



Rôles et caractérisation de la microglie dans le développement du néocortex somatosensoriel de la souris

Isabelle Arnoux

► To cite this version:

Isabelle Arnoux. Rôles et caractérisation de la microglie dans le développement du néocortex somatosensoriel de la souris. Neurosciences. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T008 . tel-01070272

HAL Id: tel-01070272

<https://theses.hal.science/tel-01070272>

Submitted on 1 Oct 2014

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité
Neuroscience

Ecole doctorale
Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement

Présentée par Isabelle Arnoux
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

ROLES ET CARACTERISATION DE LA MICROGLIE DANS LE DEVELOPPEMENT DU NEOCORTEX SOMATOSENSORIEL DE LA SOURIS

Jury :

Présidente : Claire Legay

Rapporteur : Alain Bessis

Rapporteur : Pascal Legendre

Examinatrice : Lauriane Ulmann

Directeur de thèse : Etienne Audinat

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Claire Legay pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, Pascal Legendre et Alain Bessis d'avoir accepté la lourde tâche d'être les rapporteurs de ce jury et d'évaluer mon travail. Je remercie Lauriane Ulmann d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Etienne Audinat, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions possibles. Merci de m'avoir encadrée durant ces cinq années passées au laboratoire. Je le remercie pour sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien et ses encouragements. Je le remercie pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont beaucoup apporté. Merci également de m'avoir laissée le temps de mûrir scientifiquement à mon rythme, de m'avoir guidée quand il le fallait et de m'avoir laissée assez d'autonomie pour faire mes propres choix. Je garderai de très bons souvenirs de nos moments passés en dehors du laboratoire : les nombreux pots pour célébrer les envois des papiers, ceux pour leur acceptation (moins nombreux malheureusement), les tapas partagés à Barcelone, la coupe de champagne pour mes 25 ans,...

Je remercie Serge Charpak pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie également d'avoir accepté de passer quelques journées à faire des expériences avec moi pour mon projet. Merci pour son aide et pour m'avoir suivie ces dernières années.

Un grand merci à ma très chère Maki qui m'a tant appris sur la microglie et le cortex. Merci pour tout ce que l'on a partagé ensemble scientifiquement : le projet, les manips et les souris mais aussi tout le reste : nos virées shopping, les restaurants, les cafés, les macarons Ladurée, nos discussions de filles,... J'ai été ravie de commencer cette thèse avec toi et que l'on soit devenue amies.

Un immense merci à Céline, la vie au laboratoire aurait été beaucoup moins agréable sans toi. Merci pour ton soutien, tes conseils avisés, ta sollicitude, ta gentillesse et ton amitié. Je te remercie de m'avoir toujours aidée et épaulée durant ma thèse. J'ai apprécié notre complicité, nos petites pauses entre deux cellules ou deux acquisitions de confocale, les verres bus ensemble un peu partout : Paris, Lyon, Marseille, Barcelone,... Merci d'avoir pris aussi bien soin de moi pendant toutes ces années.

Je remercie tous les stagiaires que j'ai encadrés et qui ont participé à ce travail. Merci à mes « Julie » (Julie Cendre et Julie Areias) pour leurs jolies immuno. Merci à Léo pour son travail sur les récepteurs purinergiques sur les cellules microgliales. Un merci particulier à mon ami Alvaro, j'ai été très heureuse de travailler avec toi sur nos projets communs et je te remercie pour ton aide précieuse. Merci également pour ta bonne humeur et tes encouragements.

Je remercie bien sur tous les membres actuels et passés de l'équipe pour leur sympathie qui ont fait que ces cinq années sont passées trop vite : Claire, Coralie-Anne, Safia, Weida, Alexis M, Paula et My-Van. Un remerciement spécial à Alexis M qui m'a appris à patcher les cellules microgliales.

Je remercie également mes « pot-lègues » de l'unité pour leur compagnie. Merci à Maddalena pour son dynamisme et ses délicieux desserts qui réchauffent le cœur et remontent le moral. Merci à Yannick d'avoir sauvé un de mes papiers grâce à ses connaissances informatiques et pour toutes nos discussions. Merci à Elke et Karine pour leurs amitiés, leurs gentilles intentions et leurs aides. Merci à Declan et à sa culture générale qui nous a permis de gagner une girafe de bière. Merci à Juliette, notre femme forte du labo, qui veille sur nous. Merci à Amelyne de nous aider si gentiment avec les lignées et la biologie moléculaire. Je remercie tous les collègues présents : Florent, Christophe, Davide, Kiri, Mathieu, Sergei, Fernando, David et MaCé mais aussi tous les anciens : Marcel, Matéo, Julia, Francesca, Paloma, Maya, Marion et Didier. Un merci spécial à Alexis E qui m'a beaucoup appris sur les tranches thalamocorticales et le cortex en champ de tonneaux. Je remercie particulièrement Nicole Ropert pour son aide et l'intérêt qu'elle porte à ce sujet.

Je remercie toutes les personnes travaillant sur les plateformes d'imagerie et de l'animalerie des saints-pères qui facilitent notre travail quotidien et qui sont toujours disponibles et prêts à nous aider.

Je remercie Elena qui m'a toujours encouragée et soutenue. Merci pour tes suggestions et tes remarques qui m'ont fait progresser. Ca a été un plaisir de travailler avec toi et de te revoir à différentes occasions pour parler de science mais aussi manger des glaces et boire des coups.

Merci aux copines de fac : Stéphanie, Jennifer, Marielle, Audrey et Yasmine ; qui soutiennent aussi leurs thèses tour à tour.

Enfin, je remercie mes proches qui m'accompagnent et qui me soutiennent depuis toujours. Merci à mes amis et en particulier à Agathe, Aude, Delphine et Laura pour leur écoute et leur bienveillance. Je remercie mes parents et mes sœurs de m'avoir soutenue et d'avoir été aussi compréhensifs. Je remercie bien sur Pierre pour son soutien quotidien, sa confiance en moi et son affection.

Résumé

Les cellules microgliales, qui sont les macrophages du système nerveux central, ont été principalement étudiées en conditions pathologiques. Néanmoins, l'étude de la microglie aux stades périnataux indique qu'elle influence le développement normal du système nerveux central. Des interactions directes et indirectes entre la microglie et les synapses existent mais les mécanismes par lesquels ces cellules immunitaires ciblent les synapses et modulent leur maturation fonctionnelle durant le développement postnatal sont peu connus.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux cellules microgliales et à leurs fonctions dans le développement postnatal du cortex somato-sensoriel de la souris. Dans une première étude, nous avons montré qu'au cours de la première semaine post-natale le recrutement des cellules microgliales aux sites synaptiques en maturation met en jeu une voie de signalisation impliquant la chimiokine neuronale fractalkine et de son récepteur microglial CX3CR1. En effet, un défaut d'expression de ce récepteur retarde le recrutement des cellules microgliales aux sites synaptiques et entraîne un retard de maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales.

Dans une seconde étude, nous avons caractérisé le phénotype des cellules microgliales lors de la maturation fonctionnelle des réseaux synaptiques corticaux. Nous avons montré que les cellules microgliales adoptent un phénotype particulier lorsqu'elles sont recrutées aux synapses en maturation. Ce phénotype diffère de celui exprimé par la microglie adulte en conditions physiologiques et pathologiques et pourrait permettre aux cellules microgliales d'accomplir des fonctions spécifiques nécessaires à la maturation synaptique.

Dans une troisième étude, nous avons testé les effets de la minocycline sur le développement cortical. Cette tétracycline est connue pour bloquer l'activation microgliale chez l'adulte. De façon surprenante, nous avons observé que pendant une période critique se situant à la fin de la première semaine post-natale la minocycline induit une importante mort cellulaire qui s'accompagne d'une altération de la distribution des cellules microgliales et déclenche leur activation.

