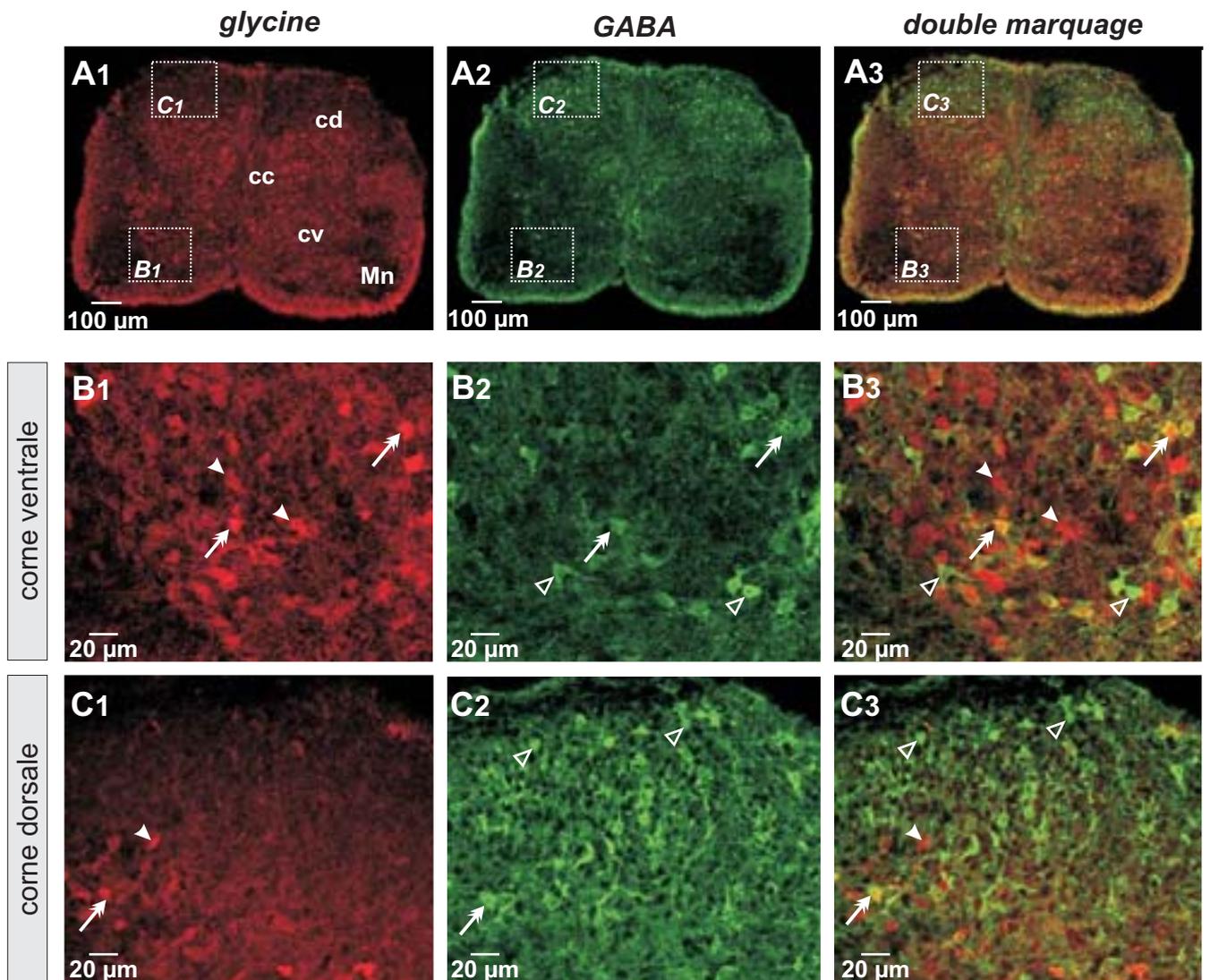
Les co-localisations sont distribuées essentiellement dans la corne ventrale (A3, B1-3, doubles flèches) bien que quelques rares cellules mixtes soient visualisées dans la corne dorsale (C1-3, double flèche). Les têtes de flèches désignent les somata Gly-ir (B1, B3) tandis que les têtes de flèches ouvertes désignent les corps cellulaires GABA-ir (B2, B3). Coupes transversales niveau brachial.

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire

Comme aux stades précédents, des corps cellulaires doublement marqués GABA/glycine sont détectés dans la substance grise ventrale (Fig. 35A-3, B1-3) au **stade E17,5**. Dans la corne dorsale, de rares co-localisations sont observées (Fig. 35A1-3, C1-3), en effet ces populations occupent des couches différentes dans la corne dorsale à ce stade de développement : les cellules GABAergiques sont localisées dans les couches les plus superficielles tandis que les cellules glycinergiques occupent les couches les plus profondes de la corne dorsale (Fig. 35A1-3, voir aussi Figure 32). Des fibres doublement marquées ont été également détectées dans la zone marginale.

Dans le but de mieux comprendre la dynamique d'évolution des co-localisations GABA/glycine pendant la période embryonnaire où les inhibitions intraspinales se mettent en place, nous avons analysé la proportion de cellules GABA-ir, de cellules glycine-ir et de cellules mixtes GABA/glycine dans la moelle ventrale (Figure 36). Cette analyse quantitative a été réalisée dans la corne ventrale uniquement avec comme objectif de comprendre l'importance des co-localisations GABA/glycine dans la mise en place des activités locomotrices générées par les réseaux neuronaux localisés dans la moelle épinière ventrale. Au stade E13,5, 345 cellules ont été analysées, 357 au stade E15,5 et 234 au stade E17,5. Nos données montrent que la population glycinergique est toujours la population dominante quelque soit le stade de développement analysé. En effet, les cellules Gly-ir correspondent à environ 45% de l'ensemble des cellules marquées (41,7% à E13,5, 47,3 % à E15,5 et 50% à E17,5) (voir barres rouges, Fig. 36). La population GABAergique est en revanche la plus petite population (21,1% au stade E13,5, 16,3% à E15,5 et 20,5% à E17,5) (Fig. 36, barres vertes). Enfin les cellules doublement marquées représentent environ un tiers de l'ensemble des cellules analysées (37,2% à E13,5, 36,4% à E15,5 et 29,5% à E17,5) (Fig. 36, barres jaunes). Nous n'avons pas analysé le développement des co-localisations GABA/glycine au

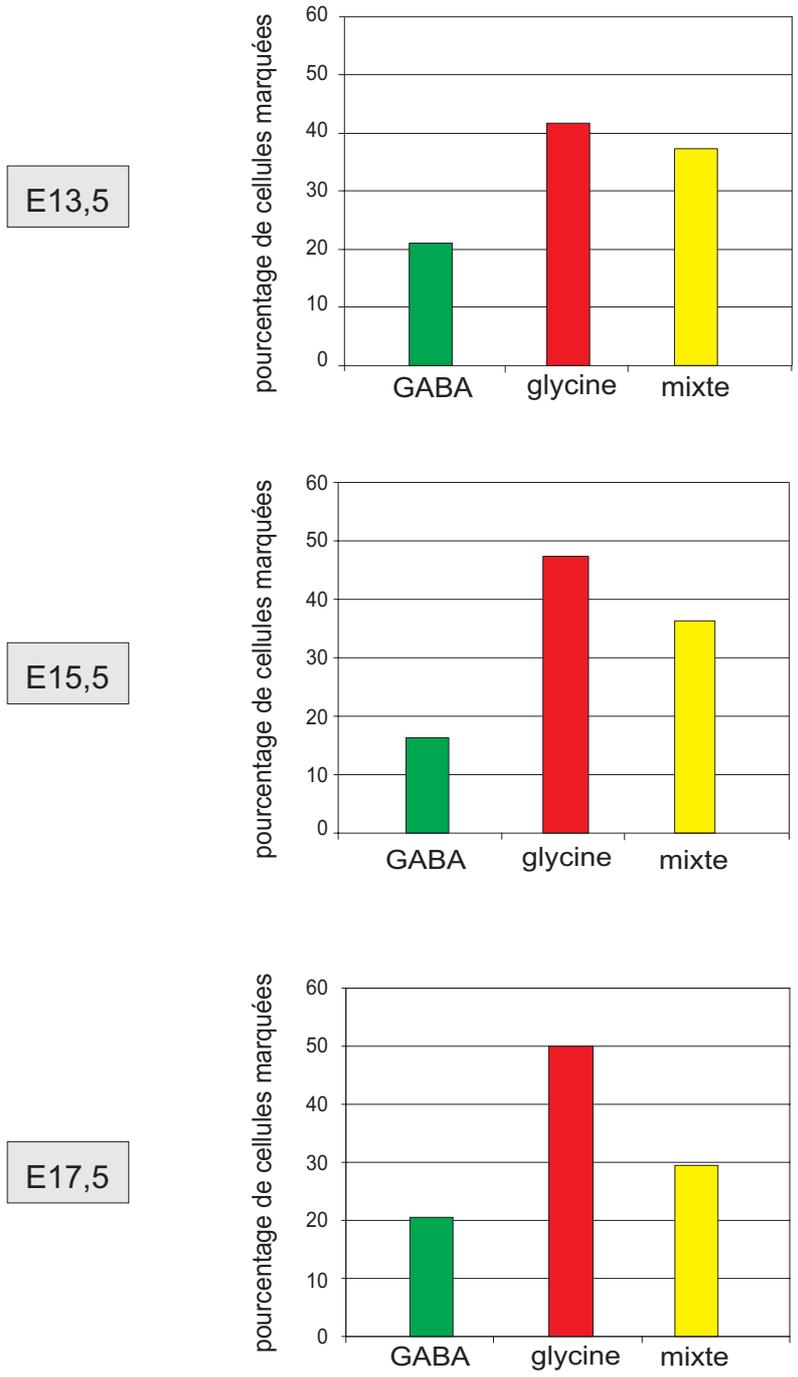
## Stade E17,5



**Figure 35 : Co-localisations GABA/glycine dans la substance grise ventrale au stade E17,5**

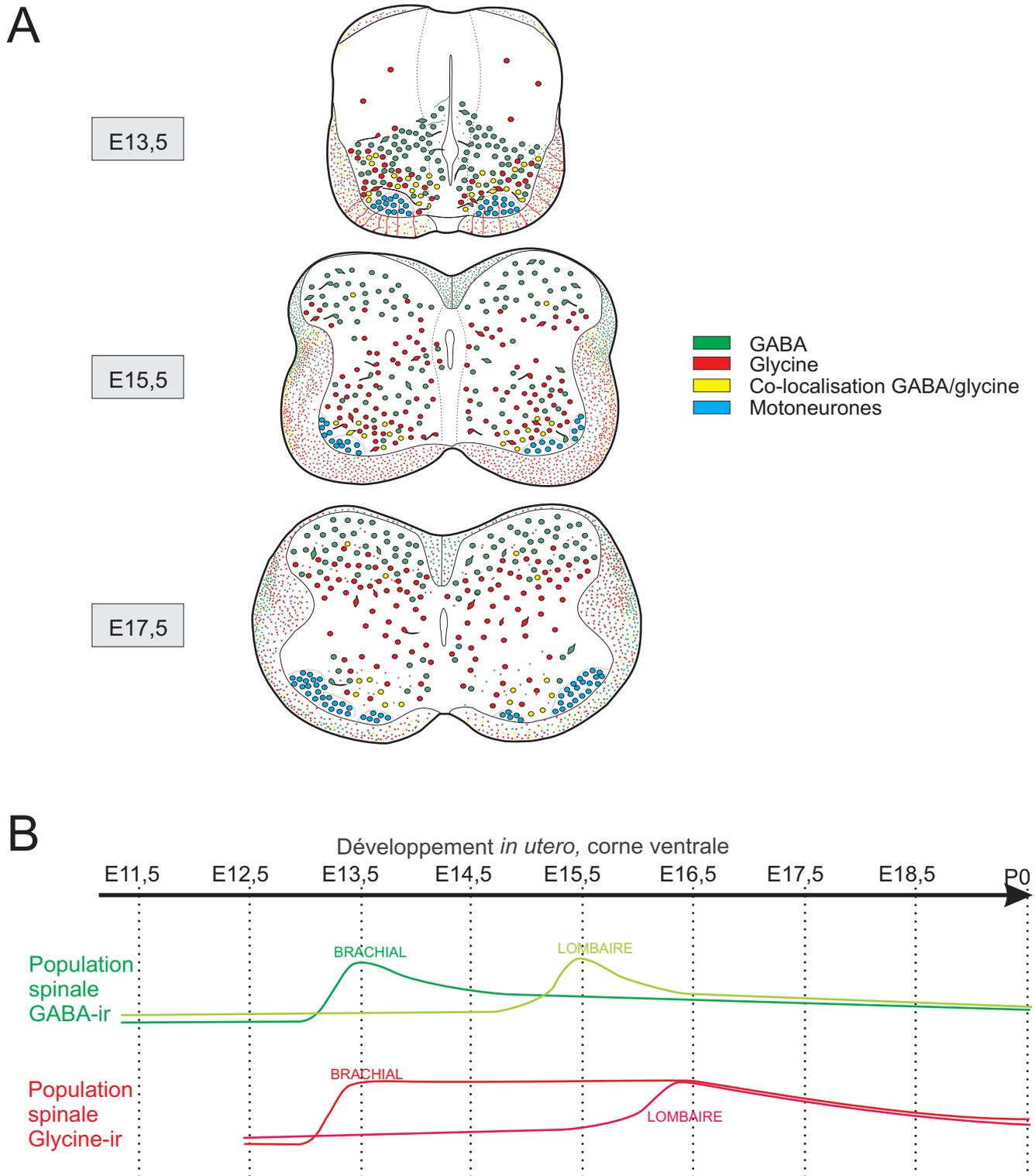
Têtes de flèches (B1, B3, C1, C3) : corps cellulaires Gly-ir ; têtes de flèches ouvertes (B2, B3, C2, C3) : somata GABA-ir ; doubles flèches (B1-3, C1-3) : cellules mixtes GABA/glycine. Bien que la localisation préférentielle des populations GABA et glycinergique soit dorsale, la majorité des corps cellulaires immunoréactifs pour le GABA et la glycine est détectée dans la substance grise ventrale (A3, B3, doubles flèches). Les co-localisations observées dans la corne dorsale sont rares, les deux populations occupant des couches différentes (A3, C3, doubles flèches).

Abréviations : cd : corne dorsale, cv : corne ventrale, Mn : motoneurones, zv : zone ventriculaire



**Figure 36 : Distribution des populations GABA, glycine et mixtes dans la substance grise ventrale au niveau brachial**

Aux trois stades étudiés, la distribution des 3 groupes de cellules (GABA, glycine et mixtes) est identique. La population de neurones Gly-ir est majoritaire et représente 40 à 50% des cellules marquées. Le pourcentage de co-localisations n'évolue pas au cours du développement (entre 30 et 40% de cellules).



**Figure 37 : Représentation schématique de la dynamique de mise en place des populations motoneuronales, GABAergiques et glycinergiques entre les stades E11,5 et P0 dans la moelle épinière de souris**

(A) Les motoneurones (en bleu) sont localisés dans la substance grise ventrale, le nombre de colonnes motoneuronales augmente au cours du développement. Les populations GABAergique (en vert) et glycinergique (en rouge) se mettent en place suivant un axe ventro-dorsal et présentent des co-localisations (en jaune) constantes au cours de l'ontogenèse. Schémas de coupes transversales au niveau brachial. (B) La mise en place des populations GABAergique et glycinergique s'effectue également selon un axe rostro-caudal. Pour chaque population, un pic de densité de cellules est détecté au niveau brachial au stade E13,5 puis un pic décalé dans le temps est détecté au niveau lombaire : au stade E15,5 pour la population GABA-ir et au stade E16,5 pour la population Gly-ir.

niveau des fibres localisées dans la substance grise ventrale et la zone marginale ventrale. Cette analyse fera l'objet de travaux futurs car elle reflète les possibles co-libérations des deux neurotransmetteurs et permet d'évaluer l'impact de ces libérations sur les réseaux de neurones.

## **E- DISCUSSION**

Grâce aux méthodes d'immunohistochimie et de microscopie confocale, ce chapitre a permis de mettre en évidence la dynamique de mise en place des populations motoneurales, GABAergiques et glycinergiques entre les stades E11,5 et P0 dans la moelle épinière de souris. Nos données montrent que, si la population de motoneurones reste localisée en position ventrale (Fig. 37A, motoneurones en bleu), le nombre de colonnes motoneurales marquées évolue en fonction du stade de développement : on passe d'une colonne en position ventro-médiane au stade E13,5, à trois colonnes au stade E17,5. Quant aux populations GABA et glycinergiques, elles évoluent de façon dynamique selon un axe ventro-dorsal. Les premières cellules GABA et glycine sont détectées dans la moelle ventrale (Fig. 37A, voir « E13,5 brachial ») mais les cellules GABAergiques apparaissent un jour plus tôt que les cellules glycinergiques (respectivement au stade E11,5 et E12,5, voir Fig. 37B). Puis les deux populations envahissent progressivement toute la substance grise (Fig. 37A, voir « E15,5 brachial »). Enfin, aux stades tardifs de développement, elles sont préférentiellement localisées dans la corne dorsale : les cellules GABAergiques occupant les couches dorsales les plus superficielles, les cellules glycinergiques étant localisées dans les couches dorsales les plus profondes (Fig. 37A, voir « E17,5 brachial »). De plus, les co-localisations entre ces deux populations spinales dans la moelle ventrale restent stables au cours du développement (Fig. 37A, co-localisations en jaune). Enfin, la mise en place des populations GABAergique

et glycinergique s'effectue également suivant un axe rostro-caudal. Ainsi, dans la corne ventrale, deux pics de densité de cellules GABA-ir et gly-ir sont détectés : le premier est observé au niveau brachial au stade E13,5 ; le second, au niveau lombaire est retardé dans le temps (au stade E15,5 pour la population GABA-ir, au stade E16,5 pour les cellules Gly-ir) (Fig. 37B).

### **1) Etude phylogénétique des systèmes GABA- et glycinergiques**

#### **a) Mise en place du système GABAergique au cours de l'ontogenèse**

L'étude de la mise en place du système GABAergique chez différentes espèces de poissons a permis de mettre en évidence que le GABA est le premier neurotransmetteur présent dans le système nerveux central (Ekstrom and Ohlin, 1995). En effet, les premières cellules GABAergiques sont détectées, par immunohistochimie grâce à un anticorps anti-GABA, très précocement dans la moelle épinière chez les téléostéens (51 heures après fertilisation, l'éclosion ayant lieu 144 à 168 heures après la fertilisation, Ekstrom and Ohlin, 1995) et chez la lamproie au stade pré-larvaire (Ruiz et al., 2004). L'enzyme de synthèse du GABA, la GAD (glutamate acide décarboxylase, présente sous deux isoformes, GAD65 et GAD67) est également détectée très tôt au cours du développement dans la moelle épinière rostrale de la roussette grâce à un anticorps dirigé contre la GAD (Sueiro et al., 2004) et chez le poisson zèbre par hybridation in situ (30 à 32 heures après la fertilisation, Higashijima et al., 2004). De plus, ces études chez les poissons montrent que le développement de la population GABAergique spinale s'effectue selon un axe rostro-caudal, les cellules GABA-ir envahissant progressivement les niveaux les plus caudaux (Ekstrom and Ohlin, 1995; Sueiro et al., 2004), et que l'expression du GABA et de la GAD est transitoire au cours de l'ontogenèse (Higashijima et al., 2004).

L'immunoréactivité GAD/GABA a également été analysée chez les batraciens, une différenciation précoce et transitoire du système GABAergique a été reportée chez le Xénope (Barale et al., 1996). Les cellules GABAergiques émergent le long de la moelle épinière juste après la fermeture du tube neural et forment deux colonnes de part et d'autre de la ligne médiane. Ces colonnes dont la densité augmente au cours du développement sont homogènes (Binor and Heathcote, 2001).

Une étude immunohistochimique s'est attachée au développement de l'immunoréactivité GABA dans la moelle épinière lombo-sacrée de l'embryon de poulet (Antal et al., 1994). Les premières cellules GABA-ir sont détectées précocement au stade E4 (la durée de la gestation étant de 20 jours chez le poulet) en position ventrale. Puis, la densité de cellules marquées augmente jusqu'au stade E8. A ce stade de développement, les cellules GABA-ir ont envahi la corne dorsale. Enfin, le nombre de cellules marquées décline dans la corne ventrale aux stades plus tardifs de développement. Chez le poulet, l'existence d'une migration ventro-dorsale des cellules GABA-ir au cours du développement est ainsi évoquée. Une analyse quantitative du nombre de cellules marquées dans la substance grise ventrale et dorsale a été également effectuée à deux niveaux lombo-sacrés différents. Cette analyse montre l'existence d'un délai rostro-caudal dans la mise en place de la population GABAergique ventrale : les niveaux plus rostraux étant immunoréactifs pour le GABA avant les niveaux caudaux. En revanche, dans la corne dorsale, le développement de la population de cellules GABAergiques apparaît synchrone.