L'ensemble de mes données montrent que les cellules microgliales sont très sensibles aux changements de leur environnement, que leur phénotype fonctionnel change en conditions physiologiques en

fonction de cet environnement et que des interactions réciproques entre neurones et microglie influencent la maturation fonctionnelle des réseaux synaptiques corticaux lors du développement postnatal.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Table des illustrations	9
Abréviations	10
Avant-propos	12
 Chapitre 1 : Introduction	 15
I. Origines des cellules microgliales	15
1. Origine neuro-ectodermale	15
2. Origine monocytique de la microglie	17
3. Origine mésodermale de la microglie	19
II. Entrée, dispersion et différenciation des cellules microgliales	23
1. Entrée des cellules microgliales	23
2. Dispersion des cellules microgliales	23
a. Colonisation du SNC par migration tangentielle et radiale	23
b. Prolifération des cellules microgliales amiboïdes	25
3. Différenciation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié	26
III. Description des cellules microgliales en conditions physiologiques et pathologiques chez l'adulte	27
1. Morphologie et identification immunohistochimique des microglies adultes	29
a. Identification des profils immunohistochimiques des cellules microgliales	29
b. Morphologie	32
2. Le profil électrophysiologique des cellules microgliales	34
a. Les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales en conditions physiologiques chez l'adulte	34
b. Les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales en conditions pathologiques chez l'adulte	36
IV. Les récepteurs microgliaux : éléments importants de la signalisation « on »/ « off » et leurs implications dans la régulation des fonctions microgliales	38
1. Récepteurs aux neurotransmetteurs	39
a. Les récepteurs purinergiques	39
b. Les récepteurs au glutamate	48
c. Les récepteurs au GABA	50
d. Les autres récepteurs aux neurotransmetteurs	51
2. Les récepteurs aux cytokines et aux chimiokines	52

a.	Les signaux « off » sous le contrôle des cytokines	53
b.	Les signaux « on » sous le contrôle des cytokines	57
3.	Les récepteurs Toll-like.....	61
4.	Les récepteurs aux immunoglobulines	63
5.	Les récepteurs aux compléments	66
6.	Les récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I	68
V.	Les principales fonctions des cellules microgliales en conditions physiopathologiques	69
1.	Les fonctions de la microglie en conditions physiologiques	69
a.	Une surveillance dynamique et constante du parenchyme cérébral	69
b.	Contrôle de la plasticité synaptique à long terme.....	72
c.	Modulation de l'activité synaptique	72
d.	Régulation de la neurogénèse adulte	75
e.	Elimination des synapses ?	76
2.	Les fonctions de la microglie en conditions pathologiques	76
a.	Motilité et migration vers le site lésé.....	77
b.	Neurotoxicité et neuroprotection : le double rôle des facteurs solubles	79
c.	Phagocytose du matériel cellulaire endommagé	81
d.	Elimination des synapses affaiblies : le « synapse stripping ».....	82
e.	Modulation de l'activité synaptique	86
VI.	La microglie au cours du développement post-natal.....	87
1.	Les caractéristiques morphologiques des cellules microgliales immatures.....	88
2.	La répartition hétérogène des cellules microgliales	88
3.	Les changements développementaux de la densité des cellules microgliales.....	89
4.	Les rôles microgliaux nécessaires au développement	90
a.	Induction de la mort neuronale	90
b.	Régulation de la synaptogénèse	92
c.	Contrôle des propriétés synaptiques	93
d.	Remodelage synaptique et « synapse pruning ».....	93
VII.	Le cortex somatosensoriel primaire comme modèle d'étude.....	96
1.	Présentation générale des voies anatomiques du cortex somatosensoriel	96
2.	Organisation fonctionnelle d'un tonneau	98
3.	Mise en place des tonneaux dans la couche 4 du cortex somatosensoriel	99
4.	Période critique de la plasticité structurale du cortex en champ de tonneaux	100
5.	Les propriétés synaptiques de la synapse thalamocorticale	102
a.	Changement de la neurotransmission médiée par les récepteurs AMPA et KA	103
b.	Changement de sous-unité des récepteurs NMDA.....	105

c. Changements du ratio des courants AMPA/NMDA	108
6. La plasticité synaptique à la synapse thalamocorticale	110
a. Plasticité synaptique à long-terme.....	110
Potentialisation à long terme (LTP)	110
Dépression à long terme (LTD)	112
b. Plasticité synaptique à court-terme.....	113
Chapitre 2 : Résultats.....	115
I. Première publication: “Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex”	115
1. Présentation de l’article	115
2. Article.....	116
II. Deuxième publication: “Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory barrel cortex”	130
1. Présentation de l’article	130
2. Article.....	131
III. Troisième publication: “Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex”	157
1. Présentation de l’article	157
2. Article.....	158
Chapitre 3: Discussion	179
1. Le cortex en champ de tonneaux : un excellent modèle d’étude des interactions neurone/microglie	179
2. Distribution et recrutement des cellules microgliales	180
3. Evolution du phénotype microglial au cours du développement	185
4. Les fonctions microgliales modulant la maturation synaptique	187
Hypothèse 1 : Altération des propriétés fonctionnelles de la microglie chez les animaux CX3CR1 ^{eGFP/eGFP}	187
Hypothèse 2 : Les interactions retardées entre les synapses et la microglie retarde la maturation synaptique chez les animaux CX3CR1 ^{eGFP/eGFP}	189
5. Les astrocytes : des intermédiaires dans la communication neurone-microglie ?	194
6. Perspectives	199
Annexe	202
Revue Médecine/Science : La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales	202
Références	217

Table des illustrations

Les figures

Figure 1: Développement cérébral et hématopoïèse	21
Figure 2: Schéma des différentes étapes de différenciation de la microglie au cours du développement embryonnaire.....	22
Figure 3: Schéma représentant l'activation classique et alternative des cellules microgliales	28
Figure 4: Différentes formes d'activation des cellules microgliales	29
Figure 5: Morphologie des cellules microgliales.....	33
Figure 6: Courants membranaires typiques de cellules microgliales en tranches en conditions physiologiques	36
Figure 7: Evolution des propriétés électrophysiologiques de la microglie après un Status Epilepticus	37
Figure 8: Mouvements rapides des prolongements microgliaux vers le site de lésion	41
Figure 9: Signalisation neurone-microglie impliquée dans la lésion du nerf périphérique	45
Figure 10: La voie de signalisation fractalkine/CX3CR1	55
Figure 11: Les voies d'activation du complément	67
Figure 12: Exemple de "synapse stripping" après une lésion axonale.....	83
Figure 13 : Cellules microgliales éliminant des éléments pré- et post-synaptiques	95
Figure 14: La voie lemniscale des vibrisses aux tonneaux dans le cerveau de la souris.....	97
Figure 15: Les deux voies thalamocorticales relayant l'information sensorielle des vibrisses au cortex.....	98
Figure 16: La synapse thalamocorticale.....	99
Figure 17 Schéma illustrant la plasticité structurale dans le cortex en champ de tonneau	102
Figure 18: Cinétiques des récepteurs NMDA avec et sans GluN2B dans des neurones hippocampaux en culture	105
Figure 19: Changements développementaux de la composition en sous-unité des récepteurs NMDA à la synapse thalamocorticale	107
Figure 20 : Evolution des courants AMPA/NMDA	109
Figure 21 : L'induction de la LTP est limitée à la période critique	111
Figure 22: Distribution des cellules microgliales au cours de la deuxième semaine post-natale chez les CX3CR1 ^{eGFP/eGFP} ;TLR4 ^{-/-}	181
Figure 23: Comparaison de la motilité des cellules microgliales entre les animaux CX3CR1 ^{+/-eGFP} et CX3CR1 ^{eGFP/eGFP} au cours du développement	184
Figure 24: Le TNFalpha glial régulant la neurotransmission.....	192
Figure 25: La synapse tripartite.....	195
Figure 26: Distribution des astrocytes dans la couche 4 du cortex somatosensoriel au cours du développement post-natal et chez l'adulte	196
Figure 27: Schéma de la modulation des fréquences des EPSCs lors d'application de LPS	198

Les tableaux

Tableau 1 : Canaux ioniques exprimés par la microglie	34
Tableau 2: Les agonistes majeurs des TLRs et les médiateurs produits en réponse à leur activation	61