Chez le rat, les premières évidences de marquages GABA ont été détectées très précocement : les premières fibres et cellules GABA-ir ont été observées respectivement aux stades E12,5 et E13,5 dans la moelle épinière brachiale par immunohistochimique (Ma et al., 1992), de plus, le GABA a été détecté dès le stade E13 par analyse biochimique d'homogénat de moelle (Schaffner et al., 1993). Les deux formes de la GAD sont également exprimées

précocement au niveau des corps cellulaires en position ventro-médiane dans la moelle épinière (Tran et al., 2003), la GAD65 étant exprimée au stade E12, un jour plus tôt que le GABA et la GAD67 (Phelps et al., 1999). Puis, au cours du développement embryonnaire, la mise en place de la population spinale GABAergique chez le rat se fait suivant un gradient ventro-dorsal : la densité de cellules GABA-ir augmente dans les régions ventrales puis diminue alors que le marquage s'étend dans la moelle dorsale aux stades plus tardifs de développement (Ma et al., 1992). Comme chez le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004) et le poulet (Antal et al., 1994), le GABA est exprimé de façon transitoire dans la moelle épinière ventrale. De plus, un gradient rostro-caudal de mise en place de la population GABAergique a été mis en évidence : il existe un délai de un jour dans l'apparition de l'immunoréactivité GABA entre les régions cervicale et lombo-sacrée de la moelle épinière (Ma et al., 1992). Enfin, une inversion des gradients rostro-caudal et ventro-dorsal a été observée au stade P0 (Schaffner et al., 1993).

Ainsi, quelque soit la classe animale, un pic d'expression de la population GABAergique spinale est observé au cours du développement. L'expression transitoire du GABA a également été mise en évidence dans différentes structures du cerveau parmi lesquelles l'hypothalamus chez le Xénope (Barale et al., 1996), le cortex chez la souris (Del Rio et al., 1992), les axones du corps calleux chez le rat (Cobas et al., 1988). Quels peuvent alors être les mécanismes expliquant cette expression transitoire ?

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer la progression ventro-dorsale du marquage GABA et plus particulièrement la « disparition » des cellules GABA de la moelle ventrale au profit de la corne dorsale observée chez le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004), le poulet (Antal et al., 1994; Berki et al., 1995), le rat (Ma et al., 1992; Tran et al., 2003) et la souris (présentes données). Cette expression « transitoire » du GABA pourrait être

liée 1) à un changement de phénotype des neurones GABA, 2) à une redistribution des neurones suivant un axe ventro-dorsal, 3) à une translocation des protéines GAD du corps cellulaire vers les terminaisons synaptiques et enfin 4) à un phénomène de mort cellulaire programmée.

En ce qui concerne la première hypothèse, une expression transitoire de la GAD, le GABA étant synthétisé à partir du glutamate grâce à la GAD, peut entraîner un changement de phénotypique du neurone GABAergique à glutamatergique. Ce changement phénotypique a été observé dans le gyrus dentelé où les cellules granuleuses « glutamatergiques » peuvent exprimer le phénotype GABA transitoirement, ceci selon des mécanismes activité dépendants (Gutierrez et al., 2003). Comme la somme des cellules GABA et glycinergiques reste constante au cours du développement chez le poulet (Berki et al., 1995), il a été également proposé que les neurones ne pouvant plus synthétiser le GABA, pourraient acquérir une nouvelle machinerie enzymatique leur permettant de produire la glycine. L'existence d'une plasticité phénotypique a également été démontrée pour d'autres neurotransmetteurs, par exemple, les neurones sympathiques passent d'un phénotype noradrénergique à cholinergique (Landis, 1990). Au cours du développement, les neurones GABAergiques pourraient également être redistribués le long de l'axe ventro-dorsal (hypothèse 2). En effet, il a été en particulier montré que les interneurons GABAergiques corticaux, qui ne sont pas générés dans le cortex mais dans le primordium pallidal (futur pallidum), migrent tangentiellement jusqu'à leur destination corticale finale au cours du développement (Kriegstein, 2005). De telles migrations dans la moelle épinière pourraient alors expliquer la « disparition » des cellules GABA-ir dans la corne ventrale. Cependant, d'autres études privilégient plutôt l'hypothèse 3 selon laquelle les deux formes de GAD embryonnaires (GAD65 et GAD67) seraient redistribuées au cours du développement et transloquées du corps cellulaire vers les terminaisons (Tran et al., 2003). En effet, des études immunohistochimiques sur la

localisation de la GAD sur des préparations adultes pré-traitées par la colchicine (inhibe le transport axonal le long des microtubules, ce qui induit une accumulation des neurotransmetteurs, des enzymes... dans le corps cellulaire du neurone) (Barber et al., 1982) ainsi que des études *in situ* chez le rat post-natal et l'adulte (Ma et al., 1994) ont montré que les neurones marqués par la GAD ne disparaissaient pas chez l'adulte. De plus, le blocage du transport axonal permet de détecter les deux isoformes de la GAD dans les corps cellulaires à des stades de développement où elles n'étaient plus détectées (Phelps et al., 1999). Enfin, la population de neurones GABAergiques pourrait diminuer suite à une mort cellulaire programmée (hypothèse 4). En effet, l'apoptose a lieu dans la population d'interneurones de la substance grise spinale juste après la naissance chez le rat (Lawson et al., 1997). L'étude de la mort cellulaire programmée chez le poulet, le rat et la souris dans la population motoneuronale a permis de mettre en évidence que la mort des cellules a lieu d'abord au niveau cervical et en dernier aux niveaux sacrés. De plus, à un même niveau donné, les motoneurones en position médiane meurent avant ceux en position latérale (Yamamoto and Henderson, 1999). L'existence de gradients dans ce phénomène d'apoptose pourrait alors expliquer les gradients de mise en place des populations GABAergiques et glycinergiques.

A l'heure actuelle, sur la préparation de moelle épinière embryonnaire de souris, il est difficile de favoriser une hypothèse au profit d'une autre.

Au vue des résultats de ce chapitre, un autre problème est soulevé : quelle est l'identité cellulaire des cellules GABAergiques marquées dans la corne ventrale. En effet, chez le rat, des auteurs affirment que les premières cellules GABA-ir détectées dans la région cervicale, au stade E14, sont des motoneurones aux vues de leurs positions, leurs tailles et leurs projections dans les racines ventrales (Ma et al., 1992). En revanche, des co-localisations de glutamate et d'acétylcholine ont été visualisées dans les motoneurones précoces, chez

l'embryon de Xénope de 1 jour (Fu et al., 1998). Les résultats de cette présente étude ne sont pas en accord sur le fait que les cellules GABAergiques soient des motoneurones. En effet, les cellules GABA-ir, détectées entre les stades E11,5 et E15,5 dans la corne ventrale, sont localisées autour des colonnes motoneuronales et ne présentent pas de co-localisations avec Islet-1/2, marqueur précoce de motoneurones (voir Fig. 23). Les neurones GABA-ir marqués dans la moelle épinière embryonnaire de souris ne sont donc pas des motoneurones. Ces neurones GABA seraient plus probablement des interneurones. En effet, une population d'interneurones GABAergiques a été mise en évidence, dans la moelle épinière embryonnaire lombo-sacrée chez le poulet, dans la région située dorsolatéralement par rapport aux colonnes motoneuronales (Wenner and MJ, 1999). Ces cellules seraient l'équivalent des interneurones de Renshaw chez les mammifères, elles reçoivent des afférences cholinergiques directes en provenance des motoneurones et envoient des projections GABAergiques sur ces mêmes motoneurones et sur les autres interneurones de type Renshaw. Une autre population de neurones, de type commissuraux, exprime également transitoirement le phénotype GABA au cours du développement dans les régions ventro-médianes de la moelle épinière. En effet, chez le rat, la GAD65 est détectée dans ces neurones commissuraux dès le stade E13 (Phelps et al., 1999).

#### b) Mise en place du système glycinergique

Bien que la glycine joue un rôle crucial au cours du développement, la description complète de la maturation ontogénique de la population glycinergique n'a jamais été réalisée. En effet, une description partielle de l'ontogenèse du système glycinergique a été réalisé seulement dans la moelle épinière entière du poisson zèbre, par hybridation *in situ*, où les auteurs ont étudié l'expression du transporteur de la glycine GlyT2 (Higashijima et al., 2004) dans la moelle épinière lombo-sacrée chez l'embryon de poulet grâce à des techniques

d'immunohistochimie (Berki et al., 1995). Une population d'interneurones commissuraux glycinergiques a été également détectée au cours du développement chez l'embryon de Xénope (Roberts et al., 1988).

Dans la moelle épinière du poisson zèbre, les cellules exprimant le transporteur de la glycine GlyT2 ont été recherchées (Higashijima et al., 2004). Les premières cellules qui expriment GlyT2 sont détectées précocement dans la zone intermédiaire, 24 heures après la fertilisation, seulement dans les régions rostrales. Puis le nombre de cellules positives augmente jusqu'au stade 30-32 heures (après fertilisation), le profil d'expression s'étend aux régions caudales. 4 à 5 jours après la fertilisation, stades où la larve présente une activité locomotrice similaire à l'adulte, la majorité des cellules exprimant GlyT2 est localisée dans les parties dorsales de la moelle épinière (Higashijima et al., 2004). Ainsi, ce modèle permet de mettre en évidence l'existence d'un gradient rostro-caudal dans la mise en place de l'expression embryonnaire du transporteur de la glycine.

Chez l'embryon de Xénope (Roberts et al., 1988), les premiers interneurones commissuraux immunoréactifs pour la glycine sont détectés très tôt au cours du développement au stade 22 dans le tronc cérébral (le stade 37/38 correspondant à l'éclosion). Puis le nombre de cellules glycinergiques augmente et la population s'étend vers la moelle épinière et ses niveaux les plus caudaux, ceci jusqu'à l'éclosion.

Dans la moelle épinière embryonnaire de poulet (Berki et al., 1995), les premières cellules Gly-ir apparaissent tôt au cours du développement, au stade E8 (la durée de gestation étant de 20 jours) et présentent une densité plus importante dans la corne ventrale. Plus tard, le nombre de corps cellulaires Gly-ir augmente fortement pour atteindre un maximum au stade E20 dans la substance grise ventrale et dorsale.

La mise en place de la population glycinergique n'a pas été décrite chez le rat. En revanche, Colin (Colin et al., 1998) s'est intéressé à la localisation des différents composants

des synapses glycinergiques (récepteurs glycinergiques (GlyR) / géphyrin : protéine d'ancrage des récepteurs glycinergiques / boutons présynaptiques Gly-ir). Au niveau anatomique, très peu de données sont disponibles sur les modifications des sous-unités du récepteur glycine au cours du développement (Legendre, 2001). Le développement des sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\beta$  du GlyR a été décrit dans la moelle épinière de rat par hybridation *in situ*, entre les stades E14 et P20 (Malosio et al., 1991). Ces récepteurs apparaîtraient de façon simultanée le long de la moelle épinière, dans toute la substance grise, la sous-unité  $\alpha 2$  étant prédominante aux stades précoces de développement alors qu'au stade P20, les sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\beta$  seraient distribuées dans toute la substance grise.

Chez la souris, un niveau important de glycine est détectée par chromatographie liquide haute pression au stade E12,5 dans la moelle épinière (Miranda-Contreras et al., 2002). Ces résultats sont en accord avec la détection précoce (stade E12,5) de l'immunoréactivité glycine dans les corps cellulaires de la moelle épinière ventrale embryonnaire de souris (présentes données). La mise en place de la population glycinergique chez la souris se fait également selon un gradient rostro-caudal. Ce gradient est retrouvé chez le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004) et le xénope (Roberts et al., 1988) mais les données ne permettent pas de conclure sur l'existence d'un tel gradient chez le poulet (Berki et al., 1995). Un gradient ventro-dorsal contrôle également la mise en place de la population glycinergique chez la souris, ce gradient n'a pas été clairement mis en évidence chez le poulet (Berki et al., 1995) ni chez le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004). Enfin, chez ces trois dernières espèces, la localisation finale du marquage glycine est identique, les cellules étant localisées majoritairement dans la moelle dorsale.

2) Développement parallèle des populations spinales GABAergique et glycinergique, existence de co-localisations

Les populations spinales GABAergiques et glycinergiques se mettent en place de façon parallèle cependant, il existe des différences notables. En effet, les premières cellules GABA-ir sont détectées un jour avant les cellules glycinergiques. Ce délai dans l'apparition de ces deux populations de cellules a été également décrit chez le poulet (Berki et al., 1995) mais est plus important (quatre jours). Cette différence temporelle pourrait être expliquée grâce aux données recueillies par électrophysiologie. Il a été montré qu'aux stades les plus précoces de développement, la transmission GABAergique est plus efficace que la transmission glycinergique (Gao et al., 2001). Par contre, aux stades plus tardifs, la transmission synaptique glycinergique devient la force dominante pour la génération des rythmes les plus matures (Nakayama et al., 2002). Le passage d'une transmission GABAergique à glycinergique a aussi été observé dans le système de l'audition (Kotak et al., 1998) et dans de nombreuses régions du système nerveux central dont la moelle épinière (Branchereau et al., 2002; Ganguly et al., 2001; Stein et al., 2004). En outre, la distribution de ces deux populations de cellules est totalement différente aux stades les plus tardifs de développement, dans la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, dans la corne ventrale, les deux acides aminés sont distribués dans les mêmes couches correspondant aux futures couches VII à X. Dans la corne dorsale, la localisation des neurones GABA et glycine est distincte. Comme dans la moelle épinière embryonnaire chez le poulet, la plupart des cellules GABAergiques occupe la partie superficielle de la corne dorsale correspondant aux futures couches I et II tandis que les corps cellulaires Glycinergiques sont dans les couches plus profondes (futures couches III à V). Ainsi, l'ensemble de ces données anatomiques sous-tend le fait que le GABA et la glycine ont un rôle différent dans le traitement des informations spinales somato-sensorielles dans le système nerveux mature.

Dans la moelle épinière ventrale, les populations de cellules GABA et glycine étant détectées dans les mêmes zones, des expériences de doubles marquages ont été réalisées afin d'étudier l'existence d'éventuelles co-localisations. Environ 30% des cellules immunoréactives dans la moelle ventrale contiennent les deux neurotransmetteurs, ceci aux trois stades étudiés (E13,5, E15,5 et E17,5). De telles co-localisations, dont le nombre reste constant au cours du développement, ont également été décrites chez le poulet (Berki et al., 1995). D'un point de vue fonctionnel, la glycine accompagnée du GABA jouerait un rôle trophique sur les événements secondaires de croissance axonale et formation des synapses tandis que le GABA participe seul aux processus les plus précoces de développement. En effet, le GABA potentialise la croissance des neurites (Spoerri, 1988) et la migration des neuroblastes (Behar et al., 1994). Une étude anatomique a également montré que les récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycinergiques sont présents sur la membrane post-synaptique de certaines synapses dans la moelle épinière, en face des éléments pré-synaptiques contenant les deux neurotransmetteurs (Todd, 1996). En outre, une co-expression du GABA et de la glycine a été mentionnée dans les couches I à III de la moelle épinière adulte chez le rat (Todd and Sullivan, 1990), dans les terminaisons nerveuses des motoneurones spinaux chez le chat (Ornung et al., 1994) et une co-localisation des récepteurs GABA et glycine a été décrite dans la moelle épinière de rat (Bohlhalter et al., 1994).

**Chapitre III**

**CONTROLE DE LA MATURATION DU  
PHENOTYPE GABA PAR LES VOIES  
BULBO-SPINALES  
SEROTONINERGIQUES**

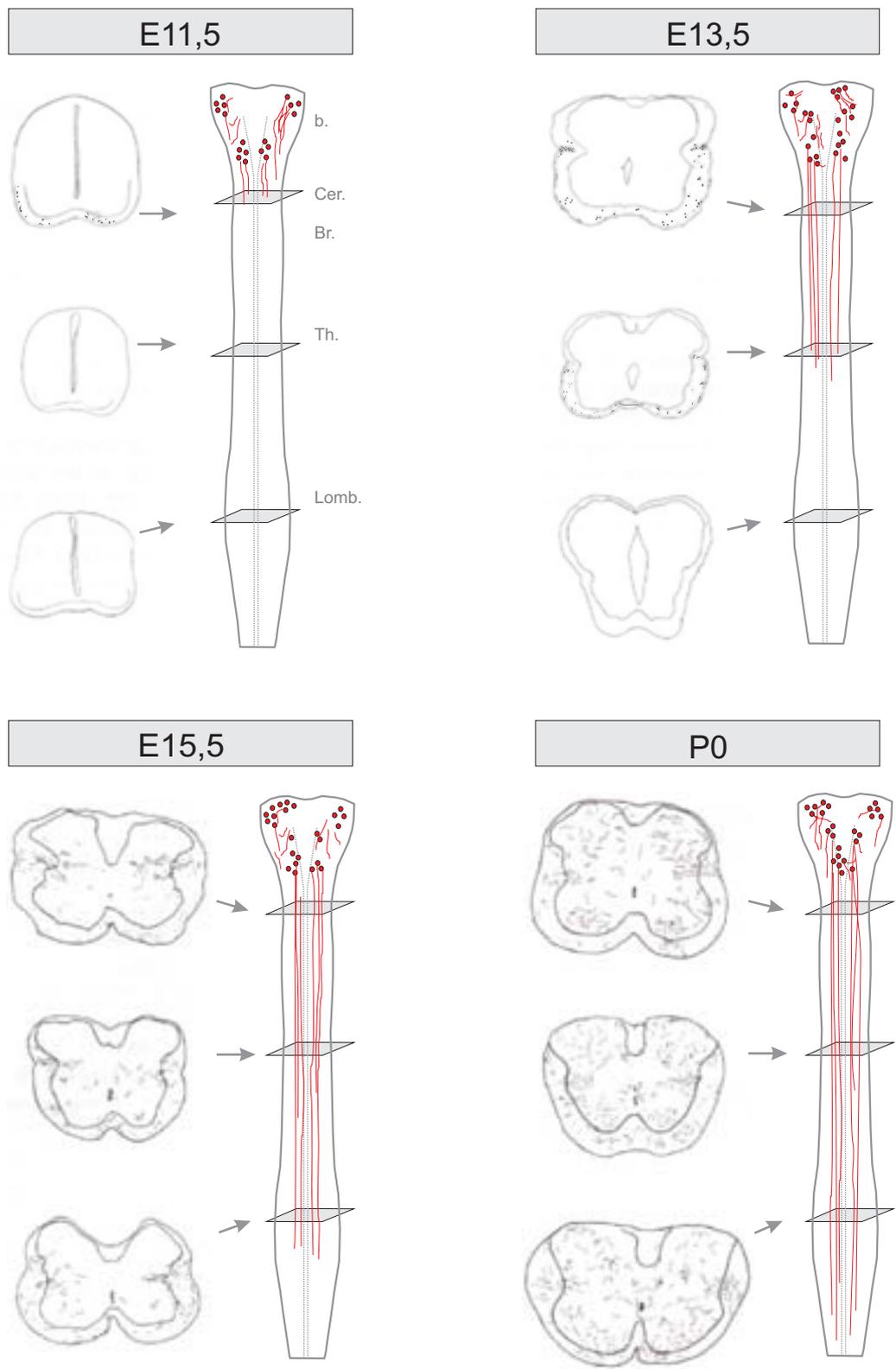
L'étude de la dynamique de mise en place de la population spinale GABAergique (voir chapitre précédent) a permis de montrer que cette population de neurones GABA se mettait en place progressivement dans la moelle épinière selon un axe rostro-caudal. Dans de nombreux systèmes, chez les vertébrés mais aussi chez les invertébrés, il a été démontré que la maturation des réseaux de neurones était contrôlée par des systèmes de voies modulatrices. Par exemple, chez les invertébrés, les informations modulatrices en provenance du système nerveux central répriment l'expression des réseaux adultes qui préexistent chez l'embryon tout en maintenant la population neuronale embryonnaire dans un état fonctionnel différent de l'adulte (Le Feuvre et al., 1999). Chez les vertébrés, les voies modulatrices supraspinales envahissent la moelle épinière progressivement au cours du développement embryonnaire. Ces voies descendantes peuvent activer et réguler les réseaux spinaux embryonnaires en particulier les futurs réseaux locomoteurs. Les projections sérotoninergiques et noradrénergiques, par exemple, ont été décrites comme neuromodulatrices de ces réseaux spinaux chez le nouveau-né (rat (Cazalets et al., 1992; Kiehn et al., 1999, pour revue voir Vinay et al., 2002), poulet (Okado et al., 1992), amphibiens (Branchereau et al., 2000b; Sillar et al., 1998)). Chez la souris, les voies descendantes qui envahissent la moelle épinière le plus précocement sont les voies sérotoninergiques bulbaires (Ballion et al., 2002). Le fait remarquable est que leur arrivée dans la moelle épinière coïncide au moment où l'augmentation transitoire d'expression de GABA est observée. De plus, au niveau physiologique, la suppression de l'innervation sérotoninergique accélère la mise en place des inhibitions intraspinales GABAergiques dans la moelle épinière embryonnaire de souris (Branchereau et al., 2002; voir chapitre I). L'implication de ces voies descendantes sérotoninergiques sur la mise en place de la population spinale GABAergique a donc été envisagée. Afin d'aborder cette question, il est nécessaire de travailler sur une préparation où l'accès aux populations spinales est aisé et où les voies descendantes supraspinales peuvent

être manipulées pour connaître les conséquences de ces manipulations sur la mise en place des populations spinales. Ce type d'expériences ne peut pas se faire sur une préparation aiguë. Il a ainsi été mis au point au laboratoire, une préparation de moelle épinière entière embryonnaire maintenue en culture organotypique (Branchereau et al., 2002, papier princeps). Ouverte selon l'axe rostro-caudal, cette préparation permet d'avoir un accès direct aux populations spinales ventrales à l'origine des futurs réseaux moteurs ; la section du bulbe rachidien permet également de supprimer toutes les voies descendantes supraspinales et l'utilisation d'agents pharmacologiques dans le milieu de culture va permettre de tester chroniquement l'effet de substances particulières. Sur cette préparation, il a été démontré que les activités spontanées se mettaient en place de façon similaire par rapport au développement *in utero*. De plus, la maturation de la transmission excitatrice glutamatergique et de la transmission inhibitrice GABA/glycine est observée en culture organotypique, le basculement d'effet excitateur à inhibiteur du GABA et de la glycine est observé après deux jours de culture.