Abréviations

2-MeSADP:	2-methylthio-adénosine-triphosphate	GTP: guanosine triphosphate
ACM:	astrocyte-conditioned medium	GYKI: 1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbamy-4-methyl-7,8-methylenedioxy-3,4-dihydro-5H-2,3-benzodiazepine
ADAM:	A Disintegrin And Metalloproteinase	KCC2: potassium chloride cotransporter 2
ADP:	adenosine diphosphate	Kdr : canaux potassiques sensibles au potentiel responsables des courants sortantes
AMP:	adenosine monophosphate	Kir : canaux potassiques sensibles au potentiel responsable des courants entrants
AMPA:	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate	IB4: isolectine B4
APP :	amyloid precursor protein	Iba1: ionized calcium-binding adaptator molecule 1
ATP:	adenosine-5'-triphosphate	IFN: interféron
BDNF:	brain-derived neurotrophic factor	IGF1: insulin growth factor 1
CD:	cluster of differentiation	IL: interleukine
Cm:	capacitance membranaire	iNOS: inducible nitric oxide synthase
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité	ION : branche infraorbitale du nerf trijumeau
COX-2:	cyclo-oxygénase 2	LAMP: lysosomal-associated membrane protein
CSF:	colony stimulating factor	LPS: lipopolysaccharide
CTA:	corticothalamic axons	LTD: long-term depression
CX3CR1:	CX3C chemokine receptor 1	LTP: long-term potentiation
DAMP:	danger-associated molecular pattern	MAPK: mitogen-activated protein kinases
DAP12:	DNAX adaptor protein-12	MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
E:	embryonic day	M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
EPSC:	excitatory post-synaptic current	Mecp2: methyl-CpG binding protein 2
eYFP:	enhanced yellow fluorescent protein	mEPSC: miniature excitatory post-synaptic current
GABA:	acide γ -aminobutyrique	MHCII: major histocompatibility complex class II
GFAP:	glial fibrillary acidic protein	
GFP:	green fluorescent protein	
GM-CSF:	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor	

MIP-1alpha: macrophage inflammatory protein-1alpha

MMP: métalloprotéinase matricielle

mV: millivolt

Myb: myeloblastosis

Ncx: sodium-calcium exchanger

NGF: nerve growth factor

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

NO: oxyde nitrique

NT: neurotrophin

P: postnatal day

P2X: récepteur purinergique ionotrope

P2Y: récepteur purinergique métabotrope

pA: pico-ampère

PAMP: pathogen-associated molecular pattern

PBS: phosphate buffered saline

PCD: programmed cell death

PCR: polymerase chain reaction

PDGF: platelet-derived growth factor

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PGE₂: prostaglandine E2

POM: noyau posteriomédial du thalamus

PPR: paired-pulse ratio

PRR: pattern recognition receptor

PSPB: pallial-subpallial boundary

Rin: input resistance

RGC: cellules du ganglion rétinale

Ro25-6981: (α R, β S)- α -(4-hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol

ROS: reactive oxygen species

RT: reverse transcription

Runx1: Runt-related transcription factor 1

S1: cortex somatosensoriel primaire

SE: Status Epilepticus

SIRPalpha: signal-regulatory protein alpha

SNC: Système nerveux central

SpV: noyau spinal caudal du tronc cérébral

TARP: transmembrane AMPA regulatory proteins

TCA: thalamocortical axons

TGFbeta: transforming growth factor beta

TLR: Toll-like receptor

TNFalpha: tumor necrosis factor alpha

TREM2: triggering receptor expressed by myeloid cells-2

TrkB: tropomyosin related kinase B

TTX: tetrodotoxin

UDP: uridine diphosphate

VGLUT2 : vesicular glutamate transporter 2

VPM: noyau médial postérieur ventral du thalamus

Avant-propos

Les cellules microgliales sont des cellules particulières dans le système nerveux central (SNC), elles se situent à l'interface entre le système immunitaire et le système nerveux ce qui leur confèrent des propriétés uniques et remarquables. Mon travail de thèse a porté sur l'étude des interactions réciproques neurone-microglie au cours du développement et les conséquences de ces interactions sur la maturation synaptique. L'ensemble des données présenté dans l'introduction de ce mémoire permet d'apporter les éléments nécessaires à la compréhension des résultats obtenus et de la discussion.

La première partie porte sur l'origine des cellules microgliales. Plusieurs théories sur l'origine de ces cellules ont été proposées et après plusieurs années de débats, il est maintenant admis que celles-ci sont issues de précurseurs myéloïdes présents dans le sac vitellin qui envahissent le SNC au cours du développement embryonnaire.

Dans la seconde partie, je détaillerai les principales voies d'entrée des cellules microgliales leur permettant de coloniser le parenchyme cérébral ainsi que les mécanismes assurant leur dispersion au cours du développement post-natal. Nous verrons ensuite comment le phénotype de la microglie évolue lorsque ces cellules atteignent leur destination finale.

La troisième partie décrit de façon non-exhaustive le phénotype des cellules microgliales chez l'adulte en conditions physiologiques et pathologiques. Les propriétés des cellules microgliales ont été surtout étudiées chez l'adulte dans des contextes pathologiques et de façon plus modérée dans des contextes physiologiques. Les données provenant de ces études indiquent que ces cellules ont des propriétés particulières selon leur état d'activation. Dans cette partie je présenterai seulement les caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et électrophysiologiques de ces cellules puisque ce sont ces paramètres auxquels je me suis intéressée lors de mon étude des cellules microgliales au cours du développement post-natal.

La quatrième partie porte sur les nombreux récepteurs des cellules microgliales qui jouent un rôle clé dans la communication avec les autres cellules du SNC et régulent les fonctions de la

microglie. En effet, il a été mis en évidence que la définition des propriétés des cellules microgliales était sous la dépendance d'interactions cellulaires nombreuses et variées avec les cellules neuronales et gliales à proximité. Des signaux « on/off » mettant en jeu des interactions physiques ou impliquant des médiateurs solubles se lient à des récepteurs. Ces signaux sont de nature très diverses : neurotransmetteurs, immunoglobulines, cytokines, molécules du complément, etc. L'étendue de ce répertoire de récepteurs exprimés par les cellules microgliales leur permet donc de détecter une grande variété de signaux qui vont orienter leur comportement adaptatif.

Ce comportement repose sur un nombre important de fonctions microgliales principalement étudiées chez l'adulte et dont je présenterai les principales dans une cinquième partie de mon introduction. Les cellules microgliales présentes dans le cerveau adulte en conditions physiologiques se caractérisent par un petit soma et de larges ramifications très mobiles leur permettant d'assurer une fonction de surveillance active de leur environnement. Lorsque des changements anormaux apparaissent, les cellules microgliales évoluent vers un état d'activation. Il est important de noter qu'il n'existe pas un seul état d'activation mais une multitude permettant d'assurer des fonctions spécifiques déclenchées par des stimuli particuliers. En outre, l'activation des cellules microgliales bouleverse certaines de leurs propriétés telles que la phagocytose, la libération de facteurs pro- et/ou anti-inflammatoires, la prolifération, la migration.

La sixième partie introduit de façon plus spécifique le sujet d'étude développé dans ma thèse : la microglie et sa relation aux neurones au cours du développement post-natal. Lors de cette période du développement, les cellules microgliales sont exposées aux évolutions permanentes de leur environnement que constitue le SNC en développement et auquel ces cellules s'adaptent en adoptant des états fonctionnels qui peuvent différer de ceux observés en conditions physiologiques ou pathologiques chez l'adulte. Par ailleurs, je présenterai quelques exemples démontrant la nécessité de certaines fonctions des cellules microgliales au bon déroulement du développement des réseaux neuronaux.

Dans la dernière partie de l'introduction, je présenterai le modèle d'étude que nous avons choisit pour étudier le phénotype et l'influence des cellules microgliales sur la maturation des synapses : le cortex en champ de tonneaux. Nous avons opté pour cette structure corticale car son développement a été largement étudié et que les propriétés de la synapse thalamocorticales sont bien définies. Je présenterai les voies anatomiques du cortex somatosensoriel et son organisation fonctionnelle. Par la suite, j'évoquerai la période critique de la plasticité structurale puis je développerai les propriétés synaptiques de la synapse excitatrice thalamocorticale.

L'ensemble des données présenté dans cette introduction permettra de mieux comprendre les résultats obtenus au cours de cette thèse portant sur les rôles et la caractérisation de la microglie au cours du développement dans le cortex somatosensoriel primaire de la souris.