#### **A- MISE EN PLACE DES VOIES DESCENDANTES**

##### **SEROTONINERGIQUES EN CULTURE ORGANOTYPIQUE**

Avant d'étudier le rôle des voies descendantes sérotoninergiques sur la mise en place de la population spinale GABAergique, il est nécessaire de bien connaître la mise en place de ces voies 5-HT. *In utero*, la description de la maturation des voies 5-HT supraspinales a été réalisée chez la souris (Ballion et al., 2002; voir Fig.38) : au stade E11,5, les noyaux sérotoninergiques du raphé sont détectés dans le bulbe rachidien. De plus aux niveaux cervicaux les plus rostraux, des axones 5-HT sont visualisés dans la future substance blanche (zone marginale) latérale et ventrale. Au stade E13,5, les axones marqués pour la 5-HT sont



**Figure 38 : Mise en place des voies descendantes sérotoninergiques dans la moelle épinière embryonnaire de souris**

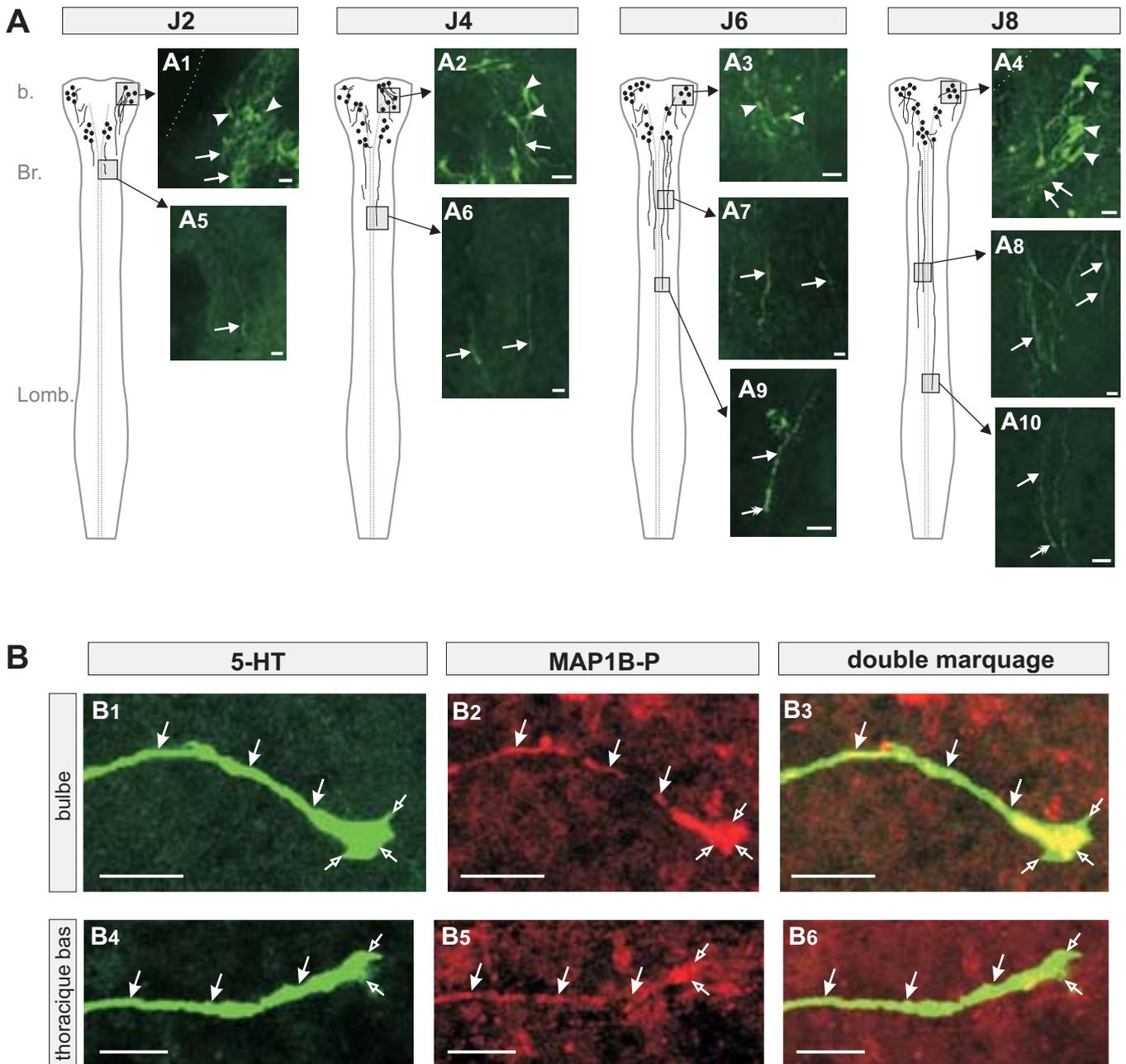
Pour chaque stade de développement, aux trois niveaux analysés (brachial, thoracique et lombaire), une représentation schématique du marquage dans la moelle épinière est représentée sur les panels de gauche à partir d'images obtenues en caméra lucida. Reconstitution du marquage sur des représentations schématiques de moelles épinières entières sur les panels de droite. Les voies 5-HT atteignent les niveaux brachiaux au stade E13,5, les niveaux lombaires au stade E15,5.

Abréviations : b : bulbe rachidien ; Br. : niveau brachial ; Cer. : niveau cervical ; Th. : Niveau thoracique ; Lomb. : niveau lombaire

détectés dans la moelle épinière brachiale, plus particulièrement dans la zone marginale ventro-latérale. L'immunoréactivité 5-HT est également détectée dans la substance blanche au niveau thoracique, les niveaux plus caudaux ne présentent pas de marquage. Au stade E15,5, les fibres sérotoninergiques atteignent le niveau lombaire. Elles sont visualisées dans les funiculi ventraux et latéraux de la substance blanche, et commencent également à envahir la substance grise mais aucun marquage n'est observé dans la corne dorsale de la moelle épinière. Au stade P0, les fibres 5-HT ont envahi les deux cornes de la moelle épinière, et sont présentes dans la substance blanche et la substance grise.

Afin de pouvoir étudier le rôle physiologique de ces voies descendantes sérotoninergiques, il est nécessaire de pouvoir les manipuler, ce qui est possible avec les cultures organotypiques. Cependant, un des pré-requis est de savoir si ces voies descendantes 5-HT se mettent en place de façon similaire *in utero* et en culture organotypique. Une étude immunohistochimique a donc été réalisée dans des moelles épinières maintenues en culture organotypique épinière avec le bulbe rachidien pour essayer de rester au plus proche des conditions de développement *in utero*. Les préparations maintenues à différents stades de développement en culture (J2 n = 4 ; J4 n = 6 ; J6 n = 3 et J8 n = 5) ont ensuite été traitées avec un anticorps anti-5-HT et analysées au microscope confocal.

- Au stade de mise en culture (E11,5), les corps cellulaires des noyaux du raphé (B1, B2, B3) ainsi que quelques projections très rostrales (niveau cervical haut) présentent une immunoréactivité 5-HT.
- Après deux jours de culture (stade J2), les fibres issues des cellules sérotoninergiques bulbaires présentent un marquage au niveau des segments cervicaux et brachiaux les plus hauts de la moelle épinière (Fig. 39A1-A5).
- Après quatre jours (stade J4), ces fibres 5-HT sont localisées dans les niveaux



**Figure 39 : Maturation des voies descendantes 5-HT en culture organotypique (A) et expression de la MAP1B-P dans les fibres sérotoninergiques (B)**

(A) Immunoréactivité 5-HT dans la moelle épinière maintenue en culture organotypique 2 à 8 jours avec le bulbe rachidien. (A1-A4) Cellules 5-HT-ir des noyaux du raphé dans le bulbe rachidien (têtes de flèches), ces cellules émettent des prolongements neuronaux au cours du développement en culture (flèches). (A5) Au stade J2 (mise en culture au stade E11,5), les voies descendantes 5-HT sont visualisées au niveau brachial (flèche). (A6-A10) Ces voies descendantes envahissent progressivement la moelle épinière pour atteindre le niveau lombaire autour des stades J6-J8 (A10) (n = 4 à chaque stade).

(B) Double marquage 5-HT (en vert)/MAP1B-P (en rouge). (B1,B3) Fibre localisée dans le bulbe rachidien, co-localisation 5-HT/MAP1B-P (en jaune) dans l'axone (flèches) et le cône de croissance (flèches ouvertes). (B4-B6) Fibre localisée dans la moelle épinière lombaire. L'axone (flèches) et le cône de croissance à l'extrémité de la fibre (flèches ouvertes) présentent une co-localisation 5-HT/MAP1B-P (en jaune). Les images présentées en B correspondent à une coupe confocale de 0,2µm, toutes les autres images sont des projections (voir Matériel et Méthodes). Barre de calibration : 20µm en A, 10µm en B.

Abréviations : b : bulbe rachidien ; Br : niveau brachial ; Lomb. : niveau lombaire.

thoraciques les plus hauts (Fig. 39A6). Ces observations nous donnent une image statique du phénomène. Afin de voir s'il existe une dynamique de croissance de ces fibres, un double marquage 5-HT / microtubule-associated protein 1B-phosphorylée (MAP1B-P) a également été réalisé à ce stade de développement en culture organotypique (n=6, Fig. 39B). La MAP1B est une protéine présente dans les neurones dont les axones sont en cours d'extension. Elle favorise la croissance axonale, cette fonction pouvant être modulée par phosphorylation. La MAP1B est présente de façon non homogène le long des axones en croissance, en concentration supérieure dans la partie la plus distale des axones (cônes de croissance) (Black et al., 1994). La phosphorylation favorise l'accrochage de la MAP1B aux microtubules, l'isoforme phosphorylée de la MAP1B est ainsi majoritairement détectée dans la partie la plus distale des axones. Les observations confocales des doubles marquages 5-HT/MAP1B-P permettent de visualiser les fibres 5-HT-ir toujours associées au marquage MAP1B-P, aussi bien dans le bulbe (Fig. 39B1-B3) que dans la moelle épinière thoracique (au niveau thoracique à J4) (Fig. 39B4-B6). De plus, des cônes de croissance doublement marqués ont pu être observés aux extrémités de ces fibres. Ceci indique que les fibres 5-HT marquées sont des fibres en cours de croissance, la maturation des voies descendantes se fait donc bien progressivement le long de l'axe rostro-caudal.

- Puis ces fibres 5-HT en croissance sont détectées dans toute la moelle thoracolumbaire au stade J6/J8, des cônes de croissance sont visibles à l'extrémité des fibres (Fig. 39A7, A9, Fig. 39A8, A10).

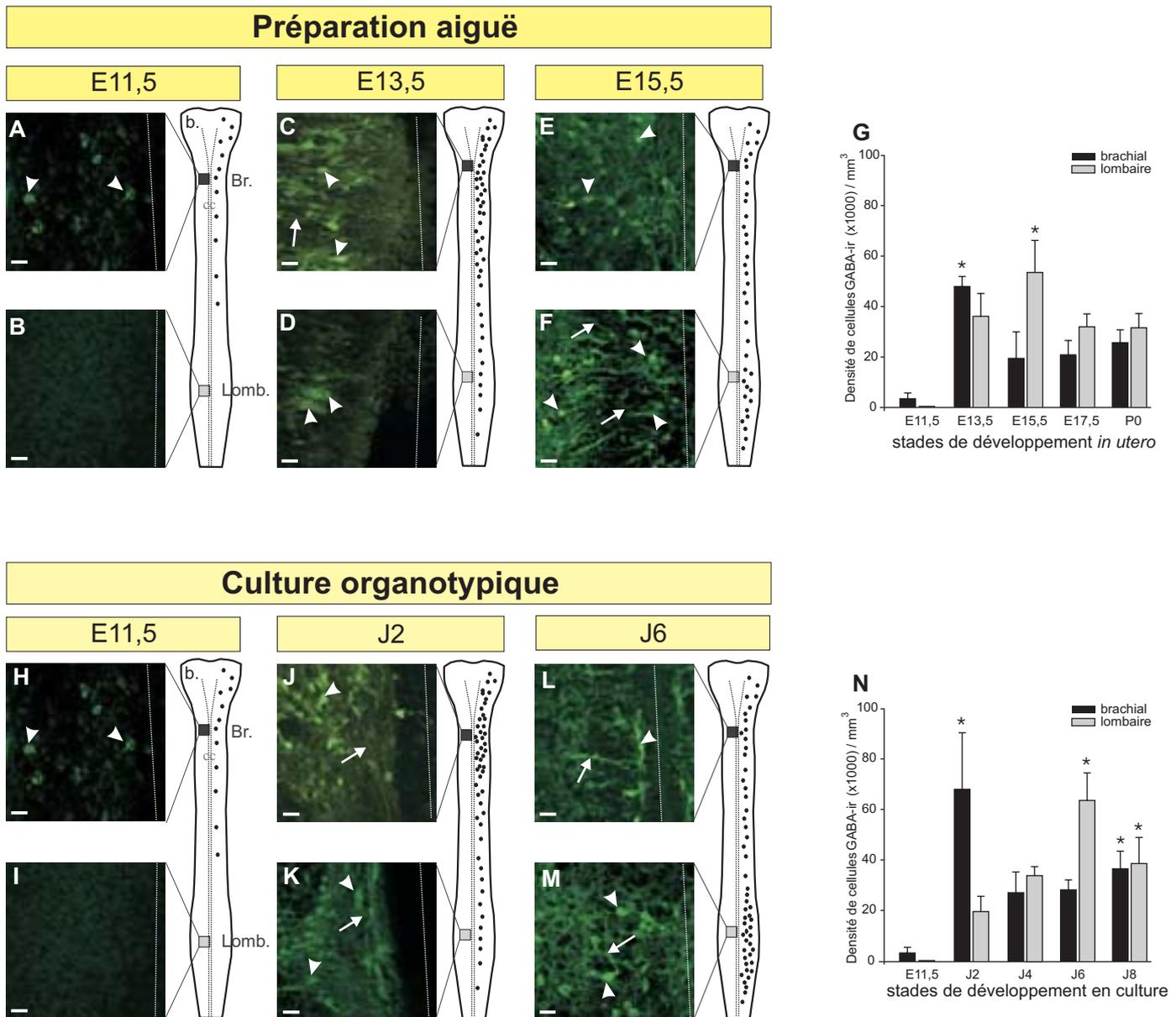
L'ensemble de ces données indique donc que les voies descendantes sérotoninergiques se mettent en place de façon comparable, selon un axe rostro-caudal, en culture organotypique et *in utero*. Cependant en culture organotypique, la mise en place de ces voies semble plus lente. En effet, les voies 5-HT sont présentes au niveau brachial au stade E13,5 *in utero* et au stade

J2/J4 en culture organotypique. Au niveau lombaire, les voies descendantes arrivent au stade E15,5 *in utero* mais après 6/8 jours en culture organotypique.

### **B- LA MISE EN PLACE DE LA POPULATION GABAERGIQUE EST SIMILAIRE *IN UTERO* ET EN CULTURE ORGANOTIPIQUE**

L'évolution de la population GABAergique a été analysée d'abord sur des préparations de moelles épinières entières dont le développement s'est effectué *in utero* pour pouvoir ensuite comparer à la maturation observée en culture organotypique. Par rapport aux coupes transversales utilisées dans le chapitre précédant, la préparation de moelle épinière embryonnaire maintenue en culture organotypique permet d'avoir une vue globale directe sur les populations de cellules de la moelle ventrale puisque les moelles épinières sont tout simplement étalées et ouvertes le long du sillon dorsal ce qui permet l'accès direct à la face ventrale (voir § Matériels et Méthodes). Etudes immunohistochimiques et analyses quantitatives ont ainsi été réalisées sur des préparations de moelles épinières entières prélevées aux stades de développement E11,5, E13,5, E15,5, E17,5 et P0 et sur des préparations maintenues en culture organotypique avec le bulbe rachidien pendant 2, 4, 6 et 8 jours à partir du stade E11,5 (n = 6 à chaque stade de développement *in utero* et en culture). L'évolution de l'immunoréactivité GABA a été analysée dans la substance grise ventrale aux niveaux brachial et lombaire.

*In utero*, au niveau brachial, les premières cellules GABAergiques apparaissent au stade E11,5 (têtes de flèches, Fig. 40A). Puis le nombre de corps cellulaires GABA-ir augmente fortement au stade E13,5 (Fig. 40C, têtes de flèches), des prolongements sont également marqués à ce stade de développement (Fig. 40C, flèche). Plus tard au cours de l'ontogenèse,



**Figure 40 : Comparaison de la mise en place de la population spinale GABAergique *in utero* (A-G) et en culture organotypique (H-L)**

(A, B) Au stade E11,5, quelques cellules GABA-ir sont détectées au niveau brachial (A) mais aucun marquage n'est observé au niveau lombaire (B). (C, D) Au stade E13,5, de nombreuses cellules sont détectées dans la moelle brachiale, quelques cellules sont révélées GABA-ir dans la moelle lombaire. (E, F) Au stade E15,5, on observe un profil inverse avec un faible nombre de cellules au niveau brachial (E) et une grande quantité au niveau lombaire (F). (G) L'analyse quantitative met en évidence deux pics de densité (astérisques), l'un au stade E13,5 au niveau brachial (histogramme noir), l'autre au stade E15,5 au niveau lombaire (histogramme gris) (\* $p < 0,05$ ; test de Dunn, comparaison avec E11,5). Dans des moelles épinières maintenues en culture organotypique avec le bulbe rachidien à partir du stade E11,5 (H, I), au stade J2, de nombreuses cellules GABA-ir sont présentes au niveau brachial (J) tandis qu'un nombre plus faible de cellules GABA-ir est détecté au niveau lombaire (K). (L, M) Après 6 jours de culture, le nombre de cellules marquées diminue au niveau brachial et augmente dans la moelle lombaire. (N) La quantification des cellules GABA-ir révèle un pic de densité au stade J2 au niveau brachial et un pic à J6 au niveau lombaire (astérisques, \* $p < 0,05$ ; test de Dunn, comparaison avec E11,5).  $n = 6$  pour chaque stade de développement.

Abréviations : b : bulbe rachidien ; Br. : niveau brachial ; Lomb. : niveau lombaire ; cc : canal central. Barre de calibration : 20 $\mu$ m.

au stade E15,5, le nombre de corps cellulaires marqués diminue (Fig. 40E). Ces observations ont été confirmées par une analyse quantitative (Fig. 40G, barres noires) : la densité de cellules marquées est très basse au stade E11,5 ( $3,4 \pm 2,2 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), elle atteint un maximum au stade E13,5 ( $47,9 \pm 3,9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (\*p<0,05, test de Dunn, comparaison avec E11,5), puis diminue au stade E15,5 ( $19,4 \pm 10,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) et reste basse jusqu'au stade P0.

Au niveau lombaire, nous n'avons jamais détecté de marquage GABA au stade E11,5 (Fig. 40B), les premières cellules GABA-ir ayant été observées au stade E13,5 (Fig. 40D, tête de flèche). Au stade E15,5, le nombre de corps cellulaires marqués augmente et de nombreux prolongements sont immunoréactifs (Fig. 40F, flèches). La quantification de ces cellules marquées aux différents stades de développement permet de vérifier 1) l'absence de marquage au stade E11,5, 2) l'augmentation de la densité de cellules marquées au stade E13,5 ( $36,1 \pm 9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) avec un maximum atteint au stade E15,5 ( $53,4 \pm 12,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (\*p<0,05, test de Dunn, comparaison avec E11,5) et 3) une diminution aux stades plus tardifs de développement (E16,5-P0) (Fig. 40G).

Ces données montrent que, pendant le développement embryonnaire *in utero*, deux pics de densité de cellules GABAergiques sont observés dans la substance grise ventrale : l'un au niveau brachial, l'autre au niveau lombaire. En outre, il existe un délai rostro-caudal dans l'expression de ces pics, le premier étant détecté au niveau brachial puis après un délai de 2 jours au niveau lombaire.

**En culture organotypique**, au niveau brachial, le nombre de cellules GABA-ir est très important après deux jours de culture (Fig. 40J, tête de flèche) alors qu'au stade de mise en culture (Fig. 40H), seules de rares cellules présentaient un marquage GABA. De nombreux prolongements GABA-ir sont également détectés au stade J2 (Fig. 40J, flèche). Par contre au

stade J6, le nombre de cellules marquées diminue fortement (Fig. 36L). L'analyse quantitative confirme ces résultats et indique qu'un pic de densité de cellules GABA-ir est atteint au stade J2 ( $68,3 \pm 22,3 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ ; \* $p < 0,05$ , test de Dunn, comparaison avec E11,5), puis la densité de cellules marquées diminue au stade J4 ( $27,5 \pm 8,1 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ ) et reste basse entre 6 et 8 jours de culture (Fig. 40N, barres noires).