Chapitre 1 : Introduction

I. Origines des cellules microgliales

Les premières descriptions histologiques des cellules microgliales datent de la fin du XIX^{ème} siècle avec Franz Nissl qui les nommait « les cellules bâtons » (“Stabchenzellen”) et W. Ford Robertson qui les identifiait comme la « mésoglie » (pour revue (Ginhoux et al., 2013)). Il introduit le terme de mésoglie en référence aux cellules provenant du mésoderme afin de marquer l'origine différente de ces cellules avec celles provenant du neuro-ectoderme. Puis, en 1913, Santiago Ramon y Cajal renomme ces cellules par « troisième élément du système nerveux ». En 1919, son disciple Pio del Rio-Hortega affine ce concept et insiste sur leurs différences morphologiques et fonctionnelles avec les autres types cellulaires. Il est le premier à les nommer microglie. Del Rio-Hortega, surnommé le « père de la microglie », affirme dès cette époque que les cellules microgliales résidentes ont pour origine le mésoderme (pour revue (Ginhoux et al., 2013)). L'origine des cellules microgliales a été une source de débats pendant plusieurs siècles. En effet, de nombreux chercheurs ont cherché à identifier les précurseurs de ces cellules et les interprétations erronées de certaines données expérimentales ainsi que l'utilisation de marqueurs non-spécifiques et de système en culture ont conduit ces derniers à exprimer différentes théories. Il a été proposé que les cellules microgliales aient pour origine : le neuro-ectoderme (comme les oligodendrocytes et les astrocytes), les monocytes de la circulation sanguine ou le mésoderme.

1. Origine neuro-ectodermale

Malgré les interprétations initiales de Pio del Rio-Hortega mettant en avant une origine des cellules microgliales différente de celle des neurones et autres cellules gliales, plusieurs études au cours du XX^{ème} siècle évoquent une origine neuro-ectodermale commune à ces cellules. Il a été proposé que les glioblastes provenant du neuro-ectoderme, principales sources de cellules gliales, soient les précurseurs des cellules microgliales (Fujita and Kitamura, 1975). L'utilisation d'anticorps non-spécifiques reconnaissant les cellules microgliales et les cellules neuro-épithéliales, tels que

l'anticorps monoclonal lipocortine-1, a renforcé cette hypothèse (Fedoroff et al., 1997; McKanna, 1993). D'autres études immunohistochimiques utilisant des anticorps marquant de façon non-spécifique la microglie et les astrocytes (ex : LN-1 (Dickson and Mattiace, 1989)) ou la microglie et les oligodendrocytes (ex : ED1, (Wolswijk, 1995)) ont également confortés cette théorie de l'origine neuro-ectodermale de la microglie.

De plus, des études basées sur des modèles de cultures cellulaires alimenteront également cette théorie. Par exemple, l'équipe de Hao en 1991 montrent par une approche immunohistochimique que des cultures de cellules neuro-épithéliales ou des astrocytes embryonnaires de souris, prélevés avant la mise en place d'un système de vascularisation, peuvent se différencier en cellules microgliales (Hao et al., 1991). Par ailleurs, une autre équipe a observé que des cultures clonales de cellules néopalliales désagrégées peuvent donner un mélange de cellules GFAP et Mac-1 positives, soit respectivement des astrocytes et des microglies. Les auteurs de cette étude concluent que les précurseurs des astrocytes et de la microglie sont communs et qu'ils sont présents dans les cellules néopalliales (Fedoroff et al., 1997). Ces conclusions erronées s'expliquent par le fait que l'utilisation d'un modèle de culture cellulaire pour étudier le devenir de certains types cellulaires n'est pas la meilleure stratégie. En effet, suivant les supports et les proportions de sérum utilisés, les cellules expriment de façon non-spécifique certains marqueurs. Ainsi, des cellules microgliales issues de cultures mixtes peuvent exprimer des marqueurs de cellules macrogliales comme les oligodendrocytes (Yokoyama et al., 2004) ou les astrocytes (Fedoroff et al., 1997).

Les travaux de De Groot en 1992 indiquent que les cellules de la moelle osseuse d'une souris adulte transplantées chez un nouveau-né ou un adulte n'arrivent pas à coloniser le cerveau de l'animal hôte. A partir de cette observation, il émet l'hypothèse que la majorité des cellules microgliales ont une origine neuro-ectodermale locale (de Groot et al., 1992). Ces interprétations seront corrigées par les travaux de Priller qui démontrent que la microglie est une population cellulaire très peu renouvelée et maintenue par des précurseurs présents dans le cerveau avant la naissance (Priller et al., 2001).

Cependant, il est maintenant admis que la microglie ne dérive pas du neuro-ectoderme et que les anticorps utilisés lors de la plupart de ces études immunohistochimiques n'étaient pas spécifiques de la microglie. De plus, l'utilisation de culture cellulaire s'avère inappropriée pour démontrer une origine commune entre la microglie et les neurones ou la macroglie.

2. Origine monocytique de la microglie

Les cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse ont également été proposées comme précurseurs des cellules microgliales. En effet, ces cellules hématopoïétiques étant les précurseurs des macrophages des tissus périphériques, il semble plausible qu'elles engendrent également les macrophages du système nerveux.

La première preuve expérimentale permettant de penser que la microglie a une origine monocytique résulte des travaux de Ling et son équipe qui identifient par microscopie des phagocytes amiboïdes dans le corps calleux de rats en développement post-natal dont la disparition est concomitante à l'apparition des cellules microgliales ramifiées (Ling, 1994). Ces phagocytes sont des macrophages et certains présentent des caractéristiques monocytaires alors que d'autres semblent être dans un état transitoire entre ces deux types cellulaires. Les auteurs de cette étude ont conclu que les monocytes de la circulation sanguine entraînent dans le cerveau au cours du développement, se transforment en microglies amiboïdes puis évoluent en microglies ramifiées. Similairement, des études auto-radiographiques montrent que les microglies amiboïdes avec des caractéristiques monocytaires se transforment en microglies ramifiées au cours du développement. L'injection intra-péritonéale de [3H]-thymidine à des rats en développement post-natal permet de suivre le devenir de cellules sanguines marquées. Des cellules amiboïdes immatures sont retrouvées dans le corps calleux quelques heures après l'injection et une semaine plus tard, des cellules microgliales ramifiées sont détectées. Ces observations suggèrent que les cellules microgliales ramifiées marquées proviennent de cellules amiboïdes immatures ayant pris le traceur plus tôt au cours du développement (Imamoto and Leblond, 1978). De plus, des études histochimiques ont également révélées la présence de plusieurs enzymes identiques dans la microglie et dans les monocytes et les macrophages renforçant l'idée

d'une origine monocytique pour la microglie (Kaur et al., 1984, 1987). Le marquage de ces enzymes a également permis de tracer la transformation de la microglie amiboïde en microglie ramifiée lors du développement. D'autre part, des études utilisant des traitements connus pour supprimer la production de monocytes, comme la cortisone ou le dexaméthasone, conduisent à une diminution du nombre de microglie amiboïde lors du développement post-natal (Kaur et al., 1994; Ling, 1982).

Cependant, malgré l'existence de ces nombreuses données suggérant que les monocytes de la circulation sanguine entrent dans le système nerveux central après la naissance, il est important de noter que ces études sont qualitatives et ne démontrent pas clairement la contribution relative exacte des monocytes à former des microglies ramifiées chez l'adulte. En fait, les auteurs ont eux-mêmes reconnus que ces événements étaient peu fréquents et que la majorité des cellules marquées étaient des cellules périvasculaires (Ling et al., 1980). Il a été suggéré que deux populations de cellules microgliales coexisteraient et auraient des origines différentes : une faible proportion dérivant des monocytes qui deviendraient les microglies périvasculaires et une autre dérivant des macrophages primitifs du sac vitellin qui deviendraient les microglies ramifiées résidentes (origine mésodermique). De plus, il est maintenant accepté que les monocytes ne peuvent pas être les précurseurs des cellules microgliales au cours du développement embryonnaire car la microglie est détectée à partir d'E8 (Alliot et al., 1999) soit avant la différenciation des monocytes.