Au niveau lombaire, aucune immunoréactivité GABA n'est détectée au stade de mise en culture (Fig. 40I). Les premières cellules GABA-ir sont observées au stade J2 (Fig. 40K), en faible densité par rapport au niveau brachial. Au stade J6, de nombreuses cellules GABA-ir sont visibles dans la substance grise ventrale (Fig. 40M). L'analyse quantitative confirme la différence de densité observée entre le niveau brachial ( $68,3 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ , Fig. 40N, barres noires) et le niveau lombaire ( $19,8 \pm 6 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ , Fig. 40N, barres grises) au stade J2. Un maximum de densité de cellules GABA-ir est également atteint au stade J6 ( $63,8 \pm 10,9 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ ; \* $p < 0,05$ , test de Dunn, comparaison avec E11,5) puis le nombre de cellules marquées diminue au stade J8 ( $38,8 \pm 10,3 \text{ } 10^3 \text{ cellules/mm}^3$ ).

Ces dernières données mettent donc en évidence l'existence d'un pic de densité de cellules GABA-ir au niveau brachial au stade J2, et d'un pic décalé dans le temps au niveau lombaire, au stade J6. Il existe donc un délai rostro-caudal de 4 jours dans la mise en place de la population GABAergique spinale en culture organotypique. La mise en place de la population GABAergique est donc comparable *in utero* et en culture organotypique. Cependant, il est important de noter qu'en culture organotypique, la maturation de la population de cellules GABAergiques, comme la mise en place des voies descendantes sérotoninergiques observée précédemment (voir chapitre II, §A), est plus lente.

### **C- ROLE DE LA SÉROTONINE SUR LA MISE EN PLACE DE LA POPULATION GABAERGIQUE SPINALE**

Les deux paragraphes précédents ont permis de montrer que la maturation de la population de cellules GABAergiques spinales et celle des voies descendantes sérotoninergiques sont comparables en culture organotypique et *in utero*. De plus, en culture organotypique, les voies descendantes sérotoninergiques atteignent le niveau brachial après 2 jours de culture et le niveau lombaire après 6 à 8 jours. Enfin, l'arrivée des voies descendantes 5-HT dans la moelle épinière est concomitante aux pics de densité de cellules GABA-ir (au stade J2 au niveau brachial, J6 au niveau lombaire). Ainsi, dans le but de comprendre le rôle potentiel des voies 5-HT sur la mise en place de la population GABAergique, nous avons manipulé l'expression de la sérotonine dans les cultures organotypiques. Ceci a été effectué de trois façons différentes :

1) en supprimant toutes sources de 5-HT dans la moelle épinière par section du bulbe rachidien et ajout de pCPA (10 $\mu$ M, voir Matériels et Méthodes) dans le milieu de culture. L'utilisation de pCPA, en plus de la section du bulbe rachidien, est indispensable pour supprimer toutes les sources de 5-HT dans la moelle épinière. En effet, lorsque l'on sectionne le bulbe rachidien pour supprimer les voies descendantes, au bout de 2 à 3 jours de culture, des corps cellulaires immunoréactifs pour la 5-HT sont visualisés tout le long de la moelle épinière. Ces cellules présentent de nombreux prolongements neuritiques après 6 jours de culture (Branchereau et al., 2002).

2) en permettant l'expression de la sérotonine dans des cellules intraspinales après ablation du bulbe rachidien.

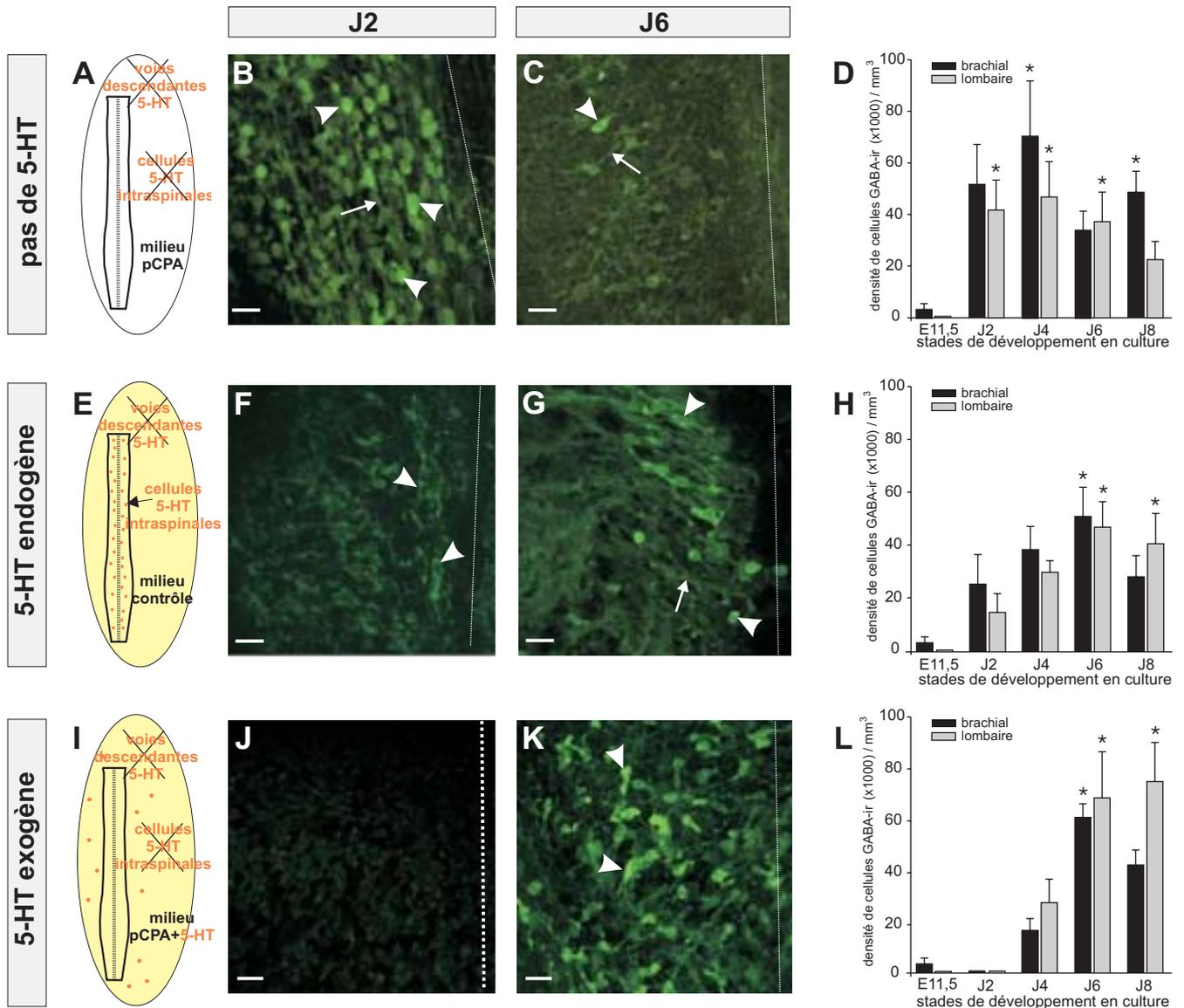
3) en ajoutant de la 5-HT (5 $\mu$ M) de façon exogène sur un système dépourvu de sérotonine (sans bulbe rachidien et ajout de pCPA dans le milieu de culture).

Une étude immunohistochimique de la population GABAergique spinale ventrale, puis une analyse quantitative de ses variations ontogéniques ont été réalisées aux niveaux brachial et lombaire dans les trois conditions de culture évoquées ci-dessus, sur des moelles épinières maintenues 2, 4, 6 et 8 jours en culture organotypique (n = 6 à chaque stade de développement en culture).

**1) Le délai rostro-caudal dans l'expression de la population GABAergique est dépendant de la 5-HT**

Dans une première condition expérimentale (Fig. 41A), les projections 5-HT des noyaux du raphé sont supprimées suite à une ablation complète du bulbe rachidien, de plus, la synthèse de 5-HT dans les cellules intraspinales est bloquée par la pCPA (10 $\mu$ M). Ainsi, toutes les sources de 5-HT sont supprimées dans ces préparations.

L'analyse immunohistochimique de la population GABAergique permet alors de visualiser un nombre très important de cellules et de prolongements GABAergiques au niveau brachial au stade J2 (Fig. 41B). Après 6 jours de culture, le nombre de cellules GABA-ir diminue (Fig. 41C). Un même pattern d'immunoréactivité GABA a été détecté au niveau lombaire, en effet la population de cellules GABAergiques est répartie de façon uniforme dans la substance grise de la moelle épinière selon un axe longitudinal (données non illustrées). L'analyse quantitative des cellules GABA-ir (Fig. 41D) met en évidence l'existence d'un pic de densité de cellules GABA-ir au niveau brachial au stade J4 ( $70,6 \pm 21,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>; \*p<0,05, test de Dunn, comparaison avec E11,5). Puis la densité de cellules marquées diminue aux stades ultérieurs de développement à ce même niveau (au stade J8,  $48,9 \pm 8,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>). Au niveau lombaire, un pic de densité de cellules GABA-ir est détecté entre les stades J2 et J4 ( $47 \pm 13,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>; \*p<0,05, test de



**Figure 41 : Ralentissement de la mise en place de la population spinale GABAergique en présence de sérotonine**

(A-D) Suppression de toutes sources de 5-HT dans la moelle épinière par section du bulbe rachidien et ajout de pCPA (B, C) Au niveau brachial, nombre très important de cellules GABA-ir au stade J2, faible quantité au stade J6. (D) L'analyse quantitative révèle une expression synchrone de l'immunoréactivité GABA entre les niveaux brachial et lombaire ainsi qu'un pic de densité au stade J2 (astérisque). (E-H) Présence de 5-HT endogène dans des cellules intraspinales ectopiques (Branchereau et col., 2002). (F, G) Au niveau brachial, faible nombre de cellules GABA-ir au stade J2, nombre plus élevé au stade J6. (H) Le pic de densité est atteint au stade J6 aux deux niveaux observés. (I-L) Présence de 5-HT exogène. (J, K) Au niveau brachial, aucun marquage n'est observé au stade J2 tandis que de nombreuses cellules sont marquées au stade J6. (L) Le développement de la population GABAergique est synchrone aux niveaux brachial et lombaire : pic unique de densité au stade J6. (\* $p < 0,05$  test de Dunn, comparaison avec E11,5). Flèches : neurites GABA-ir ; têtes de flèches : corps cellulaires GABAergiques. Les lignes pointillées délimitent la ligne médiane au niveau du canal central.  $n = 6$  pour chaque stade. Barre de calibration :  $20\mu\text{m}$

Dunn, comparaison avec E11,5), puis la densité de cellules marquées diminue aux stades J6 et J8 ( $22,8 \pm 7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> au stade J8).

En outre, lorsque l'on compare avec le développement de la population GABAergique sur des moelles épinières maintenues en culture organotypique avec le bulbe rachidien (Fig. 40N), au niveau lombaire, la densité maximale de cellules GABAergiques est détectée plus tôt en absence de 5-HT (pic au stade J2-J4, Fig. 41D, histogramme gris) que lorsque les voies descendantes sérotoninergiques sont conservées (pic au stade J6, Fig. 40N, histogramme gris). En revanche, au niveau brachial, cette différence est moins prononcée : le pic de cellules GABA-ir est observé au stade J4 en absence de 5-HT (Fig. 41L, histogramme noir), au stade J2 en présence des voies descendantes 5-HT (Fig. 40N, histogramme noir).

Ainsi, en absence de sérotonine, le développement de la population GABAergique est synchrone le long de la moelle épinière : il n'existe plus de délai entre le pic de densité de cellules GABA-ir observé au niveau brachial et le pic observé au niveau lombaire. Ces résultats indiquent donc que la sérotonine, dont l'effet est plus prononcé au niveau lombaire, est nécessaire à l'établissement d'un délai rostro-caudal dans la mise en place de la population de cellules GABAergiques dans la moelle épinière.

## 2) *La présence de 5-HT endogène retarde l'expression synchrone de la population*

### *GABAergique spinale*

Dans un second temps, afin de mieux comprendre le rôle de la 5-HT, des moelles épinières ont été cultivées sans bulbe rachidien pour empêcher le développement des fibres descendantes, dans un milieu contrôle sans pCPA afin de permettre le développement des cellules 5-HT intraspinales (Fig. 41E). Dans ces conditions expérimentales (la sérotonine est présente de façon endogène), seules quelques cellules GABA-ir sont observées aux niveaux brachial et lombaire après deux jours de culture (Fig. 41F, têtes de flèches, niveau brachial ; le

niveau lombaire n'est pas illustré). Au stade J6, le nombre de cellules GABA-ir est beaucoup plus important (Fig. 41G). L'analyse quantitative révèle que la densité de cellules GABA-ir est faible, au stade J2, au niveau brachial et au niveau lombaire ; cette densité augmente progressivement pour atteindre un maximum au stade J6 aux deux niveaux observés ( $51,3 \pm 11 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> au niveau brachial et  $47,2 \pm 9,6 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> au niveau lombaire) (Fig. 41H, \*p<0,05, test de Dunn, comparaison avec E11,5).

Ainsi, comme dans la configuration précédente, le délai rostro-caudal mis en évidence au cours de la maturation de la population GABAergique sur des préparations maintenues en culture avec le bulbe rachidien (Fig. 40N), n'est pas observé en absence des voies descendantes (Fig. 41H). Les informations supraspinales sont donc nécessaires à l'établissement d'un délai rostro-caudal dans la mise en place de la population de cellules GABAergiques dans la moelle épinière. En outre, le pic de densité de cellules GABA-ir est atteint plus tardivement en présence de 5-HT ectopique (Fig. 41H, pic au stade J6) qu'en absence de 5-HT dans la préparation (Fig. 41D, pic au stade J4). Ceci suggère que la sérotonine endogène pourrait retarder l'expression synchrone de la population GABAergique.

### **3) L'apport de 5-HT exogène provoque un retard plus important de mise en place de la population GABAergique spinale**

Sur des cultures organotypiques de moelle épinière sans bulbe rachidien et en présence de pCPA c'est-à-dire privées de toute 5-HT endogène, la sérotonine (5-HT, 5µM) a été appliquée de façon chronique. Dans cette troisième configuration, les préparations sont donc maintenues en présence de 5-HT exogène (Fig. 41I). Après deux jours de culture, la moelle épinière ne présente pas d'immunoréactivité GABA ni au niveau brachial ni au niveau lombaire (Fig. 41J, niveau brachial illustré). Cependant après 6 jours de culture, la population de cellules GABA-ir est très dense aux deux niveaux observés (Fig. 41K, niveau brachial). L'analyse quantitative

des cellules GABA-ir montre qu'en présence de sérotonine exogène, la densité de cellules immunoréactives pour le GABA est quasiment nulle au stade J2, aux deux niveaux observés ; puis le nombre de cellules marquées évolue de façon similaire aux niveaux brachial et lombaire. Un maximum de densité de cellules GABAergiques est atteint au stade J6 aux deux niveaux étudiés ( $59,8 \pm 5,29 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> au niveau brachial et  $67,3 \pm 17,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> au niveau lombaire ; Fig. 41L ; \* $p < 0,05$ , test de Dunn, comparaison avec E11,5).

Ainsi, en présence de 5-HT endogène, la mise en place de la population GABAergique est ralentie (voir stade J2, Fig. 41L ; comparer avec le stade J2, Fig.41H) et le pic d'expression du phénotype GABA est retardé (stade J6, Fig.41L) par rapport aux cultures dépourvues de sérotonine (Fig. 41D). Ces résultats indiquent donc que la 5-HT exogène retarde la mise en place de la population GABAergique spinale.

Prises dans leur ensemble, ces trois séries d'expériences montrent que la sérotonine n'est pas nécessaire à l'expression des cellules GABAergiques. Le pic de densité de cellules GABA-ir est en effet observé même en absence de 5-HT (Fig. 41D). En revanche, la sérotonine contrôle le moment d'apparition du pic d'expression de la population de cellules GABAergiques et a dans ce contexte, un rôle de frein. En outre, en absence des voies descendantes, on observe, et ceci quelque soit les conditions expérimentales, une expression synchrone du phénotype GABA le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière.

**D- ETUDE DES RECEPTEURS 5-HT IMPLIQUES DANS LA MISE EN PLACE TARDIVE DE LA POPULATION GABAERGIQUE SPINALE**

A l'heure actuelle, on distingue au moins 7 classes de récepteurs de la 5-HT (5-HT1 à 5-HT7) dans le système nerveux central (Barnes and Sharp, 1999; Gaspar et al., 2003). Au sein de la moelle épinière, les différentes familles de récepteurs sont moins représentées (revue, Schmidt and Jordan, 2000) : la famille des récepteurs 5-HT1 a été détectée majoritairement dans la corne dorsale alors que les récepteurs 5-HT2 sont localisés plutôt dans la corne ventrale. Les récepteurs 5-HT3 sont présents dans les deux cornes de la moelle épinière. Les récepteurs 5-HT5A ont récemment été mis en évidence dans les deux couches les plus superficielles de la corne dorsale chez le rat (Doly et al., 2004). Les récepteurs 5-HT7 seraient également capables d'activer les rythmes locomoteurs dans la moelle épinière mais leurs distributions et leurs fonctions ont peu été explorées. Enfin, au cours du développement, les agonistes des récepteurs 5-HT1A, 1B, 2 et 3 entraînent une dépolarisation des motoneurones de la moelle épinière.

Dans cette présente étude, l'implication des récepteurs 5-HT1A, 1B, 2A, 2C, et 3 sur la maturation de la population GABAergique spinale a été envisagée. En effet, ces récepteurs sont présents dans la corne ventrale et/ou sont impliqués dans la modulation des réseaux spinaux par la 5-HT (Verge and Calas, 2000).

Afin d'étudier quels récepteurs sont impliqués dans la régulation négative exercée par la 5-HT sur la population spinale GABAergique, l'étude suivante a été réalisée uniquement au stade de développement en culture où l'effet de la sérotonine sur la population GABAergique est le plus important. Ainsi, le stade J4 a été retenu, et seul le niveau brachial a été analysé. En effet, à ce stade et à cet endroit, en absence de bulbe rachidien et en présence de pCPA, la

densité de cellules GABA-ir est très importante ( $70,6 \pm 21,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 41D et voir Fig. 42B, barre noir « contrôle »). Par contre, l'apport exogène de 5-HT dans ces mêmes conditions expérimentales provoque une chute très forte (64,6%) du nombre de cellules ( $25 \pm 3,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 41L et voir Fig. 42B, barre gris clair « 5-HT »). Cette différence entre la densité de cellules GABA-ir en absence et présence de 5-HT mesure l'effet de la sérotonine et va être utilisée comme référence dans la suite de l'étude.

### ***1) Implication de la famille des récepteurs 5-HT1***

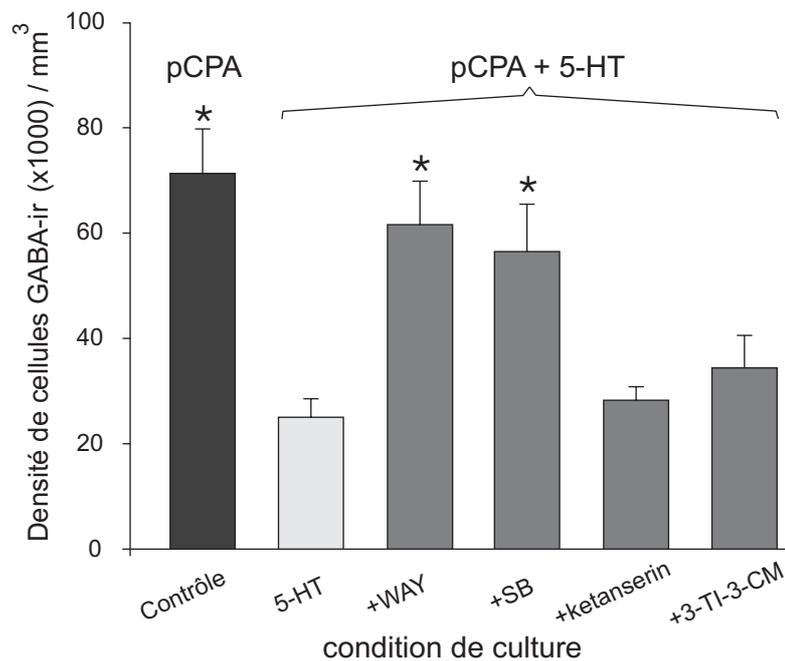
Pour identifier le type de récepteur par lequel la sérotonine exerce son action, les différents types de récepteurs 5-HT sélectionnés dans la moelle épinière (Verge and Calas, 2000) ont été bloqués sélectivement grâce à différents antagonistes (Fig. 42A). Chaque antagoniste a été appliqué de façon chronique sur des moelles épinières maintenues en culture organotypique 4 jours sans bulbe rachidien et en présence de pCPA (10µM) et de 5-HT exogène (5µM) (n = 6 pour chaque antagoniste). Puis une étude immunohistochimique quantitative de la population de cellules GABAergiques a été réalisée au niveau brachial. Ainsi, si un récepteur est impliqué mais bloqué par son antagoniste, la 5-HT n'exercera plus son rôle de frein sur la population GABAergique, et une augmentation du nombre de cellules GABA-ir devrait être observée.