Néanmoins, dans certains modèles de pathologies du système nerveux central chez l'adulte, il est possible que des monocytes de la circulation sanguine envahissent le parenchyme cérébral afin de se transformer en microglies. Dans l'étude de Mildner, il a été montré que des monocytes Ly6C^{hi} sont recrutés dans le système nerveux central et qu'ils se différencient en microglie lors de conditions pathologiques associées à une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Ce phénomène de recrutement et de différenciation des monocytes en microglie n'est visible que chez des animaux receveurs de transplantation de moelle osseuse après une irradiation. En revanche, chez les animaux dont le système nerveux central avait été protégé des irradiations et par conséquent de l'inflammation associée, aucune cellule dérivant de la moelle osseuse n'a envahi le cerveau (Mildner et al., 2007). L'étude d'Ajami et al (2007), a également montré que l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique

est une condition nécessaire à l'entrée des monocytes. En effet, l'utilisation de modèle de parabiose (greffe siamoise permettant d'étudier leurs échanges physiologiques par voie sanguine) en absence d'irradiation d'un des animaux indique que les cellules de l'autre animal ne contribuent pas à renouveler le stock de microglies résidentes dans le système nerveux central de l'animal avec lequel il est en contact (Ajami et al., 2007). Les travaux de Priller confirment cette théorie en montrant que 90% cellules microgliales, après une transplantation de moelle osseuse, ont pour origine l'hôte et non le donneur. Ces résultats indiquent que les cellules microgliales adultes sont maintenues par des précurseurs locaux présents dans le cerveau avant la naissance (Priller et al., 2001). Cependant, lors de cas particuliers, comme la transplantation de moelle osseuse sur des souris déficientes en microglie (les souris PU.1^{-/-}), les précurseurs provenant de la moelle osseuse peuplent le système nerveux central dépourvu de microglie pendant la période périnatale (Beers et al., 2006).

En conclusion, la population microgliale en conditions physiologiques est capable de se maintenir par un renouvellement local indépendamment d'un recrutement des monocytes de la circulation sanguine. De plus, les précurseurs de la microglie adulte sont présents dans le cerveau avant la naissance excluant une contribution de progéniteurs post-nataux provenant de la moelle osseuse.

3. Origine mésodermale de la microglie

De nombreuses études ont démontré que les cellules microgliales ont une origine mésodermale. Cuadros et collaborateurs suggèrent que les cellules microgliales proviennent des macrophages primitifs du sac vitellin (Cuadros et al., 1993). Chez la souris, l'hématopoïèse primitive se déroule dans le sac vitellin vers E7 et contribue à la production des érythrocytes et des macrophages. L'hématopoïèse primitive décroît au cours du temps et elle est progressivement remplacée par l'hématopoïèse définitive qui se déroule dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) à E10.5. Ces cellules migrent ensuite dans le foie fœtal et la moelle osseuse pour y produire toutes les cellules hématopoïétiques d'E11.5 à la naissance (Figure 1).

Il a été observé que les macrophages primitifs apparaissent dans les îlots sanguins du sac vitellin et se propagent via le sang dès que le système de circulation sanguine ait été mis en place (vers E8-E10). L'observation des embryons de souris *Ncx-1^{-/-}* a permis de démontrer qu'une circulation sanguine fonctionnelle est nécessaire à la migration des macrophages. En effet, une absence de progéniteurs microgliaux a été observé chez ces embryons présentant un défaut d'échangeur calcium/sodium qui engendre une absence de pulsation cardiaque (Ginhoux et al., 2010). Cependant, ce défaut n'affecte pas l'hématopoïèse dans le sac vitellin car ces embryons ont un nombre de macrophages similaires à celui des contrôles. Ainsi, les macrophages primaires colonisent différents tissus tels que le SNC en développement et se différencient en « macrophages fœtaux » via une voie non-monocytaire (Takahashi et al., 1996).

L'hypothèse que la microglie dérive des cellules du sac vitellin fut confortée par Pessac et son équipe qui démontrèrent que des précurseurs de cellules microgliales, caractérisés par l'expression de marqueurs comme F4/80 et CD11b, sont détectables premièrement dans le sac vitellin et par la suite dans le cerveau à E8 (Alliot et al., 1999).

L'utilisation de modèles animaux permettant de suivre le devenir des cellules à montré que ce sont les macrophages du sac vitellin qui contribuent à former les cellules microgliales présentes chez l'adulte. Samokhvalov et son équipe a mis au point une souris exprimant une recombinaise Cre inducible par une injection de tamoxifène sous le promoteur de Runx1 (Runx-related transcription factor 1), un facteur de transcription impliqué dans le développement de toutes les lignées hématopoïétiques, (Samokhvalov et al., 2007) que l'on croise avec une souris ROSA26-stop-EYFP ou une souris ROSA26-stop-LacZ afin de suivre le devenir des cellules. L'expression de Runx1 est restreinte aux îlots sanguins du sac vitellin avant E8, alors qu'après E8 ce facteur est exprimé par les précurseurs de l'hématopoïèse définitive. L'injection de tamoxifène à E7.5 marque 30% des macrophages du sac vitellin (due à une efficacité de recombinaison partielle) et permet de suivre à long terme le devenir des cellules du sac vitellin nées à cette période. L'analyse de ces souris à différents âges développementaux révèle que 30% du marquage du sac vitellin est associé à un marquage de 30% des microglies à E10 et E13 et à un marquage de 30% des cellules microgliales

d'animaux de 6 semaines alors qu'aucun monocyte ou leucocyte ne sont marqués (Ginhoux et al., 2010). Les pourcentages de recombinaison étant similaires entre les macrophages du sac vitellin et la microglie adulte marqués, il est peu probable qu'une contribution ultérieure par des précurseurs non-marqués apparaisse au cours du développement. Lors de cette étude, il a été observé que les macrophages primitifs dérivant du sac vitellin migrent dans tout l'embryon lors de l'établissement de la circulation sanguine entre le sac vitellin et l'embryon. Ainsi, après une induction de la Cre recombinase à E7.5 des macrophages primitifs peuvent être détectés dans tout l'embryon à E10.5 et E13.5. Mais avec le temps, ces macrophages disparaissent et ils ne persistent que dans le cerveau adulte. L'expression de signaux spécifiques au sein du SNC permettraient le maintien de ces progéniteurs et/ou à l'arrêt du recrutement de ces cellules au cours du développement. Si l'injection de tamoxifène est effectuée entre E8.5 et E10.5 soit à une période où Runx1 est exprimé par les précurseurs de l'hématopoïèse tardive, on observe de forts pourcentages de recombinaison au niveau des monocytes et des macrophages pulmonaires et quasiment pas de marquage des cellules microgliales. Ces résultats montrent que la microglie adulte ne dérive pas de progéniteurs de l'hématopoïèse définitive mais exclusivement de progéniteurs de l'hématopoïèse primitive du sac vitellin.

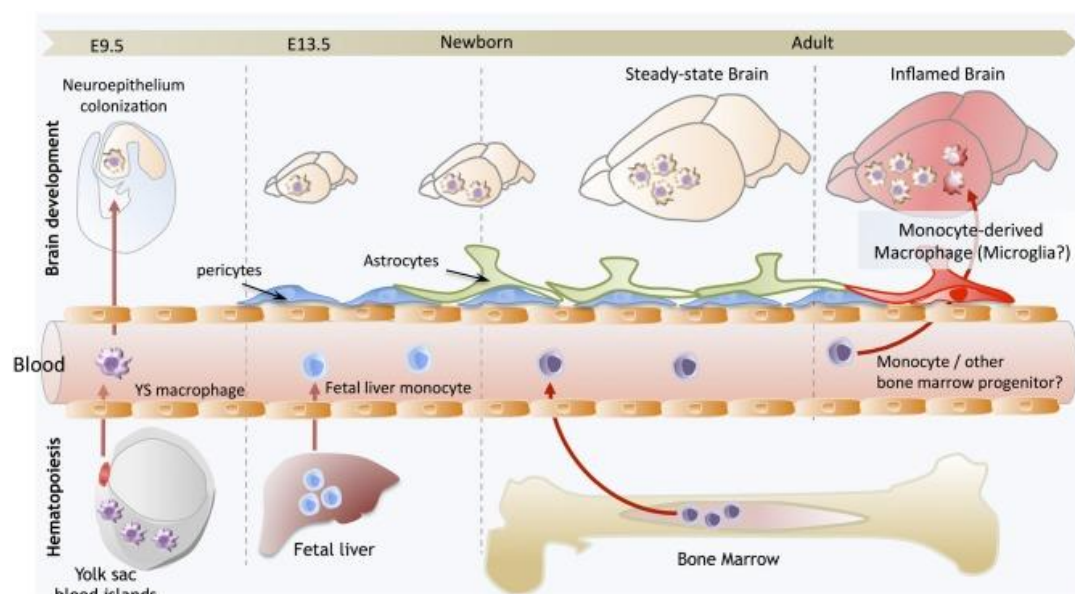


Figure 1: Développement cérébral et hématopoïèse

(Ginhoux et al, 2013)

Les macrophages primitifs sortent du sac vitellin à E9.5 et colonisent le neuroépithélium. A E13.5, la barrière hémato-encéphalique se met en place et isole le cerveau des macrophages tardifs provenant du

foie fœtal. La microglie embryonnaire se développe et colonise entièrement le cerveau jusque chez l'adulte. On note qu'en conditions physiologiques, les cellules microgliales présentes dans le cerveau adulte dérivent toutes du sac vitellin embryonnaire. En revanche, en conditions pathologiques inflammatoires chez l'adulte, des monocytes ou des progéniteurs de la moelle osseuse peuvent être recruté dans le cerveau et s'ajouter à la population de cellules microgliales déjà présentes.