En ajoutant un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT1A (WAY 100635) au milieu de culture pCPA + 5-HT, une densité très élevée de cellules GABAergiques est observée ( $61,6 \pm 8,3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, Fig. 42B, « +WAY »), cette densité est statistiquement différente de celle observée en présence de pCPA et 5-HT (comparer barre grise claire « 5-HT » et barre grise foncée « +WAY » ; \*p<0,05, test de Dunn, comparaison avec « 5-HT »). De même l'ajout d'un antagoniste des récepteurs 5-HT1B (SB 224289 hydrochloride) entraîne une augmentation du nombre de cellules marquées ( $56,5 \pm 9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) par

A

Récepteur	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1B</sub>	5-HT <sub>2A/2C</sub>	5-HT <sub>3</sub>
Antagoniste	WAY 100635	SB 224289	Kétansérin	3-TI-3-CM

B



**Figure 42 : Implication de la famille des récepteurs 5-HT<sub>1</sub> dans la régulation négative exercée par la 5-HT sur la maturation de la population de cellules GABAergiques**

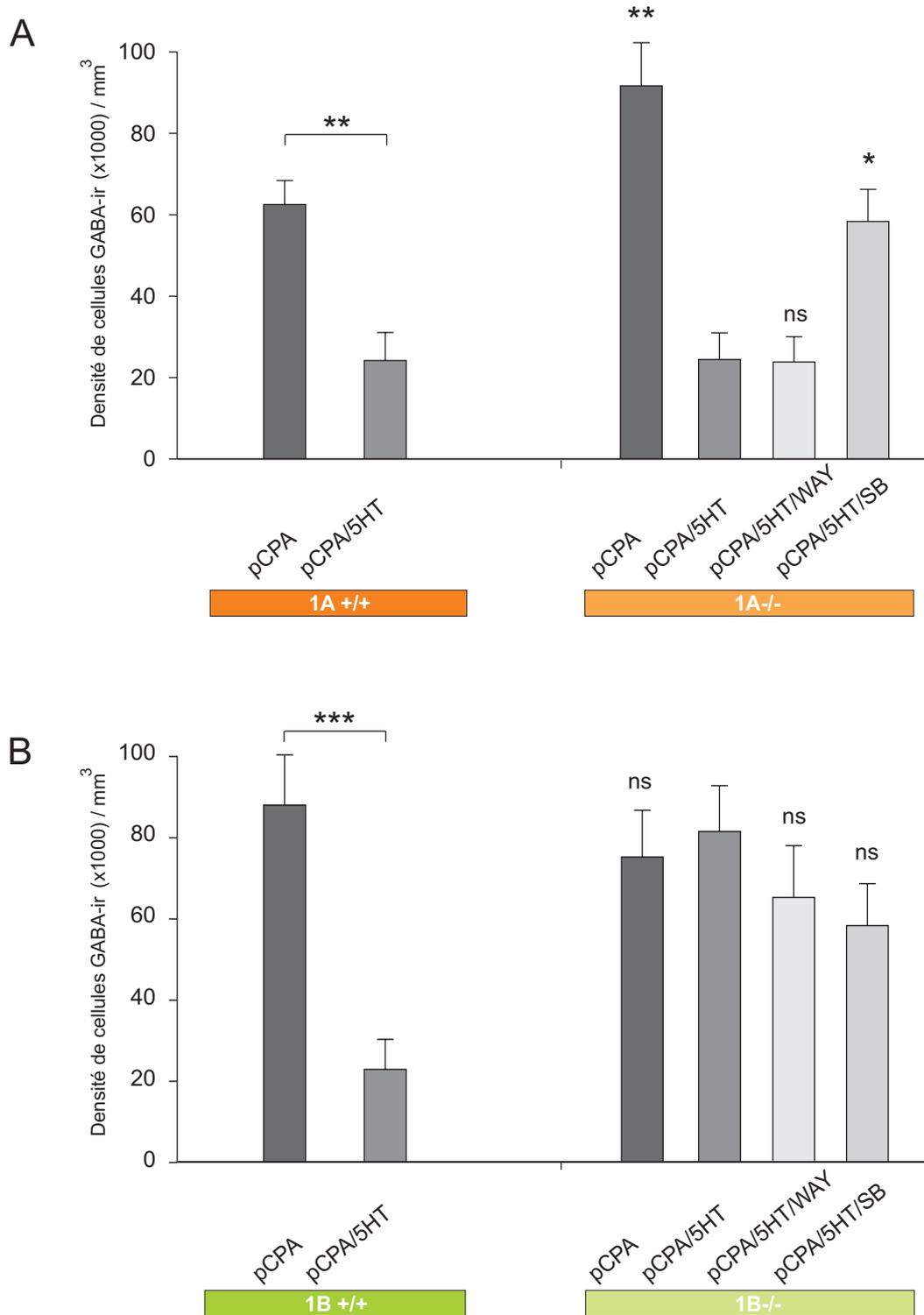
(A) Tableau récapitulatif des antagonistes utilisés pour bloquer sélectivement les différents récepteurs de la 5-HT présents dans la moelle épinière. (B) Sur des cultures organotypiques maintenues pendant 4 jours sans bulbe rachidien et en présence de pCPA, la densité de cellules GABA-ir est quantifiée au niveau brachial. En absence de 5-HT (pCPA, barre noire), la densité de cellules GABA-ir est très importante. L'ajout de sérotonine au milieu de culture induit une diminution significative de densité de cellules GABA-ir (barre gris clair « 5-HT »). En présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100635 « WAY ») ou de l'antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> (SB224289 « SB ») dans un milieu pCPA+5-HT, l'effet inhibiteur de la 5-HT n'est pas observé. En présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2A/2C</sub> (kétansérine) ou des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (3-TI-3-CM), l'effet inhibiteur de la 5-HT sur la population GABAergique est maintenu. \**p*<0,05 (test de Dunn *post hoc*, comparaison avec le pic « 5-HT » (gris clair). *n* = 6 pour chaque barre.

rapport à la densité de cellules observée en présence de pCPA et de 5-HT (Fig. 42B, comparer barre grise claire «5-HT » et barre grise foncée « +SB » ; \* $p < 0,05$ , test de Dunn, comparaison avec « 5-HT »). L'addition d'antagoniste des récepteurs 5-HT1A et 1B empêche donc la sérotonine d'exercer son effet inhibiteur. En revanche, en présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT2A/2C (ketanserin tartrate salt) ou de l'antagoniste des récepteurs 5-HT3 (3-tropanyl-indole-3-carboxylate methiodide), le pic de densité de cellules GABA-ir est très faible (respectivement  $28,2 \pm 2,6 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> et  $34,4 \pm 6,2 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) et comparable au pic obtenu en présence de pCPA et 5-HT (Fig. 42B, comparer barres grise foncée « +kétansérin », «+3-TI-3-CM » et barre grise claire « 5-HT »). Ainsi, ces deux antagonistes ne préviennent pas l'action inhibitrice de la sérotonine.

Cette série d'expériences pharmacologiques nous permet alors d'affirmer que la sérotonine exerce une régulation négative sur la population GABAergique, au cours du développement, via la famille des récepteurs 5-HT1. Les récepteurs 5-HT2 et 5-HT3 ne sont pas impliqués.

## 2) Implication des récepteurs 5-HT1B

Grâce à la pharmacologie, l'implication de la famille des récepteurs 5-HT1 dans le contrôle de la population GABAergique spinale a été démontrée. Pour tenter de différencier les rôles respectifs des récepteurs 5-HT1A et 1B, l'évolution de la population de cellules GABAergiques a été étudiée sur des cultures de moelles épinières sans bulbe rachidien de 4 jours, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (niveau brachial, milieu pCPA / milieu pCPA+5-HT) mais en utilisant des embryons de souris « knock-out » (KO) pour l'un ou l'autre de ces récepteurs (souris 1A<sup>-/-</sup> ou 1B<sup>-/-</sup>) (Fig. 43). Ces souris KO provenant d'une autre souche que celle utilisée jusqu'ici (souche OF1), une série de contrôles a été réalisée sur les souris sauvages 1A<sup>+/+</sup> et 1B<sup>+/+</sup>.



**Figure 43 : Implication des récepteurs 5-HT1B dans la mise en place de la population GABAergique**

Cultures organotypiques maintenues pendant 4 jours sans bulbe rachidien. Densité de cellules GABA-ir quantifiée au niveau brachial. (A) Chez les souris sauvages 1A+/+, le rôle répressif de la 5-HT sur la maturation de la population GABAergique est observé (\*\* $p < 0,01$ , test t). Chez les souris 1A-/-, l'apport de 5-HT exogène entraîne une diminution du nombre de cellules GABA-ir. Le blocage des récepteurs 5-HT1B, par l'antagoniste SB, empêche l'effet répressif de la 5-HT. Une analyse de variance sur rangs a été réalisée pour comparer les 4 groupes de souris 1A-/- : \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns : non significatif (par rapport au pic « pCPA/5-HT »). (B) La 5-HT induit une diminution du nombre de cellules GABA-ir chez les souris sauvage 1B+/+ (\*\*\*) $p < 0,001$ , test t). Chez les souris 1B-/-, la densité de cellules GABA-ir est très élevée en présence de 5-HT. Les antagonistes WAY et SB n'entraînent pas de modifications significatives de la densité de cellules GABA-ir (ns : non significatif, analyse de variance sur rang).

Chez les souris 1A<sup>+/+</sup>, en absence de 5-HT, on observe un niveau très élevé de cellules GABAergiques au niveau brachial ( $62,5 \pm 5,8 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, Fig. 43A, 1A<sup>+/+</sup>, « pCPA », n = 6). En revanche, l'apport exogène de sérotonine provoque une chute spectaculaire du nombre de cellules GABA-ir ( $24,1 \pm 6,9 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, Fig. 43A, 1A<sup>+/+</sup>, « pCPA+5-HT », n = 6). Ainsi, chez les souris sauvages 1A<sup>+/+</sup>, le rôle répressif de la 5-HT sur la maturation de la population GABAergique est également observé.

Chez les souris 1A<sup>-/-</sup> (absence de récepteurs 5-HT1A mais présence des autres récepteurs), on observe, en absence de 5-HT (Fig. 43A, « pCPA »), un niveau très élevé de cellules GABA-ir ( $107,6 \pm 6,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6). L'apport exogène de 5-HT (Fig. 43A, « pCPA+5-HT ») diminue en revanche cette expression ( $34 \pm 6,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6). Ainsi, la sérotonine réprime l'expression de la population GABAergique chez ces souris. En conclusion, l'effet de la sérotonine ne passerait donc pas via des récepteurs 5-HT1A. De plus, dans ces conditions expérimentales, une étude pharmacologique vient renforcer cette observation. En effet, en présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT1A (n = 6), on observe une densité de cellules GABA-ir très faible comparable au pic obtenu sans antagoniste (Fig. 44A, comparer « pCPA/5-HT » et « pCPA/5-HT/WAY»). Ce résultat permet de vérifier indirectement l'absence des récepteurs 5-HT1A sur les souris KO 1A<sup>-/-</sup> : l'antagoniste ne modifie pas le pattern d'expression de la population GABAergique puisqu'il n'y a pas de récepteurs. Par contre, le blocage des récepteurs 5-HT1B restaure la densité de cellules GABAergique à un niveau élevé ( $58,3 \pm 7,8 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6) (Fig. 43A, comparer « pCPA/5-HT » et « pCPA/5-HT/SB»). Ainsi, la sérotonine ne peut pas exercer son action inhibitrice sur la population GABAergique. Les récepteurs 5-HT1B semblent donc médier l'effet de la sérotonine. Pour vérifier cette hypothèse, une souche de souris KO pour les récepteurs 1B a été ensuite analysée.

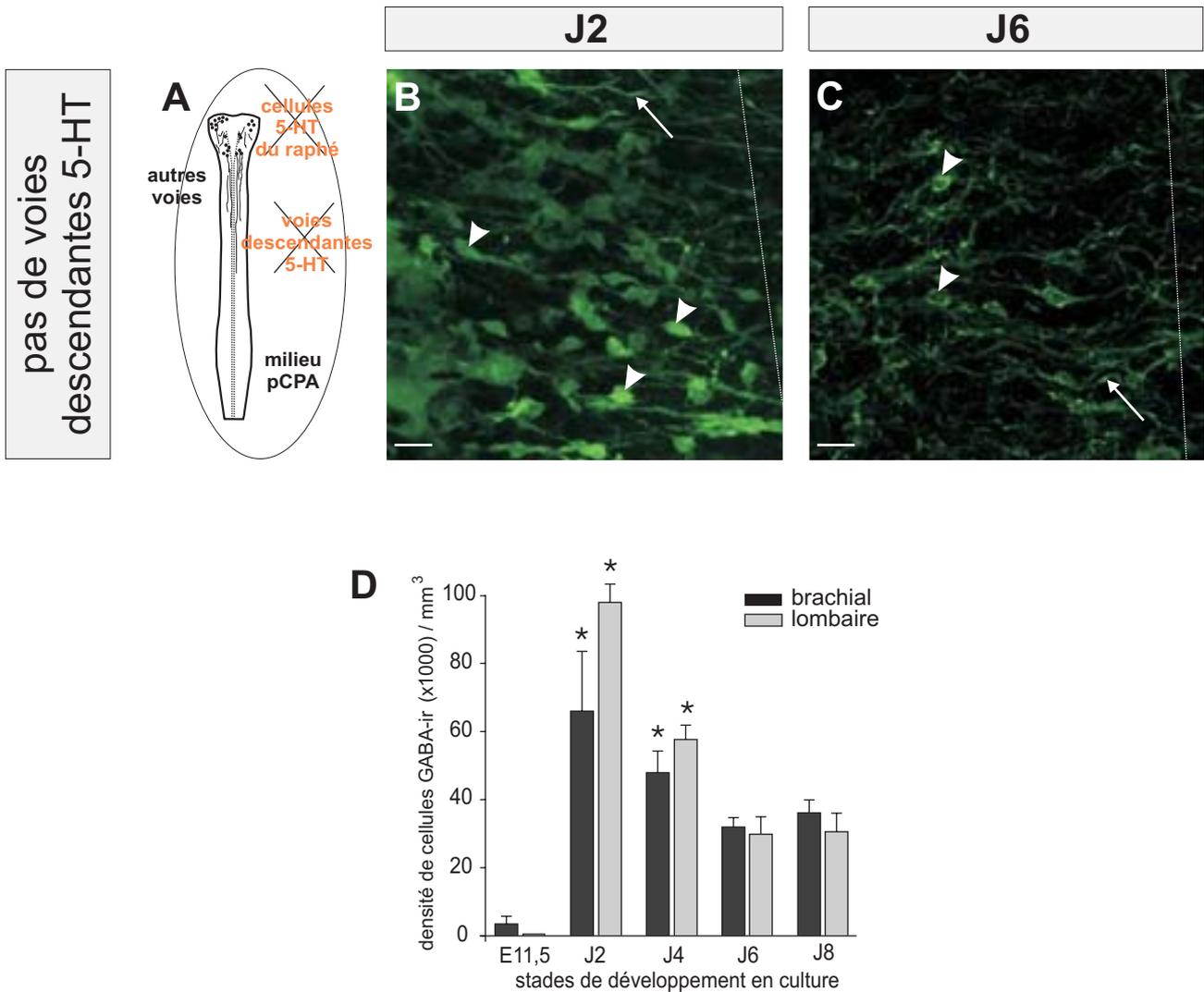
Chez les souris 1B<sup>+/+</sup>, le rôle répressif de la sérotonine sur la population de cellules GABA-ir a d'abord été vérifié (Fig. 43B, 1B<sup>+/+</sup>) : en effet, la densité de cellules GABA-ir est très élevée en absence de 5-HT ( $88,0 \pm 12,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6) alors que l'apport exogène de 5-HT entraîne une chute du nombre de cellules GABA-ir ( $22,9 \pm 7,4 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6). Ainsi, chez les souris sauvages 1B<sup>+/+</sup>, la 5-HT exerce une régulation négative sur la maturation de la population GABAergique.

Chez les souris KO pour les récepteurs 5-HT1B (souris 1B<sup>-/-</sup>), dans les moelles épinières maintenues en cultures organotypiques en absence de sérotonine, la population GABAergique s'exprime pleinement, le pic de densité est très élevé ( $75,0 \pm 11,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6). Par contre, en présence de 5-HT exogène dans le milieu, la densité de cellules GABA-ir reste très élevée ( $81,5 \pm 11,3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6) et comparable au pic obtenu en absence de 5-HT (Fig. 43B, comparer 1B<sup>-/-</sup> « pCPA » et « pCPA/5-HT »). Ainsi chez les souris 1B<sup>-/-</sup>, l'effet inhibiteur de la 5-HT n'est pas observé. Les récepteurs 5-HT1B sont donc indispensables pour que cet effet puisse avoir lieu. Comme précédemment, nous avons aussi utilisé la pharmacologie sur des cultures organotypiques maintenues en présence de sérotonine pour renforcer cette information. En présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT1A (Fig. 43B « pCPA/5-HT/WAY »), le pic de cellules GABAergiques demeure très élevé ( $65,0 \pm 12,7 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>, n = 6). Le blocage de ces récepteurs n'entraîne pas de modifications, cela confirme que les récepteurs 5-HT1A ne sont pas impliqués. Enfin, en présence de l'antagoniste des récepteurs 5-HT1B (Fig. 43B « pCPA/5-HT/SB ») (n = 6), aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin 2, ceci nous permettant finalement de vérifier indirectement l'absence de ces récepteurs sur les souris KO 1B<sup>-/-</sup>.

L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure sur l'importance primordiale des récepteurs 5-HT1B par lesquels la sérotonine exerce une régulation négative sur la population GABAergique.

**E- ROLE DES VOIES DESCENDANTES 5-HT SUR LA MATURATION  
DE LA POPULATION GABAERGIQUE**

Les résultats recueillis jusqu'ici permettent d'affirmer que la sérotonine en tant que molécule contrôle l'expression de la population GABAergique spinale en culture organotypique. En revanche, ces données ne permettent pas de conclure sur l'implication des voies descendantes 5-HT. Le but final de la présente étude étant de savoir si ces fibres sérotoninergiques jouent un rôle clé dans la régulation de la mise en place de la population GABAergique ou bien si d'autres mécanismes peuvent être aussi impliqués, une série d'expériences a été réalisée sur des moelles épinières maintenues en culture avec le bulbe rachidien et dans un milieu de culture contenant de la pCPA 10 $\mu$ M (Fig. 44A). De cette manière, seule la synthèse de 5-HT est affectée et les voies descendantes en provenance du bulbe rachidien ne sont pas éliminées. Dans cette configuration, la maturation de la population GABAergique spinale a été analysée par immunohistochimie au niveau brachial et lombaire, après 2, 4, 6 et 8 jours de culture (n = 6 à chaque stade). Au stade J2, un nombre élevé de cellules GABA-ir est observé au niveau brachial (Fig. 44B) ainsi qu'au niveau lombaire (données non illustrées). Par contre, au stade J6, les cellules marquées sont beaucoup moins nombreuses aux deux niveaux observés (niveau brachial, Fig. 44C ; niveau lombaire non illustré). L'analyse quantitative (Fig. 44D) permet en plus de détecter un pic unique de densité de cellules GABA-ir au stade J2, aux deux niveaux étudiés (au niveau brachial :  $65,9 \pm 17,5 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> et au niveau lombaire :  $98,0 \pm 5,3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>), puis la densité de cellules GABA-ir diminue entre les stades J4 et J8 aux deux niveaux observés. La maturation de la population GABAergique, dans les moelles épinières où seules les voies descendantes sérotoninergiques sont affectées, est donc comparable au pattern de



**Figure 44 : Expression plus précoce de la population spinale GABAergique en absence de 5-HT**

(A) La moelle épinière est maintenue en culture avec le bulbe rachidien dans un milieu contenant de la pCPA afin d'empêcher la synthèse de 5-HT. (B) Après deux jours de culture, de nombreuses cellules GABA-ir sont visualisées au niveau brachial. (C) Au stade J6, le nombre de cellules marquées a fortement diminué à ce même niveau. (D) La mise en place de la population de cellules GABA-ir ne présente pas de délai rostro-caudal mais un pic unique de densité au stade J2 (premiers astérisques). \* $p < 0,05$ , test de Dunn, comparaison avec E11,5. Les neurites GABA-ir sont indiqués par des flèches, les corps cellulaires par des têtes de flèches. La ligne en pointillée indique la ligne médiane au centre de la moelle épinière. Barre de calibration : 20 $\mu$ m.

développement observé sur les cultures organotypiques maintenues sans bulbe rachidien et en présence de pCPA c'est-à-dire en absence de 5-HT (comparer Fig. 44D et Fig.41D).

Ces résultats indiquent donc que : en absence de voies descendantes 5-HT (due au blocage de sa synthèse dans les noyaux du raphé), le développement de la population de cellules GABAergiques se fait de façon synchrone le long de la moelle épinière. En outre, le système de voies descendantes sérotoninergiques semble seul responsable du délai rostro-caudal existant dans la mise en place de la population GABAergique. En effet, lorsque l'on conserve les autres voies descendantes en provenance du bulbe rachidien, on ne rétablit pas cette différence temporelle. Enfin, au niveau lombaire, si on compare la maturation des cellules GABA-ir en présence (Fig. 40N) ou en absence des voies descendantes 5-HT (Fig. 44D), le pic de densité de cellules GABAergiques est détecté plus tôt lorsque ces voies sont absentes (au stade J2, Fig. 44D, histogrammes gris), et plus tard lorsqu'elles sont présentes (au stade J6, Fig. 40N, histogramme gris). Par contre, au niveau brachial, le pic de densité de cellules GABA-ir est détecté au stade J2 indépendamment de la présence des fibres descendantes 5-HT (Fig. 40N, histogrammes noirs et Fig. 44D, histogrammes noirs, respectivement).

Ainsi, la mise en place de la population de cellules GABAergiques au niveau lombaire est étroitement contrôlée par les voies descendantes sérotoninergiques. Cependant, il a été montré que la sérotonine pouvait modifier l'activité synaptique. Ainsi, la sérotonine agit selon un mode excitateur sur les réseaux spinaux embryonnaire chez la souris et entraîne une augmentation de la production de potentiels d'action dans les réseaux moteurs (Branchereau et al., 2000a). De la même façon, la sérotonine a un effet dépolarisant sur les motoneurons spinaux particulièrement entre les stades E12 et E18 chez le poulet (Muramoto et al., 1996).