Une autre étude souligne les différences entre l'hématopoïèse primitive et définitive en montrant que l'hématopoïèse définitive nécessite l'expression du facteur de transcription Myb alors que les macrophages dérivant du sac vitellin sont Myb-indépendants (Schulz et al., 2012). Récemment, des chercheurs ont caractérisé l'expression de marqueurs spécifiques aux précurseurs et aux cellules microgliales embryonnaires (Kierdorf et al., 2013) (Figure 2). Ils ont identifié les cellules CD45⁻ c-kit⁺ présentes à E8 dans le sac vitellin comme étant les seules à donner naissance aux précurseurs microgliaux caractérisés par l'expression de CX3CR1, CD45 et F4/80 et se localisant dans le mésenchyme entourant le tube neural à E9. Lors de leur étude, ils ont également démontré que la survie et le développement des précurseurs étaient dépendants de l'expression des facteurs de transcription Pu.1 et Irf8. Ensuite, à partir d'E9.5, ces précurseurs amiboïdes commencent à coloniser le tube neural et présentent une morphologie typique des cellules microgliales vers E14. Au cours de la migration et de la maturation des macrophages, l'expression de nombreux gènes est régulée (facteurs de croissance, marqueurs d'activation, interleukines, chimiokines, récepteurs des chimiokines,...) modulant l'acquisition progressive du phénotype microgliale. Cette étude indique également que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) 8 et 9 sont importantes aux remodelages de la matrice extracellulaire permettant l'expansion microgliale lors de l'embryogénèse.

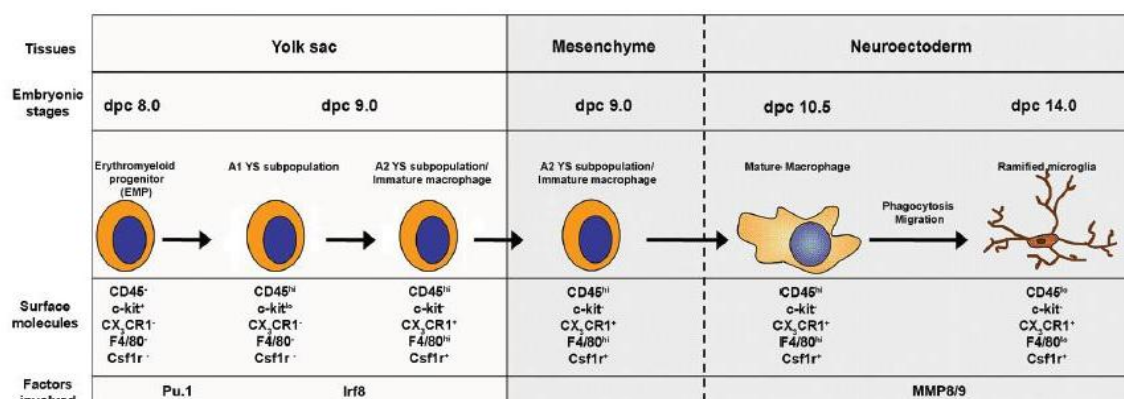


Figure 2: Schéma des différentes étapes de différenciation de la microglie au cours du développement embryonnaire
(Kierdorf et al., 2013)

II. Entrée, dispersion et différenciation des cellules microgliales

1. Entrée des cellules microgliales

Comme évoqué dans la partie précédente, les cellules microgliales dérivant du sac vitellin atteignent le parenchyme cérébral grâce à la circulation sanguine (Ginhoux et al., 2010). Ces cellules se concentrent ensuite au niveau de 3 sites spécifiques dans le cerveau embryonnaire auxquels Pio del Rio-Hortega fait référence comme « fontaines de microglies » : une région proche du troisième ventricule, la pie-mère couvrant le pédoncule cérébral et une région proche du quatrième ventricule. Les précurseurs des cellules microgliales envahissent donc le cerveau en utilisant plusieurs voies d'entrée. La première serait les méninges, en traversant la surface piale à des endroits particuliers. La seconde voie d'entrée serait les ventricules en se faufilant entre les cellules neuro-épithéliales qui les délimitent. Il est important de noter que l'entrée de ces précurseurs est facilitée par une barrière hémato-encéphalique inachevée. De plus, les cellules microgliales migrent selon un patron spatial et temporel spécifique de leur voie d'entrée (Verney et al., 2010).

2. Dispersion des cellules microgliales

Une fois que les précurseurs des cellules microgliales ont atteint le parenchyme cérébral, ils colonisent le SNC par deux mécanismes : migration à partir des fontaines jusqu'à leur destination finale et prolifération.

a. Colonisation du SNC par migration tangentielle et radiale

La colonisation du SNC par migration par les cellules en provenance des ventricules s'effectue en deux phases. La première phase correspond à une migration tangentielle pendant laquelle les cellules amiboïdes migrent parallèlement à la surface du SNC pour se répartir en une couche plus ou moins uniforme dans toutes les régions du SNC. Des études ont montré que les cellules microgliales amiboïdes migrent le long des pieds des cellules de la glie radiaire et des faisceaux axonaux dans la rétine, le tectum optique, le cortex et le cervelet. Les cellules microgliales adoptent un mouvement

locomoteur similaire à celui des fibroblastes en culture qui comprend une extension polarisée au niveau du front de migration, une translocation de la cellule et une rétractation de la queue de la cellule (pour revue (Navascués et al., 2000)). Leur migration pourrait être guidée par la présence de gradient de molécules de guidage comme les sémaphorines et les nétrines mais également par l'expression de chimiokines comme MCP1 et MIP-1alpha. Lors de cette phase, les cellules microgliales s'accumulent dans la zone intermédiaire du cortex en développement. On peut noter que les cellules microgliales se regroupent à certains endroits pour former des amas dans ou proche des faisceaux d'axones présents dans la matière blanche en développement. Ces amas de cellules sont des structures transitoires spécifiques au cerveau en développement et seraient des « sites d'attente » pour les cellules gliales ayant pénétré le cerveau et allant coloniser le parenchyme. Cette localisation particulière suggère un rôle dans l'élimination d'axones inappropriés, la promotion de la pousse neuroaxonale et le guidage des axones.

Lors de la seconde phase, les cellules microgliales changent de direction et migrent perpendiculairement à la surface du SNC pour accéder aux différentes couches du SNC. Cette seconde phase est celle de la migration radiale (pour revue (Navascués et al., 2000)). Lors de cette migration, les cellules microgliales migrent vers la couche du plateau sous-cortical dans le cortex en développement. Cette couche contient des neurones matures et reçoit les premières connections afférentes entrant dans le cortex dont les afférences thalamocorticales. Les cellules microgliales s'accumulent aux sites de formation des premières synapses à la jonction du sous-plateau/plateau cortical et elles seraient capable d'induire l'apoptose des neurones engagés dans la synaptogénèse, comme observé dans le cervelet du rat (Marín-Teva et al., 2004). Cependant, la microglie serait aussi capable de phagocyter les débris associés à l'apoptose développementale. Puis, les cellules microgliales envahissent le plateau cortical et cette invasion se poursuit jusqu'à la deuxième semaine post-natale où les cellules microgliales atteignent leur destination finale. Cette migration radiale des cellules microgliales serait médiée par des interactions avec les vaisseaux sanguins et les glies radiales. En effet, au cours du développement embryonnaire, la colonisation du cerveau par la microglie coïncide avec la vascularisation du SNC (~E10 chez les rongeurs) et une étroite communication entre

les cellules microgliales et les pousses vasculaires serait impliquée dans la migration microgliale. De plus, il semblerait que les cellules microgliales stimulent la croissance des vaisseaux en développement via la sécrétion de facteurs solubles (Rymo et al., 2011). Par conséquent, les animaux présentant peu ou pas de cellules microgliales (exemple : PU.1-/-, déplétion par des liposomes clodronates,...) ont un réseau vasculaire peu développé. Ainsi, la microglie et les vaisseaux influencent leur développement de façon réciproque. Par ailleurs, la libération de facteurs attractifs par des neurones en apoptose pourrait servir de signaux déclenchant la migration des cellules microgliales. Cette hypothèse est confortée par la coïncidence chronologique entre l'apoptose neuronale et l'entrée des cellules microgliales dans le parenchyme cérébral.