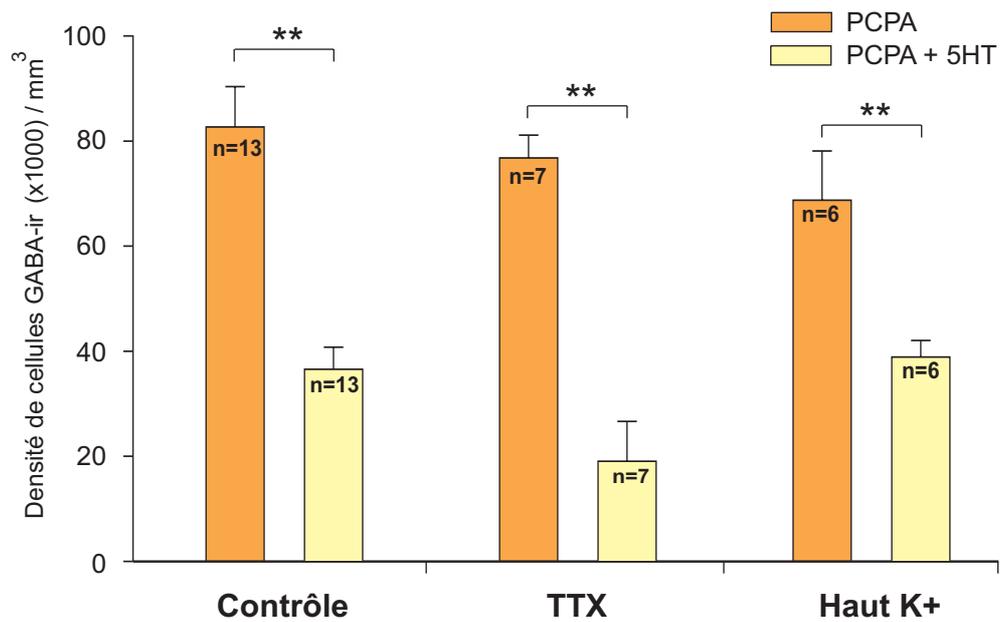
On peut alors se demander si les cellules sérotoninergiques exercent un effet direct sur la population spinale GABAergique ou bien un effet indirect via des mécanismes activité dépendants. Les conséquences 1) du blocage de la décharge des neurones et 2) de l'élévation du potentiel de membrane des cellules ont donc été évaluées sur des cultures de moelle épinière (Figure 45).

Dans un premier temps, des moelles épinières sans bulbe rachidien ont été maintenues 4 jours en culture organotypique en absence de 5-HT (milieu pCPA, n=13) et en présence de 5-HT exogène (milieu pCPA+5-HT, n=13). En absence de 5-HT, on observe un très grand pic de cellules GABA-ir ( $82,7 \pm 7,6 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) alors que l'apport de 5-HT fait chuter la densité de cellules GABA-ir ( $36,5 \pm 4,2 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig.45, « contrôle »). Cette différence mesure l'effet répressif de la sérotonine (voir paragraphe D).

Dans un second temps, la tétrodothine (TTX, 1 $\mu$ M, bloquant des canaux sodiques voltage-dépendants) a été ajoutée au milieu de culture. Dans ces conditions, en présence de TTX, la densité de cellules GABAergiques est très haute en absence de 5-HT et comparable au contrôle ( $78,8 \pm 4,34 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 45, pics oranges, comparer « contrôle », « TTX »). De plus, la présence de sérotonine exogène induit toujours une diminution spectaculaire de la densité de cellules marquées malgré la présence de TTX ( $19,1 \pm 7,6 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 45, pics jaunes, comparer « contrôle », « TTX »).

Enfin, en présence d'une forte concentration de potassium dans le milieu de culture (haut K<sup>+</sup>, 8mM, dépolarisant du potentiel de membrane des neurones), la densité de cellules GABA-ir est très élevée en absence de 5-HT ( $68,7 \pm 9,3 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) et diminue fortement en présence de 5-HT exogène ( $38,8 \pm 3,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>) (Fig. 45, comparer pic orange et pic jaune « haut K<sup>+</sup> »).

Dans chaque condition expérimentale (contrôle, TTX et haut K<sup>+</sup>), les analyses statistiques démontrent que la différence observée en absence (pic orange) et présence (pic jaune) de 5-



**Figure 45 : Contrôle non activité-dépendant de l'expression du phénotype GABA par la 5-HT**

Moelles épinières maintenues en culture organotypique sans bulbe rachidien pendant 4 jours. En absence de 5-HT, un très grand pic de cellules GABA-ir est observé alors que l'apport de 5-HT fait chuter la densité de cellules GABA-ir (contrôle). En présence de TTX (1 $\mu$ M) ou de 8mM de K<sup>+</sup>, l'effet inhibiteur de la 5-HT sur la population de cellules GABA-ir est maintenu. \*\*p<0,01, analyse de variance sur rang (Kruskal-Wallis).

HT est significative (Fig. 45,  $**p < 0,01$ , test de Kruskal-Wallis). De plus, si on compare les trois séries d'expériences, les pics obtenus en absence de 5-HT (comparer pics oranges « contrôle » / « TTX » / « Haut K+ ») ne présentent pas de différences significatives. En présence de 5-HT (comparer les pics jaunes), les différences ne sont également pas significatives.

Ainsi, lorsque l'on modifie les activités spontanées dans la moelle épinière, on n'empêche pas la 5-HT d'exercer son effet inhibiteur sur la population GABAergique. Les mécanismes mis en jeu ne semblent donc pas activités-dépendants.

## **F- DISCUSSION**

Dans ce dernier chapitre, la série d'expériences réalisée a permis d'aborder le rôle du système bulbo-spinal sérotoninergique dans le contrôle de l'émergence de la population de neurones GABAergiques spinaux. Les résultats obtenus sont :

- (1) la maturation des corps cellulaires GABA-ir est identique *in utero* et en culture organotypique, cette population émergeant suivant un gradient rostro-caudal et présentant un pic d'expression au niveau brachial suivi d'un pic lombaire ;
- (2) le moment d'apparition du pic d'expression au niveau lombaire est dépendant de la présence des voies descendantes 5-HT ;
- (3) les effets ontogénétiques de la 5-HT sur la population GABAergique sont activité-indépendants ;
- (4) la sérotonine exerce une régulation négative sur l'émergence du phénotype GABAergique via les récepteurs 5-HT1B.

1) Régulation négative de la 5-HT sur le phénotype GABA

Alors que nos travaux montrent un effet répressif de la sérotonine sur le phénotype GABA, il a été démontré que chez l'adulte, la sérotonine favorise l'émergence de ce même phénotype. En effet, après transection de la moelle épinière, une greffe de cellules embryonnaires du raphé caudalement à la section, favorise l'expression du phénotype GABA (Dumoulin et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des précurseurs sérotoninergiques immortalisés (Eaton et al., 1998). La différence d'action de la sérotonine peut avoir plusieurs origines : cette substance exerce des effets différents sur les cellules cibles soit en modulant les propriétés synaptiques et cellulaires, soit en jouant un rôle trophique. De plus, ces effets sur les réseaux cibles changent en fonction du stade de développement.

Concernant la modulation de l'activité des cellules cibles, la sérotonine exprime une grande diversité d'action sur les réseaux moteurs spinaux au cours du développement. Chez l'embryon de poulet, des enregistrements intracellulaires de motoneurons à partir de coupes transversales de moelle épinière, ont permis de montrer que la sérotonine a un effet différentiel en fonction du stade de développement. Aux stades précoces de développement (E12), la 5-HT induit une réponse globale dépolarisante dans 50% des motoneurons, dans 69% des motoneurons au stade E15, et dans 100% des motoneurons au stade E18 (Muramoto et al., 1996). Une étude au niveau des récepteurs sérotoninergiques a permis de différencier, chez le poulet, l'effet de la sérotonine en fonction des récepteurs impliqués. Ainsi au stade E12, la sérotonine induit une hyperpolarisation rapide via les récepteurs 5-HT1 et une hyperpolarisation rapide couplée à une dépolarisation de faible amplitude via les récepteurs 5-HT2. En revanche au stade E18, la sérotonine entraîne une réponse dépolarisante via ces deux derniers récepteurs (Hayashi et al., 1997). Chez les mammifères, les résultats obtenus chez le rat post-natal diffèrent des données obtenues chez l'embryon de poulet : chez

le rat, juste après la naissance (entre P3-P5), la sérotonine a une action dépolarisante sur les motoneurones via les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Alors que plus tard (entre P8-P16), l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> induit une réponse hyperpolarisante alors que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> entraîne une dépolarisation (Takahashi and Berger, 1990; Elliott and Wallis, 1992).

Outre la modulation des propriétés cellulaires, les voies 5-HT pourraient jouer un rôle trophique dans la mise en place des réseaux cibles. Par exemple, l'absence de l'innervation cathécholaminergique induit une diminution de l'épaisseur du cortex et de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales (Whitaker-Azmitia, 1991). De façon similaire, chez des souris où l'enzyme de dégradation des catécholamines (Maoa) n'est pas présente (taux de 5-HT très élevé), les colonnes du cortex somato-sensoriel primaire ainsi que les connections axonales dans le corps genouillé latéral du thalamus ne se développent pas correctement (Alvarez et al., 2002; Gaspar et al., 2003). Il est intéressant de noter que chez des souris dépourvues de Maoa et de récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, ces projections axonales peuvent se développer normalement (Rebsam et al., 2002; Salichon et al., 2001).

L'importance de la 5-HT dans la mise en place des phénotypes cellulaires a également été mise en évidence sur des cultures organotypiques de coupes de cortex cérébral de rat. Dans ce cas, la 5-HT favorise la différenciation des neurones corticaux glutamatergiques sans affecter la prolifération cellulaire alors que la noradrénaline et la dopamine, deux catécholamines innervant aussi majoritairement le cortex, n'ont pas d'effets (Lavdas et al., 1997). Enfin, un autre travail, réalisé sur des cultures de neurones de striatum de souris, a montré que la 5-HT exerce un rôle positif sur l'expression de son propre phénotype (Zhou and Iacovitti, 2000).

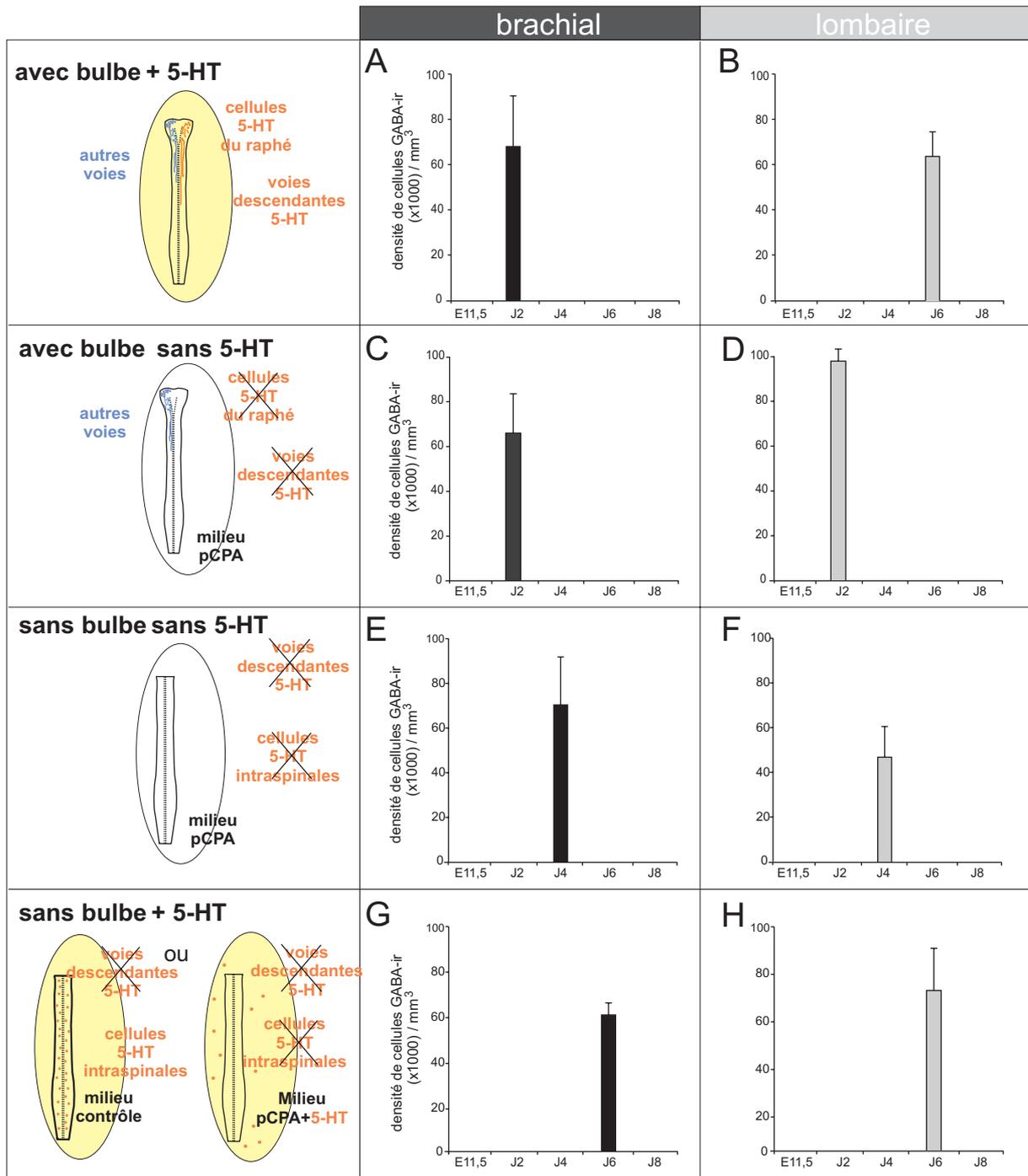
## 2) Récepteurs sérotoninergiques impliqués dans l'expression du phénotype GABA

Les récepteurs 5-HT appartiennent à une très grande famille et sont divisés en 7 classes (Barnes and Sharp, 1999; Gaspar et al., 2003). Cette diversité de récepteurs est présente dans

tout le SNC des mammifères (Barnes and Sharp, 1999; Verge and Calas, 2000). Cependant, à l'heure actuelle, au sein de la moelle épinière, seulement un sous ensemble de cette famille semble être présent (Marlier et al., 1991). Dans la moelle épinière adulte, les récepteurs 5-HT1 et 5-HT2 sont impliqués dans la modulation des réseaux moteurs (Beato and Nistri, 1998; Cazalets et al., 1992; Jackson and White, 1990), dans la modulation de l'excitabilité des motoneurones (Takahashi and Berger, 1990; Wang and Dun, 1990) et dans la récupération spinale (Antri et al., 2003; Norreel et al., 2003). Dans la moelle épinière embryonnaire, il n'existe que peu d'informations concernant la mise en place des récepteurs 5-HT. La plupart des données portent sur des stades de développement post-natals (Talley et al., 1997). Il en est de même pour d'autres structures centrales, où il a été démontré une expression précoce des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B uniquement aux stades post-natals (Bennett-Clarke et al., 1993; Miquel et al., 1994; Pranzatelli and Galvan, 1994). D'autres récepteurs 5-HT ont été également identifiés : récepteurs 5-HT2A, 2C (Volgin et al., 2003), et 5-HT3 (Bell et al., 1992). Cependant, il semblerait que les récepteurs 5-HT1A soient présents dans le système nerveux embryonnaire. Ces récepteurs ont été mis en évidence dans des cultures de tronc cérébral d'embryons de rat (Hillion et al., 1994). Plus récemment, il a été montré dans la moelle épinière embryonnaire de souris, l'existence de récepteurs 5-HT1A dont la stimulation réprime l'expression de cellules sérotoninergiques ectopiques intraspinales (Branchereau et al., 2002). Le travail de cette thèse démontre également l'existence des récepteurs 5-HT1B impliqués dans le contrôle négatif exercé par les voies descendantes 5-HT sur l'expression transitoire du phénotype GABA. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B sont présents aux stades précoces de développement embryonnaire dans la moelle épinière de souris et qu'ils jouent un rôle primordial dans l'élaboration des phénotypes neuronaux. Ainsi, la sérotonine exercerait un contrôle négatif sur la mise en place embryonnaire des phénotypes neuronaux spinaux via la famille des récepteurs 5-HT1.

### 3) Différence spatio-temporelle dans les effets de la 5-HT sur l'expression du phénotype GABA

Nous avons montré l'existence d'un délai rostro-caudal dans l'apparition du pic de cellules GABAergiques et ceci aussi bien *in utero* que *in vitro*. Ce délai rostro-caudal, entre les niveaux brachial et lombaire, correspond au temps nécessaire pour que les voies descendantes 5-HT atteignent les niveaux lombaires. Alors qu'au niveau brachial, les cellules GABAergiques se développent avant l'innervation 5-HT ; au niveau lombaire, les cellules GABA se mettent en place au moment où les voies 5-HT arrivent à ce niveau. Il existerait donc une régulation différente de l'expression du phénotype GABA au niveau brachial et au niveau lombaire. Cette différence de régulation est illustrée sur la Figure 46. Sur des cultures organotypiques, **(1) en présence des voies 5-HT**, l'apparition du pic au niveau lombaire est décalée de plusieurs jours (4 jours) par rapport au pic brachial (comparer Fig. 46B et 46A). **(2) En l'absence totale de 5-HT**, les deux niveaux spinaux analysés (brachial, lombaire) expriment le même comportement, le pic de cellules GABA lombaire apparaît après 2 jours en culture, et en même temps que le pic brachial (comparer Fig. 46C et 46D). Il n'y a donc plus de délai rostro-caudal. Au niveau brachial, il n'y a pas de modification d'expression des cellules GABA en présence ou non des voies descendantes 5-HT (comparer Fig. 46A et 46C). L'absence de ces voies n'a pas d'influence sur le pic brachial mais provoque une expression prématurée du pic lombaire (comparer Fig. 46B et 46D). **(3) En l'absence de 5-HT et après ablation de toutes les voies descendantes**, les deux populations GABAergiques s'expriment de façon concomitante (comparer Fig. 46E et 46F) cependant, retardées de deux jours par rapport au système sans 5-HT mais en présence des autres voies descendantes (comparer Fig. 46E et 46C et Fig. 46F et 46D). Ceci suggère un effet positif d'autres voies descendantes sur le développement du phénotype GABA. Enfin, **(4) en absence des voies descendantes (ablation du bulbe) et en présence de 5-HT (apport exogène)**, les pics brachial et lombaire



**Figure 46 : Histogrammes illustrant les pics de cellules GABA-ir au niveau brachial (A, C, E, G) et lombaire (B, D, F, H) dans les différentes conditions expérimentales utilisées avec bulbe + 5-HT (A, B), avec bulbe sans 5-HT (C, D), sans bulbe sans 5-HT (E, F) et sans bulbe + 5-HT (G, H)**

apparaissent de façon concomitante mais seulement après 6 jours en culture (Fig. 46G et 46H). Ceci démontre que la 5-HT, lorsqu'elle est présente avant toute expression de GABA, a un effet répressif aussi bien pour les populations brachiales que lombaires. De plus, ces travaux suggèrent que d'autres voies descendantes pourraient par contre accélérer les processus de maturation. Parmi ces voies, les fibres noradrénergiques qui envahissent également la moelle épinière tôt au cours du développement (Commissiong, 1983; Lakke, 1997) sont potentiellement candidates. Cependant, étant donné qu'elles sont moins précoces que les voies sérotoninergiques (Ballion et al., 2002; Rajaofetra et al., 1989), l'hypothèse de leur implication est peu probable. Les voies peptidergiques, GABAergiques et glutamatergiques qui présentent souvent des co-localisations avec la 5-HT (Hokfelt et al., 2000; Senba et al., 1982), pourraient aussi être impliquées.

Nous montrons également que l'expression du phénotype GABA au niveau brachial est indépendante de l'arrivée des voies 5-HT et qu'en absence de voies bulbo-spinales, il existe toujours un pic d'expression des cellules GABA intra-spinales. Ceci suggère que l'expression du phénotype GABA est auto-régulée. Des travaux montrant que le GABA peut avoir un rôle trophique et peut promouvoir son propre phénotype supportent cette hypothèse (Lauder et al., 1998).

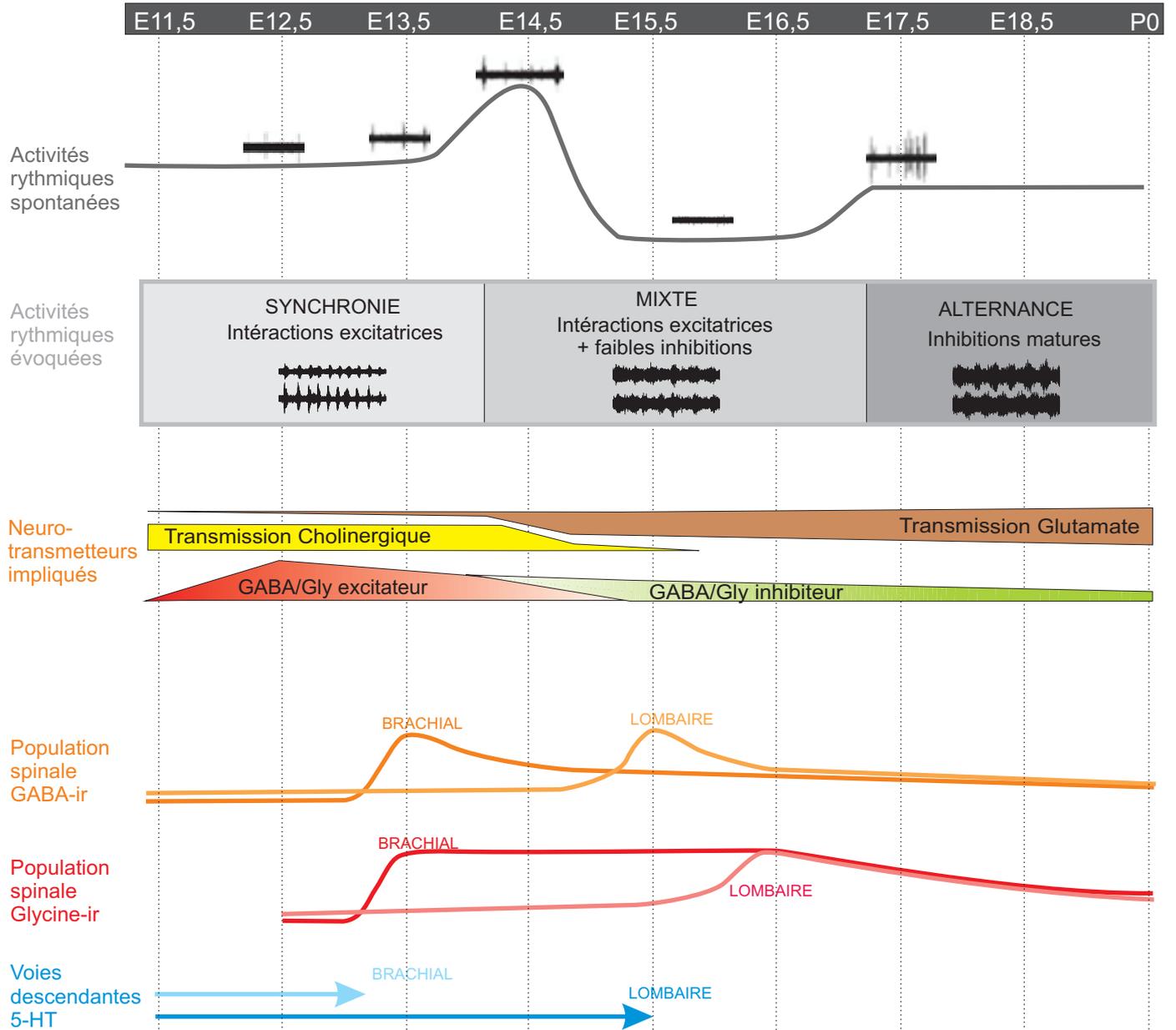
# **CONCLUSION GENERALE**

Le travail réalisé au cours de cette thèse de Doctorat, avait pour but d'étudier la mise en place des populations spinales « inhibitrices » dans la moelle épinière embryonnaire de souris et de déterminer le rôle des voies descendantes bulbo-spinales sérotoninergiques sur la mise en place de ces populations. Les principaux résultats ont été discutés dans les précédents chapitres. Dans cette conclusion générale, après avoir résumé nos principales données expérimentales, nous focaliserons notre attention sur deux aspects abordés de manière très préliminaire au cours de ce travail à savoir (1) le rôle de l'activité électrique dans la mise en place des phénotypes et (2) l'importance des retours sensoriels dans la maturation des réseaux spinaux.

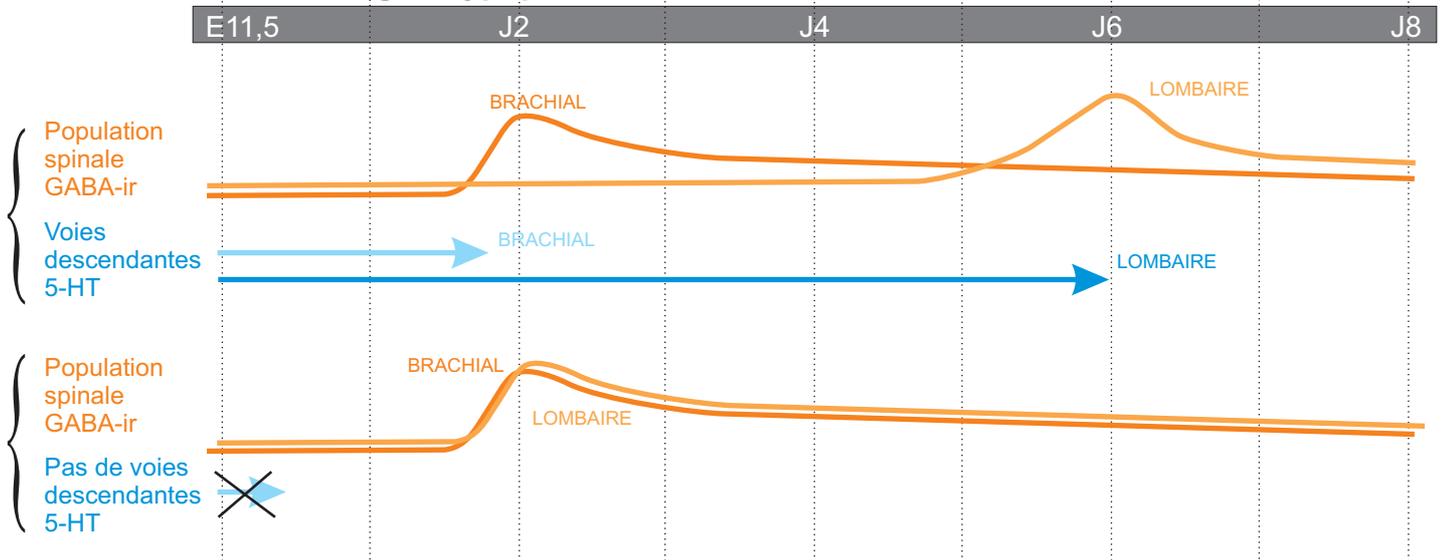
Les connaissances acquises au sein de l'équipe, incluant les travaux de cette thèse, sont présentées de manière schématique dans la Figure 47. On peut ainsi remarquer que l'évolution des activités rythmiques spontanées, générées au sein de la moelle épinière, présente des variations importantes au cours du développement avec un pic d'activité au stade E14,5. A ce même stade, les activités électriques évoquées commencent à se désynchroniser suggérant la mise en place d'inhibitions au sein des réseaux spinaux. C'est également à ce stade que les systèmes neurochimiques subissent le plus de modifications ontogénétiques. Nos travaux montrent que les populations GABA et glycine s'expriment aux alentours de ce stade E14,5 avec un pic d'expression présentant un délai rostro-caudal entre les niveaux brachial et lombaire. Le décalage temporel du pic d'expression au niveau lombaire correspond à la mise en place des voies descendantes 5-HT. L'utilisation de cultures organotypiques a permis de démontrer le rôle des voies descendantes dans le contrôle de l'expression du phénotype GABA et l'existence du délai rostro-caudal.

**Figure 47 : Tableau récapitulatif de la mise en place des activités rythmiques, des systèmes GABA, glycine et sérotoninergique dans la moelle épinière embryonnaire de souris et rôle des voies descendantes 5-HT sur la mise en place de la population spinale GABAergique.**

## Préparations aigues



## Cultures organotypiques



**Rôle des activités électriques sur la mise en place des phénotypes neuronaux**

L'acquisition des phénotypes neurochimiques est essentielle dans la mise en place des réseaux neuronaux. Peu de données sont disponibles concernant le rôle de l'activité électrique dans la mise en place de ces phénotypes. Le travail le plus remarquable, réalisé sur la moelle épinière de *Xenopus laevis*, montre que les phénotypes de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs sont régulés de manière homéostatique : l'augmentation de l'activité électrique par surexpression de canaux sodiques entraîne une augmentation des phénotypes inhibiteurs (GABA/glycine) et une diminution des phénotypes excitateurs (glutamate/acétylcholine) alors que la diminution de l'activité électrique induit des changements opposés (Borodinsky et al., 2004). L'action répressive des voies 5-HT sur l'expression du phénotype GABA pourrait donc être liée à un mécanisme activité-dépendant. On sait que la 5-HT est capable d'augmenter l'excitabilité des neurones aux stades embryonnaires (Branchereau et al., 2000a), cet effet excitateur perdurant pendant la période néonatale (Elliott and Wallis, 1992; Takahashi and Berger, 1990). Aussi, l'arrivée des voies bulbo-spinales 5-HT est vraisemblablement liée à une augmentation de l'activité électrique générée par les réseaux neuronaux. Selon Borodinski et collaborateurs (2004), cette augmentation d'activité électrique devrait induire l'augmentation de phénotypes inhibiteurs. Nos données, montrant que les voies descendantes 5-HT répriment le phénotype GABA, semblent donc contradictoires sauf si l'on considère que le GABA est encore excitateur au moment où arrivent les afférences 5-HT.

Dans le but de vérifier si la 5-HT contrôle le phénotype GABA via un mécanisme activité-dépendant, nous avons, dans nos cultures de moelle épinière, soit diminué l'activité électrique en bloquant la genèse des potentiels d'action (sous TTX), soit augmenté cette activité en élevant la concentration des ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire. Nos données, bien que préliminaires, ne semblent pas favoriser l'hypothèse d'un mécanisme activité-dépendant

puisque aucune de ces deux manipulations (TTX, haut  $K^+$ ) n'a empêché la 5-HT d'exercer son action répressive sur l'expression du phénotype GABA.

### **Rôle des informations sensorielles sur la mise en place des réseaux spinaux**

Le rôle instructif des informations sensorielles dans le développement des réseaux neuronaux est clairement démontré dans le cerveau. Ainsi, dans le système visuel, les interactions entre activités spontanées et activités sensorielles sont indispensables pour un développement normal des connexions entre les axones des cellules ganglionnaires de la rétine et les cellules cibles du corps genouillé latéral (pour revue voir Penn and Shatz, 1999). Dans ce système rétino-thalamique, l'absence d'informations sensorielles visuelles pendant le développement (fermeture de la paupière) n'empêche pas la formation des connexions mais prévient la ségrégation de ces connexions. Dans le cortex somato-sensoriel S1, des données suggèrent que les interactions entre les retours sensoriels (suite au mouvement) et les activités spontanées du cortex S1 favorisent la mise en place des connexions sensorielles et sont essentielles à la coordination sensori-motrice (Khazipov et al., 2004). Le rôle des retours sensoriels dans le développement des circuits neuronaux générateurs de rythmes tels la moelle épinière reste encore peu connu. Des travaux basés sur l'utilisation d'une drosophile mutante (mutation « senseless ») chez qui la majorité des neurones sensoriels est manquante, montrent qu'un développement en absence d'afférences sensorielles ne perturbe pas la genèse des mouvements même si l'exécution de certains mouvements complexes est affectée (Suster and Bate, 2002). Dans la moelle épinière de mammifères, de nombreuses études ont montré que la production d'activités électriques rythmiques par la moelle épinière en l'absence de muscles, i.e. en l'absence de retours sensoriels est largement possible (locomotion fictive) (pour revue voir Clarac et al., 2004; Kiehn and Kullander, 2004; Whelan, 2003). Une étude réalisée chez le poulet indique que le blocage chronique *in ovo* des retours sensoriels ne semble pas affecter

le développement des réseaux générateurs de rythme (Landmesser and Szente, 1986). Cependant, le rôle précis de ces retours sensoriels dans l'ontogenèse des circuits spinaux incluant les CPGs reste à démontrer. Notre préparation de culture organotypique de moelle épinière embryonnaire entière est un outil qui pourra permettre d'analyser le rôle du développement des systèmes sensoriels sur la mise en place des réseaux spinaux. La préparation que l'on utilise actuellement est dépourvue de retours sensoriels puisque la moelle épinière est mise en culture au stade E11,5, stade auquel aucune voie sensorielle ne s'est développée (voir Koo and Pfaff, 2002). Il a été démontré que les activités spontanées se développent d'une manière comparable dans la préparation organotypique et *in utero* (Branchereau et al., 2002). Cependant, les CPGs locomoteurs n'ont pas encore pu être mis en évidence. Ceci peut résulter du fait qu'aucun retour sensoriel n'est présent. Aussi, dans le futur, nous envisageons de mettre en culture des moelles épinières en présence de muscles fléchisseurs et/ou extenseurs. On sait que des connexions sensorielles entre muscles et moelle épinière sont possibles *in vitro*. En effet, des études chez l'embryon de rat ont déjà permis de démontrer l'existence de connexions en culture organotypique entre tranches de moelle épinière / ganglions rachidiens dorsaux (DRG) / muscle squelettiques (Spenger et al., 1991). Des cultures organotypiques de segments spinaux d'embryons de poulet, maintenus avec leurs DRGs, ont également clairement démontré le développement *in vitro* de fibres Ia et de fibres cutanées (Sharma and Frank, 1998). Ainsi, des cultures de moelle entière avec présence de fibres sensorielles seront essentielles à la compréhension du rôle de ces voies dans l'établissement des CPGs intraspinaux.

Les résultats de la présente étude montrent que les populations GABA et glycine se mettent en place selon un gradient rostro-caudal (délai entre le pic d'expression brachial et pic lombaire). De plus, nous démontrons que ce sont les voies descendantes 5-HT qui sont responsables de ce délai, tout au moins pour la population GABA. On peut s'interroger sur

l'importance fonctionnelle d'un tel délai rostro-caudal. Aux vues des données montrant que le GABA joue un rôle trophique (Lauder et al., 1998), on peut penser que le pic de GABA est corrélé à un rôle instructif dans la mise en place des connexions sensorielles au sein de la moelle épinière. En effet, ces connexions sensorielles s'établissent au moment où le pic d'expression du GABA est détecté : entre E13,5 et E15,5 pour les fibres Ia chez la souris (Koo et Pfaff, 2002). Etant donné que les membres antérieurs présentent une maturation plus précoce que les membres postérieurs (Kaufman, 1992), il est probable que les arrivées sensorielles soient aussi décalées dans le temps entre les segments brachial et lombaire. Les voies descendantes 5-HT permettraient donc au GABA d'être pleinement exprimé (pic d'expression) seulement au moment où les afférences sensorielles envahissent la moelle épinière.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Alvarez, C., Vitalis, T., Fon, E. A., Hanoun, N., Hamon, M., Seif, I., Edwards, R., Gaspar, P. and Cases, O.** (2002). Effects of genetic depletion of monoamines on somatosensory cortical development. *Neuroscience* **115**, 753-64.
- Antal, M., Berki, A. C., Horvath, L. and O'Donovan, M. J.** (1994). Developmental changes in the distribution of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol* **343**, 228-36.
- Antri, M., Mouffle, C., Orsal, D. and Barthe, J. Y.** (2003). 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *Eur J Neurosci* **18**, 1963-72.
- Aoki, E., Semba, R. and Kashiwamata, S.** (1989). When does GABA-like immunoreactivity appear in the rat cerebellar GABAergic neurons? *Brain Research* **502**, 245-51.
- Ballion, B., Branchereau, P., Chapron, J. and Viala, D.** (2002). Ontogeny of descending serotonergic innervation and evidence for intraspinal 5-HT neurons in the mouse spinal cord. *Developmental Brain Research* **137**, 81-8.
- Barale, E., Fasolo, A., Girardi, E., Artero, C. and Franzoni, M. F.** (1996). Immunohistochemical investigation of gamma-aminobutyric acid ontogeny and transient expression in the central nervous system of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Comp Neurol* **368**, 285-94.
- Barber, R. P., Vaughn, J. E. and Roberts, E.** (1982). The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res* **238**, 305-28.
- Barnes, N. M. and Sharp, T.** (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**, 1083-152.
- Beato, M. and Nistri, A.** (1998). Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT<sub>1</sub> receptor class. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**, 2073-80.
- Behar, T. N., Schaffner, A. E., Colton, C. A., Somogyi, R., Olah, Z., Lehel, C. and Barker, J. L.** (1994). GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *Journal of Neuroscience* **14**, 29-38.
- Bell, J., 3rd, Zhang, X. N. and Whitaker-Azmitia, P. M.** (1992). 5-HT<sub>3</sub> receptor-active drugs alter development of spinal serotonergic innervation: lack of effect of other serotonergic agents. *Brain Res* **571**, 293-7.
- Ben-Ari, Y.** (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* **24**, 353-360.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. and Gaiarsa, J. L.** (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303-25.
- Bennett-Clarke, C. A., Leslie, M. J., Chiaia, N. L. and Rhoades, R. W.** (1993). Serotonin 1B receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 153-7.
- Berki, A. C., O'Donovan, M. J. and Antal, M.** (1995). Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalization with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol* **362**, 583-96.
- Binor, E. and Heathcote, R. D.** (2001). Development of GABA-immunoreactive neuron patterning in the spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* **438**, 1-11.
- Black, M. M., Slaughter, T. and Fischer, I.** (1994). Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci* **14**, 857-70.
- Bohlhalter, S., Mohler, H. and Fritschy, J. M.** (1994). Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABA<sub>A</sub>-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* **642**, 59-69.

- Borodinsky, L. N., Root, C. M., Cronin, J. A., Sann, S. B., Gu, X. and Spitzer, N. C.** (2004). Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* **429**, 523-30.
- Branchereau, P., Chapron, J. and Meyrand, P.** (2002). Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* **22**, 2598-606.
- Branchereau, P., Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B., Chapron, J. and Viala, D.** (2000a). Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res Bull* **53**, 711-718.
- Branchereau, P., Rodriguez, J. J., Delvolvé, I., Abrous, D. N., Le Moal, M. and Cabelguen, J. M.** (2000b). Serotonergic systems in the spinal cord of the amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. *Journal of Comparative Neurology* **419**, 49-60.
- Briscoe, J. and Ericson, J.** (1999). The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 353-62.
- Cazalets, J. R. and Bertrand, S.** (2000). Ubiquity of motor networks in the spinal cord of vertebrates. *Brain Res Bull* **53**, 627-34.
- Cazalets, J. R., Borde, M. and Clarac, F.** (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* **15**, 4943-51.
- Cazalets, J.-R., Sqalli-Houssaini, Y. and Clarac, F.** (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *Journal of Physiology (London)* **455**, 187-204.
- Chronwall, B. and Wolff, J. R.** (1980). Prenatal and postnatal development of GABA-accumulating cells in the occipital neocortex of rat. *Journal of Comparative Neurology* **190**, 187-208.
- Clarac, F., Brocard, F. and Vinay, L.** (2004). The maturation of locomotor networks. *Prog Brain Res* **143**, 57-66.
- Cobas, A., Alvarez-Bolado, G. and Fairen, A.** (1988). Transient GABA-like immunoreactive axons in the corpus callosum of perinatal rats. *Neurosci Lett* **93**, 7-12.
- Cobas, A., Fairen, A., Alvarez-Bolado, G. and Sanchez, M. P.** (1991). Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABAA receptor. *Neuroscience* **40**, 375-97.
- Code, R. A., Burd, G. D. and Rubel, E. W.** (1989). Development of GABA immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the chick: ontogeny of gradients in terminal staining. *Journal of Comparative Neurology* **284**, 504-18.
- Coggeshall, R. E. and Lekan, H. A.** (1996). Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *Journal of Comparative Neurology* **364**, 6-15.
- Colin, I., Rostaing, P., Augustin, A. and Triller, A.** (1998). Localization of components of glycinergic synapses during rat spinal cord development. *J Comp Neurol* **398**, 359-72.
- Commissiong, J. W.** (1983). The development of catecholaminergic nerves in the spinal cord of rat. II. Regional development. *Brain Res* **313**, 75-92.
- Del Rio, J. A., Soriano, E. and Ferrer, I.** (1992). Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Journal of Comparative Neurology* **326**, 501-26.
- Doly, S., Madeira, A., Fischer, J., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Bernard, R., Verge, D. and Conrath, M.** (2004). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J Comp Neurol* **472**, 496-511.

- Dumoulin, A., Privat, A. and Gimenez y Ribotta, M.** (2000). Transplantation of embryonic Raphe cells regulates the modifications of the GABAergic phenotype occurring in the injured spinal cord. *Neuroscience* **95**, 173-182.
- Eaton, M. J., Plunkett, J. A., Karmally, S., Martinez, M. A. and Montanez, K.** (1998). Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat* **16**, 57-72.
- Ekstrom, P. and Ohlin, L. M.** (1995). Ontogeny of GABA-immunoreactive neurons in the central nervous system in a teleost, gasterosteus aculeatus L. *J Chem Neuroanat* **9**, 271-88.
- Elliott, P. and Wallis, D. I.** (1992). Serotonin and L-norepinephrine as mediators of altered excitability in neonatal rat motoneurons studied in vitro. *Neuroscience* **47**, 533-44.
- Ensini, M., Tsuchida, T. N., Belting, H. G. and Jessell, T. M.** (1998). The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development* **125**, 969-82.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T.** (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* **256**, 1555-1560.
- Feller, M. B., Butts, D. A., Aaron, H. L., Rokhsar, D. S. and Shatz, C. J.** (1997). Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves. *Neuron* **19**, 293-306.
- Fenelon, V., Le Feuvre, Y., Bem, T. and Meyrand, P.** (2003). Maturation of rhythmic neural network: role of central modulatory inputs. *J Physiol Paris* **97**, 59-68.
- Fu, W. M., Liou, H. C., Chen, Y. H. and Wang, S. M.** (1998). Coexistence of glutamate and acetylcholine in the developing motoneurons. *Chin J Physiol* **41**, 127-32.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. and Poo, M.** (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521-32.
- Gao, B. X., Stricker, C. and Ziskind-Conhaim, L.** (2001). Transition from GABAergic to glycinergic synaptic transmission in newly formed spinal networks. *Journal of Neurophysiology* **86**, 492-502.
- Gao, B. X. and Ziskind-Conhaim, L.** (1995). Development of glycine- and GABA-gated currents in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* **74**, 113-21.
- Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L.** (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4**, 1002-12.
- Gu, X. and Spitzer, N. C.** (1997). Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci* **19**, 33-41.
- Gutierrez, R., Romo-Parra, H., Maqueda, J., Vivar, C., Ramirez, M., Morales, M. A. and Lamas, M.** (2003). Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* **23**, 5594-8.
- Hall, A., Giese, N. A. and Richardson, W. D.** (1996). Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* **122**, 4085-94.
- Hamburger, V. and Balaban, M.** (1963). Observations and experiments on spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. *Dev Biol* **7**, 533-545.
- Hanson, M. G. and Landmesser, L. T.** (2003). Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* **23**, 587-600.