b. Prolifération des cellules microgliales amiboïdes

La densité des cellules microgliales dans le cerveau augmente également via la prolifération. Cette activité prolifératrice des cellules microgliales amiboïdes au cours du développement a été observée dans de nombreuses structures dont le corps calleux de rats développement post-natal (Imamoto and Leblond, 1978), la rétine embryonnaire du poulet (Marín-Teva et al., 1999), l'hippocampe et le cortex de rats embryonnaires et post-nataux (Dalmau et al., 1997), ainsi que dans la matière blanche de la moelle osseuse en développement de souris (Vela Hernández et al., 1997). Les cellules microgliales amiboïdes en migration sont hautement proliférative et elles entrent dans des cycles alternés de migration/mitose. Marín-Teva et collaborateurs ont montré que l'index mitotique des cellules microgliales amiboïdes migrant tangentiellement dans la rétine en développement est très haut durant cette phase et qu'il décroît progressivement au cours du développement (Marín-Teva et al., 1999). La prolifération de la microglie amiboïde pourrait être contrôlée par la présence d'une variété de facteurs connus pour moduler cette activité tels que GM-CSF, CSF-1, NT-3, IL-4 et IL-5. Cependant, le taux de prolifération diminue au cours du développement et il est très bas lorsque les cellules se différencient ce qui est en accord avec le très faible taux de prolifération de la microglie mature. Cette activité prolifératrice contribue à l'augmentation du nombre de cellules microgliales et à la dispersion des précurseurs microgliaux à travers le SNC en développement.

3. Différentiation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié

Après avoir envahi le parenchyme cérébral et avoir atteint leur emplacement définitif, les cellules microgliales amiboïdes se transforment et adoptent un phénotype ramifié caractéristique des cellules microgliales matures. Les mécanismes dirigeant la conversion de ces cellules vers un phénotype mature sont encore peu connus. Néanmoins, des études de cultures cellulaires apportent quelques indices sur les éléments facilitant cette transformation. Des cellules microgliales mises en culture sur une monocouche d'astrocytes développent des prolongements après 5-7 jours dont l'élongation et le branchement se poursuivront pendant plusieurs jours créant un territoire bien défini autour du soma de la cellule (Sievers et al., 1994). De plus, lorsque les cellules microgliales sont cultivées dans un compartiment physiquement indépendant de celui des astrocytes mais exposé au milieu conditionné par les astrocytes, on observe une ramification des cellules microgliales. Ces résultats suggèrent que des facteurs astrocytaires participent aux changements morphologiques opérés par la microglie. Par ailleurs, les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales varient selon leur phénotype. Ainsi, l'expression des canaux microgliaux est modifiée lorsque la microglie se ramifie et ces changements de propriétés sont également influencés par les facteurs astrocytaires (Schmidt Mayer et al., 1994). Par conséquent, l'acquisition d'un phénotype ramifié et mature est largement déterminée par la libération de facteurs des cellules composant le milieu proche des cellules microgliales telles que les astrocytes. La ramification des cellules microgliales en réponse aux molécules libérées par les astrocytes peut être médiée par des purines (ATP ou adénosine) (Wollmer et al., 2001) combinées à des cytokines (TGFβ, M-CSF et GM-CSF) (Schilling et al., 2001).

En conclusion, les cellules microgliales pénètrent le parenchyme cérébral via les méninges et les ventricules et s'accumulent au niveau des « fontaines ». Puis, les cellules microgliales se dispersent dans le cerveau via deux mécanismes : migration et prolifération. Finalement, lorsque les cellules ont atteint leur destination finale, elles se différencient pour acquérir un phénotype mature adapté à leurs fonctions dans le cerveau adulte.

III. Description des cellules microgliales en conditions physiologiques et pathologiques chez l'adulte

Les cellules microgliales ont été initialement considérées comme des cellules immunitaires dormantes qui s'activent seulement en réponse à des événements pathologiques dans le cerveau adulte (pour revue (Kreutzberg, 1996)). Cependant, il est maintenant admis que les cellules microgliales adultes sont des cellules hautement dynamiques jouant d'importants rôles dans la maintenance de l'homéostasie du cerveau. De plus, l'émergence d'études portées sur la physiologie microgliale permet de mieux caractériser son phénotype et ses propriétés fonctionnelles en fonction de son état d'activation.

L'activation des cellules microgliales est un processus cellulaire modifiant rapidement les propriétés microgliales lors de changements dans leur environnement (lésion, changement de concentration des composants du milieu extracellulaire, entrée de pathogènes...). Cette réponse se caractérise généralement par un changement morphologique (rétraction des prolongements les plus fins, augmentation de la taille du soma), l'expression de nouvelles protéines, la sécrétion de facteurs pro- et anti-inflammatoires, une prolifération, éventuellement la migration des cellules aux sites lésés, et une activité de phagocytose pour éliminer des débris cellulaires par. Une nomenclature des formes d'activation microgliale a été proposé en se basant sur celle existante pour les macrophages périphériques : activation classique ou de type M1 et activation alternative ou de type M2 (Figure 3) (Mantovani et al., 2002). Ces notions d'activation classique et alternative seront définies plus en détails dans la partie V.2 de l'introduction.

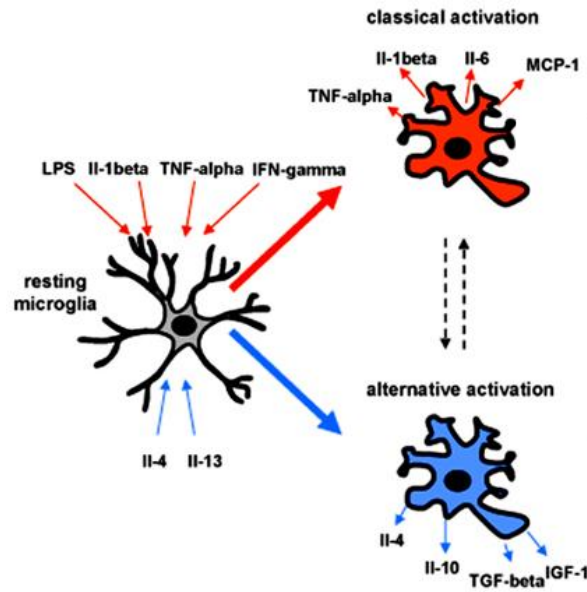


Figure 3: Schéma représentant l'activation classique et alternative des cellules microgliales (Belarbi and Rosi, 2013)

L'activation classique (M1) (en rouge) est considérée comme neurotoxique. Elle se caractérise par la libération de plusieurs molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques telles que des ROS, NO, TNFalpha, IL-6, IL-1beta, IL-12, MCP-1. L'activation classique peut être déclenchée expérimentalement en exposant les cellules microgliales au LPS, IFN-gamma, TNF-alpha et IL-1beta. Au contraire, l'activation alternative (M2) (en bleue) est neuroprotectrice. Elle se caractérise par une augmentation de l'expression de molécules anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-10, TGF-beta, CD200, IGF-1, NGF et BDNF. Cette activation alternative peut être induite lors d'exposition aux cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13.

Il est important de noter que le processus d'activation n'est pas un processus « tout ou rien » et qu'il n'existe sans doute pas que deux formes d'activation mais une multitude permettant une réponse adaptée au contexte pathologique (pour revue (Kettenmann et al., 2011))(Figure 4). Les activations classique et alternative pourraient être considérées comme des formes d'activation extrêmes et un continuum d'état fonctionnel existerait entre les phénotypes M1 et M2 révélant la multiplicité de l'activation microgliale.