- Hayashi, T., Mendelson, B., Phelan, K. D., Skinner, R. D. and Garcia-Rill, E.** (1997). Developmental changes in serotonergic receptor-mediated modulation of embryonic chick motoneurons in vitro. *Developmental Brain Research* **102**, 21-33.
- Higashijima, S., Mandel, G. and Fetcho, J. R.** (2004). Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* **480**, 1-18.
- Hillion, J., Catelon, J., Raid, M., Hamon, M. and De Vitry, F.** (1994). Neuronal localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures. *Brain Res Dev Brain Res* **79**, 195-202.
- Hokfelt, T., Arvidsson, U., Cullheim, S., Millhorn, D., Nicholas, A. P., Pieribone, V., Serogy, K. and Ulfhake, B.** (2000). Multiple messengers in descending serotonin neurons: localization and functional implications. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **18**, 75-86.
- Iizuka, M., Nishimaru, H. and Kudo, N.** (1998). Development of the spatial pattern of 5-HT-induced locomotor rhythm in the lumbar spinal cord of rat fetuses in vitro. *Neurosci Res* **31**, 107-11.
- Itasaki, N. and Nakamura, H.** (1996). A role for gradient en expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* **16**, 55-62.
- Jackson, D. A. and White, S. R.** (1990). Receptor subtypes mediating facilitation by serotonin of excitability of spinal motoneurons. *Neuropharmacology* **29**, 787-97.
- Jacob, J. and Briscoe, J.** (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* **4**, 761-5.
- Jong, Y. J., Thampy, K. G. and Barnes, E. M., Jr.** (1986). Ontogeny of GABAergic neurons in chick brain: studies in vivo and in vitro. *Brain Research* **390**, 83-90.
- Juurink, B. H., Munoz, D. G. and Devon, R. M.** (1990). Calcitonin gene-related peptide identifies spinal motoneurons in vitro. *J Neurosci Res* **26**, 238-41.
- Kaufman, M. H.** (1992). The atlas of mouse development. *Academic Press* **Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.**
- Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B. and Ben-Ari, Y.** (2001). Early Development of Neuronal Activity in the Primate Hippocampus In Utero. *J Neurosci* **21**, 9770-9781.
- Khazipov, R., Sirota, A., Leinekugel, X., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y. and Buzsaki, G.** (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* **432**, 758-61.
- Kiehn, O. and Kullander, K.** (2004). Central pattern generators deciphered by molecular genetics. *Neuron* **41**, 317-21.
- Kiehn, O., Sillar, K. T., Kjaerulff, O. and McDearmid, J. R.** (1999). Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **82**, 741-746.
- Koo, S. J. and Pfaff, S. L.** (2002). Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron* **35**, 823-6.
- Kotak, V. C., Korada, S., Schwartz, I. R. and Sanes, D. H.** (1998). A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* **18**, 4646-55.
- Kriegstein, A. R.** (2005). Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia* **46 Suppl 7**, 15-21.
- Kudo, N. and Nishimaru, H.** (1998). Reorganization of locomotor activity during development in the prenatal rat. *Ann N Y Acad Sci* **860**, 306-17.
- Kudo, N., Nishimaru, H. and Nakayama, K.** (2004). Developmental changes in rhythmic spinal neuronal activity in the rat fetus. *Prog Brain Res* **143**, 49-55.

- Lakke, E. A.** (1997). The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **135**, 1-143.
- Lance-Jones, C.** (1982). Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse. *Brain Res* **256**, 473-9.
- Landis, S. C.** (1990). Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci* **13**, 344-50.
- Landmesser, L. T. and Szente, M.** (1986). Activation patterns of embryonic chick hind-limb muscles following blockade of activity and motoneurone cell death. *J Physiol* **380**, 157-74.
- Lauder, J. M., Han, V. K., Henderson, P., Verdoorn, T. and Towle, A. C.** (1986). Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **19**, 465-93.
- Lauder, J. M., Liu, J., Devaud, L. and Morrow, A. L.** (1998). GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspectives in Developmental Neurobiology* **5**, 247-59.
- Lavdas, A. A., Blue, M. E., Lincoln, J. and Parnavelas, J. G.** (1997). Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **17**, 7872-80.
- Lawson, S. J., Davies, H. J., Bennett, J. P. and Lowrie, M. B.** (1997). Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. *European Journal of Neuroscience* **9**, 794-9.
- Le Feuvre, Y., Fenelon, V. S. and Meyrand, P.** (1999). Central inputs mask multiple adult neural networks within a single embryonic network. *Nature* **402**, 660-4.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-94.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L.** (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1183-91.
- Legendre, P.** (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* **58**, 760-93.
- Leinekugel, X., Khalilov, I., McLean, H., Caillard, O., Gaiarsa, J. L., Ben-Ari, Y. and Khazipov, R.** (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol* **79**, 189-201.
- Lewis, J.** (1996). Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 3-10.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15.
- Lundgren, P., Mattsson, M. O., Johansson, L., Ottersen, O. P. and Sellstrom, A.** (1995). Morphological and GABA-immunoreactive development of the embryonic chick telencephalon. *International Journal of Developmental Neuroscience* **13**, 463-72.
- Ma, W., Behar, T. and Barker, J. L.** (1992). Transient expression of GABA immunoreactivity in the developing rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* **325**, 271-90.
- Ma, W., Behar, T., Chang, L. and Barker, J. L.** (1994). Transient increase in expression of GAD65 and GAD67 mRNAs during postnatal development of rat spinal cord. *J Comp Neurol* **346**, 151-60.
- Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J. and Betz, H.** (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo J* **10**, 2401-9.
- Marder, E. and Calabrese, R. L.** (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological Reviews* **76**, 687-717.
- Marlier, L., Teilhac, J. R., Cerruti, C. and Privat, A.** (1991). Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat spinal cord. *Brain Res* **550**, 15-23.

- Matsuda, M.** (2002). The initial development of motor neurons in the neural tube of rat embryos. *Congenit Anom (Kyoto)* **42**, 130-4.
- Meister, B., Arvidsson, U., Zhang, X., Jacobsson, G., Villar, M. J. and Hokfelt, T.** (1993). Glutamate transporter mRNA and glutamate-like immunoreactivity in spinal motoneurons. *Neuroreport* **5**, 337-40.
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A. and Shatz, C. J.** (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* **252**, 939-43.
- Miquel, M. C., Kia, H. K., Boni, C., Doucet, E., Daval, G., Matthiessen, L., Hamon, M. and Verge, D.** (1994). Postnatal development and localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in rat forebrain and cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* **80**, 149-57.
- Miranda-Contreras, L., Benitez-Diaz, P., Pena-Contreras, Z., Mendoza-Briceno, R. V. and Palacios-Pru, E.** (2002). Levels of amino acid neurotransmitters during neurogenesis and in histotypic cultures of mouse spinal cord. *Dev Neurosci* **24**, 59-70.
- Momose-Sato, Y., Miyakawa, N., Mochida, H., Sasaki, S. and Sato, K.** (2003). Optical analysis of depolarization waves in the embryonic brain: a dual network of gap junctions and chemical synapses. *J Neurophysiol* **89**, 600-14.
- Mullen, R. J., Buck, C. R. and Smith, A. M.** (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-11.
- Muramoto, T., Mendelson, B., Phelan, K. D., Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. and Puskarich-May, C.** (1996). Developmental changes in the effects of serotonin and N-methyl-D-aspartate on intrinsic membrane properties of embryonic chick motoneurons. *Neuroscience* **75**, 607-618.
- Myers, C. P., Lewcock, J. W., Hanson, M. G., Gosgnach, S., Aimone, J. B., Gage, F. H., Lee, K. F., Landmesser, L. T. and Pfaff, S. L.** (2005). Cholinergic Input Is Required during Embryonic Development to Mediate Proper Assembly of Spinal Locomotor Circuits. *Neuron* **46**, 37-49.
- Nakayama, K., Nishimaru, H., Iizuka, M., Ozaki, S. and Kudo, N.** (1999). Rostrocaudal progression in the development of periodic spontaneous activity in fetal rat spinal motor circuits in vitro. *J Neurophysiol* **81**, 2592-2595.
- Nakayama, K., Nishimaru, H. and Kudo, N.** (2002). Basis of changes in left-right coordination of rhythmic motor activity during development in the rat spinal cord. *J Neurosci* **22**, 10388-98.
- Nishimaru, H., Iizuka, M., Ozaki, S. and Kudo, N.** (1996). Spontaneous motoneuronal activity mediated by glycine and GABA in the spinal cord of rat fetuses in vitro. *J Physiol (Lond)* **497**, 131-143.
- Nishimaru, H., Takizawa, H. and Kudo, N.** (2000). 5-Hydroxytryptamine-induced locomotor rhythm in the neonatal mouse spinal cord in vitro. *Neuroscience Letters* **280**, 187-190.
- Nornes, H. O. and Carry, M.** (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res* **159**, 1-6.
- Norreel, J. C., Pflieger, J. F., Pearlstein, E., Simeoni-Alias, J., Clarac, F. and Vinay, L.** (2003). Reversible disorganization of the locomotor pattern after neonatal spinal cord transection in the rat. *J Neurosci* **23**, 1924-32.
- O'Donovan, M., Sernagor, E., Sholomenko, G., Ho, S., Antal, M. and Yee, W.** (1992). Development of spinal motor networks in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* **261**, 261-273.
- O'Donovan, M. J.** (1999). The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 94-104.
- Okado, N., Sako, H., Homma, S. and Ishikawa, K.** (1992). Development of serotonergic system in the brain and spinal cord of the chick. *Prog Neurobiol* **38**, 93-123.

- Oppenheim, R. W.** (1986). The absence of significant postnatal motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* **246**, 281-6.
- Ornung, G., Shupliakov, O., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Cullheim, S.** (1994). Immunohistochemical evidence for coexistence of glycine and GABA in nerve terminals on cat spinal motoneurons: an ultrastructural study. *Neuroreport* **5**, 889-92.
- Pearlman, A. L., Faust, P. L., Hatten, M. E. and Brunstrom, J. E.** (1998). New directions for neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 45-54.
- Peduzzi, J. D.** (1988). Genesis of GABA-immunoreactive neurons in the ferret visual cortex. *Journal of Neuroscience* **8**, 920-31.
- Penn, A. A. and Shatz, C. J.** (1999). Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res* **45**, 447-58.
- Phelps, P. E., Alijani, A. and Tran, T. S.** (1999). Ventrally located commissural neurons express the GABAergic phenotype in developing rat spinal cord. *J Comp Neurol* **409**, 285-98.
- Pow, D. V., Wright, L. L. and Vaney, D. I.** (1995). The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *J Neurosci Methods* **56**, 115-23.
- Pranzatelli, M. R. and Galvan, I.** (1994). Ontogeny of [<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol-labelled 5-hydroxytryptamine 1B-binding sites in the rat CNS. *Neurosci Lett* **167**, 166-70.
- Rajaofetra, N., Sandillon, F., Geffard, M. and Privat, A.** (1989). Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J Neurosci Res* **22**, 305-321.
- Rebsam, A., Seif, I. and Gaspar, P.** (2002). Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci* **22**, 8541-52.
- Ren, J. and Greer, J. J.** (2003). Ontogeny of rhythmic motor patterns generated in the embryonic rat spinal cord. *J Neurophysiol* **89**, 1187-95.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. and Kaila, K.** (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-5.
- Roberts, A., Dale, N., Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J.** (1988). Development and characterization of commissural interneurons in the spinal cord of *Xenopus laevis* embryos revealed by antibodies to glycine. *Development* **103**, 447-61.
- Roelink, H.** (1996). Tripartite signaling of pattern: interactions between Hedgehogs, BMPs and Wnts in the control of vertebrate development. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 33-40.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A. and Jessell, T. M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-55.
- Ruiz, Y., Pombal, M. A. and Megias, M.** (2004). Development of GABA-immunoreactive cells in the spinal cord of the sea lamprey, *P. marinus*. *J Comp Neurol* **470**, 151-63.
- Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A. L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy, D. L., Mossner, R., Lesch, K. P. et al.** (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-HT transporter knock-out mice. *J Neurosci* **21**, 884-96.
- Schaffner, A. E., Behar, T., Nadi, S., Smallwood, V. and Barker, J. L.** (1993). Quantitative analysis of transient GABA expression in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **72**, 265-76.
- Schmidt, B. J. and Jordan, L. M.** (2000). The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull* **53**, 689-710.
- Schwartz, M. L. and Meinecke, D. L.** (1992). Early expression of GABA-containing neurons in the prefrontal and visual cortices of rhesus monkeys. *Cerebral Cortex* **2**, 16-37.

- Senba, E., Shiosaka, S., Hara, Y., Inagaki, S., Sakanaka, M., Takatsuki, K., Kawai, Y. and Tohyama, M.** (1982). Ontogeny of the peptidergic system in the rat spinal cord: immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* **208**, 54-66.
- Sharma, K. and Frank, E.** (1998). Sensory axons are guided by local cues in the developing dorsal spinal cord. *Development* **125**, 635-43.
- Shatz, C. J.** (1996). Emergence of order in visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 602-8.
- Sillar, K. T., Reith, C. A. and McDearmid, J. R.** (1998). Development and aminergic neuromodulation of a spinal locomotor network controlling swimming in *Xenopus* larvae. *Ann N Y Acad Sci* **860**, 318-32.
- Sillar, K. T., Wedderburn, J. F. S., Woolston, A. M. and Simmers, A. J.** (1993). Control of locomotor movements during vertebrate development. *News Physiol Sci* **8**, 107-111.
- Soares, S., von Boxberg, Y., Lombard, M. C., Ravaille-Veron, M., Fischer, I., Eyer, J. and Nothias, F.** (2002). Phosphorylated MAP1B is induced in central sprouting of primary afferents in response to peripheral injury but not in response to rhizotomy. *Eur J Neurosci* **16**, 593-606.
- Spenger, C., Braschler, U. F., Streit, J. and Luscher, H. R.** (1991). An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. I. The Morphological Correlates of the Spinal Reflex Arc. *Eur J Neurosci* **3**, 1037-1053.
- Spoerri, P. E.** (1988). Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* **2**, 11-22.
- Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J. and Hubner, C. A.** (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* **468**, 57-64.
- Sueiro, C., Carrera, I., Molist, P., Rodriguez-Moldes, I. and Anadon, R.** (2004). Distribution and development of glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the spinal cord of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (elasmobranchs). *J Comp Neurol* **478**, 189-206.
- Suster, M. L. and Bate, M.** (2002). Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input. *Nature* **416**, 174-8.
- Suzue, T. and Shinoda, Y.** (1999). Highly reproducible spatiotemporal patterns of mammalian embryonic movements at the developmental stage of the earliest spontaneous motility. *Eur J Neurosci* **11**, 2697-710.
- Takahashi, T. and Berger, A. J.** (1990). Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *J Physiol* **423**, 63-76.
- Talley, E. M., Sadr, N. N. and Bayliss, D. A.** (1997). Postnatal development of serotonergic innervation, 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression, and 5-HT responses in rat motoneurons. *J Neurosci* **17**, 4473-85.
- Todd, A. J.** (1996). GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* **8**, 2492-8.
- Todd, A. J. and Sullivan, A. C.** (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* **296**, 496-505.
- Tramu, G., Pillez, A. and Leonardelli, J.** (1983). Serotonin axons of the ependyma and circumventricular organs in the forebrain of the guinea pig. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* **228**, 297-311.
- Tran, T. S., Alijani, A. and Phelps, P. E.** (2003). Unique developmental patterns of GABAergic neurons in rat spinal cord. *J Comp Neurol* **456**, 112-26.
- Van Eden, C. G., Mrzljak, L., Voorn, P. and Uylings, H. B.** (1989). Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **289**, 213-27.

- Vaney, D. I., Nelson, J. C. and Pow, D. V.** (1998). Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J Neurosci* **18**, 10594-602.
- Verge, D. and Calas, A.** (2000). Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat* **18**, 41-56.
- Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E. and Pflieger, J. F.** (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 118-29.
- Volgin, D. V., Fay, R. and Kubin, L.** (2003). Postnatal development of serotonin 1B, 2 A and 2C receptors in brainstem motoneurons. *Eur J Neurosci* **17**, 1179-88.
- Wang, M. Y. and Dun, N. J.** (1990). 5-Hydroxytryptamine responses in neonate rat motoneurons in vitro. *J Physiol* **430**, 87-103.
- Wenner, P. and MJ, O. D.** (1999). Identification of an interneuronal population that mediates recurrent inhibition of motoneurons in the developing chick spinal cord. *J Neurosci* **19**, 7557-67.
- Whelan, P. J.** (2003). Developmental aspects of spinal locomotor function: insights from using the in vitro mouse spinal cord preparation. *J Physiol* **553**, 695-706.
- Whitaker-Azmitia, P. M.** (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 553-61.
- Wong, R. O., Chernjavsky, A., Smith, S. J. and Shatz, C. J.** (1995). Early functional neural networks in the developing retina. *Nature* **374**, 716-718.
- Wu, W. L., Ziskind-Conhaim, L. and Sweet, M. A.** (1992). Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J Neurosci* **12**, 3935-3945.
- Yamamoto, Y. and Henderson, C. E.** (1999). Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol* **214**, 60-71.
- Yamashita, A. and Hayashi, M.** (1996). Ontogeny of GABA-immunoreactive cells in the primate cerebellar cortex: comparison with somatostatin-immunoreactivity. *Anatomy Embryology* **194**, 215-22.
- Yvert, B., Branchereau, P. and Meyrand, P.** (2004). Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *J Neurophysiol* **91**, 2101-9.
- Zhou, J. and Iacovitti, L.** (2000). Mechanisms governing the differentiation of a serotonergic phenotype in culture. *Brain Res* **877**, 37-46.

## **Contrôle du développement embryonnaire des systèmes spinaux GABA/glycinerigiques par les voies bulbo-spinales chez la souris : importance de la modulation sérotoninergique**

### **Résumé :**

Au cours de l'ontogenèse, l'acquisition des phénotypes de neurotransmetteurs est une étape indispensable à l'élaboration de réseaux neuronaux fonctionnels. Aussi, comprendre les mécanismes qui contrôlent cette acquisition revêt une grande importance. En combinant des techniques de culture organotypique de moelle épinière embryonnaire de souris, des approches immunohistochimique et pharmacologique ainsi que la microscopie confocale, nous avons, dans un premier temps, décrit la mise en place ontogénétique des systèmes GABAergiques et glycinerigiques dans la moelle épinière de souris. Puis, nous avons étudié le rôle des voies descendantes sérotoninergiques dans la maturation du système GABAergique.

Nos résultats montrent que :

- 1) la dynamique d'évolution des populations spinales GABA et glycine est similaire et s'effectue selon un axe ventro-dorsal et rostro-caudal. Cependant, l'apparition des premières cellules GABAergiques est plus précoce.
- 2) les voies sérotoninergiques retardent l'expression embryonnaire du phénotype GABA. En effet, en absence de sérotonine, la population de cellules GABA se met en place plus tôt. Par contre, en présence de 5-HT, cette maturation est retardée.
- 3) la 5-HT exerce cette action répressive sur le développement de la population GABA via les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> et par des mécanismes non activité-dépendants.

**Mots clefs :** ontogenèse, GABA, glycine, 5-HT, voies descendantes, culture organotypique, moelle épinière, immunohistochimie, souris KO

### **The embryonic development of the spinal GABA and glycinergic systems is controlled by bulbo-spinal pathways: implication of serotonergic modulation**

#### **Summary:**

During the ontogeny, the acquisition of neurotransmitters phenotype is a fundamental step for the elaboration of functional neuronal networks. Then, understanding the mechanisms underlying this acquisition provides important new knowledge. Using organotypic cultures of mouse embryonic spinal cord, immunohistochemistry, pharmacology and confocal microscopy, we have first described the ontogenic maturation of GABA and glycinergic systems in the mouse spinal cord. Then, we have studied the role of serotonergic descending inputs in the maturation of the GABAergic system. Our data show that:

- 1) the spinal GABA and glycinergic populations follow a similar dynamic of evolution. However, the GABAergic cells appear one day earlier than glycinergic neurons.
- 2) 5-HT down regulates the GABA phenotype expression. Indeed, without 5-HT, the GABAergic cells population matures earlier. By contrast, in the presence of 5-HT, this maturation is delayed.
- 3) 5-HT exerts its repressive action on the GABAergic population through 5-HT<sub>1B</sub> receptors via mechanisms not activity-dependant.

**Keywords:** ontogenesis, GABA, glycine, 5-HT, descending inputs, organotypic culture, spinal cord, immunohistochemistry, KO mice