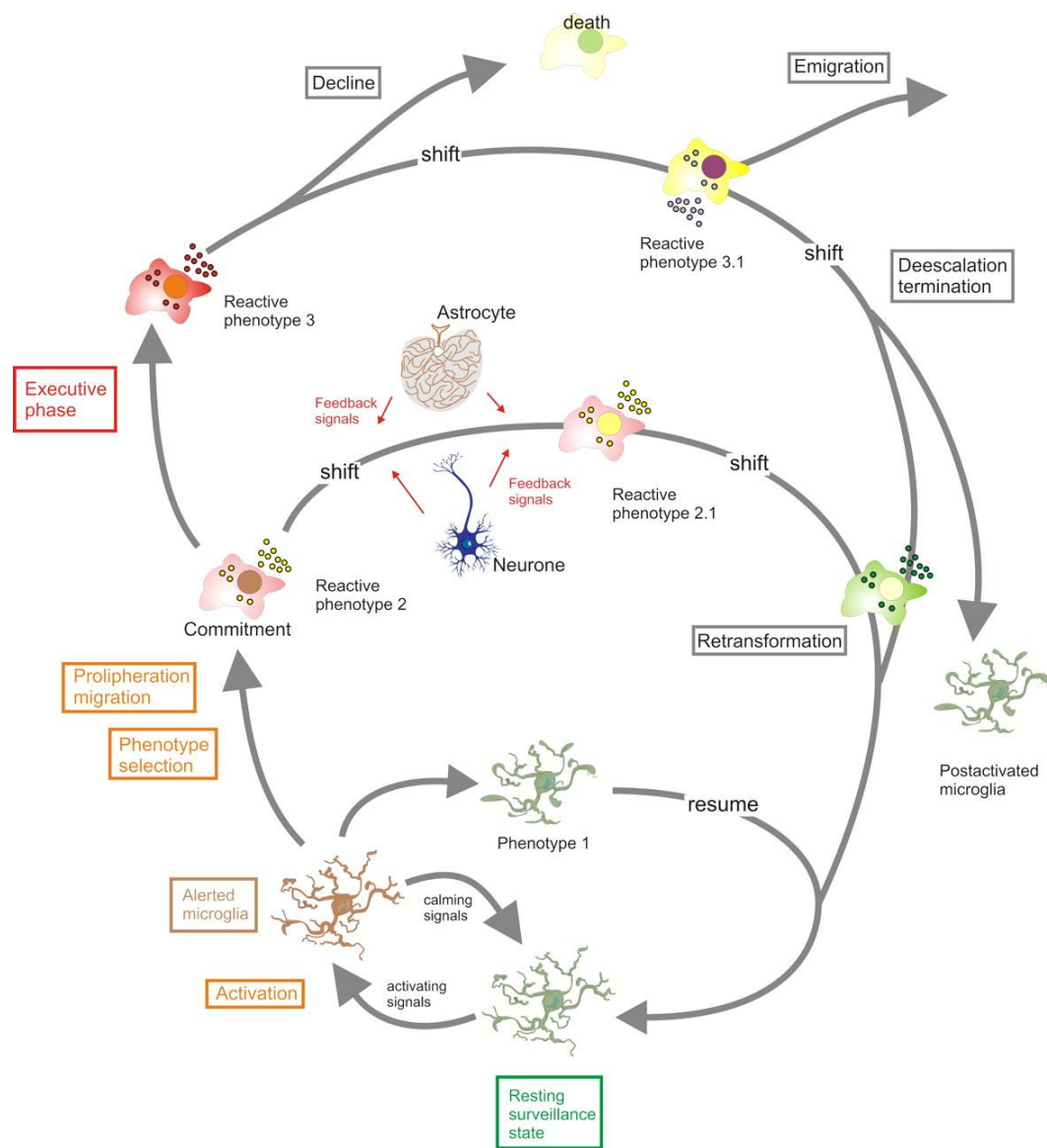


Figure 4: Différentes formes d'activation des cellules microgliales

(Hanisch and Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011)

Les cellules microgliales en conditions physiologiques surveillent activement et constamment leur environnement. Lorsqu'un signal de danger apparaît, les cellules microgliales passent d'un état de surveillance à un état d'alerte. Puis, les cellules microgliales développent différentes formes d'activation selon le contexte et l'élément déclenchant leur activation (sur le schéma, on note phenotype 1, 2 et 3).

1. Morphologie et identification immunohistochimique des microglies adultes

a. Identification des profils immunohistochimiques des cellules microgliales

L'identification des cellules microgliales a été facilitée par le développement de procédures de marquage révélant l'expression de certaines molécules dans des types cellulaires spécifiques. Ces

techniques permettent de distinguer la microglie des autres types cellulaires présents dans le cerveau comme les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales. La microglie peut être visualisée dans des tranches de cerveaux humaines et animales ainsi qu'en culture par une variété de molécules membranaires et cytoplasmiques. Les cellules microgliales peuvent être identifiées par immunohistochimie grâce à des lectines telles que *Griffonia simplicifolia* isolectine B4 (IB4) ou la *Lycopersicon esculentum* (tomato) lectine. Ces lectines sont des carbohydrates présentes à la surface des cellules microgliales dont la fonction précise n'est pas encore connue. L'inconvénient majeur de l'utilisation des lectines est qu'elles marquent aussi les vaisseaux sanguins, néanmoins la reconnaissance des cellules microgliales et des vaisseaux sanguins est possible par un critère morphologique. Ces marqueurs (IB4 et tomato lectin) permettent d'identifier les cellules microgliales et leur niveau d'expression ne varie pas en fonction de l'état d'activation microgliale. L'anticorps dirigé contre Iba1 (ionized calcium-binding adaptator molecule 1), une protéine jouant un rôle dans l'homéostasie calcique, a révolutionné l'étude immunohistochimique des cellules microgliales (Imai et al., 1996). En effet, le marquage Iba1 est spécifique des cellules microgliales dans le SNC et permet de visualiser en détails les cellules.

Récemment, la génération d'animaux génétiquement modifiés exprimant des protéines fluorescentes sous le contrôle du promoteur de facteurs exprimés spécifiquement par la microglie ou les macrophages a permis de créer des souris transgéniques ayant des microglies fluorescentes. Une lignée de souris transgéniques exprimant l'eGFP sous le promoteur du récepteur à la fractalkine (CX3CR1) permet d'identifier par fluorescence les cellules microgliales (Jung et al., 2000). De plus, il existe également une autre lignée de souris transgéniques qui exprime l'eGFP sous le contrôle du promoteur d'Iba1 (Hirasawa et al., 2005). Ces animaux transgéniques permettent d'identifier facilement et spécifiquement les cellules microgliales quelque soit leur état d'activation et procurent des outils pour étudier *in vivo* les fonctions des cellules microgliales. Toutefois, en conditions pathologiques, des monocytes et des cellules dendritiques exprimant également CX3CR1 et Iba1, et donc l'eGFP, peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral. Ainsi, il faut rester vigilant aux

observations faites sur ces souris et contrôler via d'autres outils l'identité des cellules observées lors de ces conditions pathologiques.

Les changements phénotypiques microgliaux s'opérant lors de processus d'activation s'accompagnent généralement de changements d'expression de marqueurs immunohistochimiques qui dépendent de l'état d'activation des cellules microgliales. En effet, les différents états fonctionnels de la microglie sont caractérisés par différents profils immunohistochimiques. De plus, les changements d'expression de marqueurs révèlent des modifications fonctionnelles dépendantes du contexte.

Par exemple, il a été montré que l'expression d'Iba1 était amplifiée lors de conditions pathologiques (Ito et al., 2001) et cette protéine pourrait jouer un rôle dans la migration cellulaire et l'activité phagocytaire des cellules microgliales. De plus, CD11b (aussi nommé Mac-1), une intégrine pouvant lier le complément C3b et des protéines de la matrice extracellulaire et interagissant avec des protéines intracellulaires d'adhésion a aussi une expression augmentée lors de l'activation microgliale (Roy et al., 2008). En effet, l'expression microgliale de CD11b augmente lors de maladies neurodégénératives du SNC et il y aurait une augmentation des interactions CD11b/protéines du cytosquelette facilitant la transformation morphologique vers une forme amiboïde. De même, l'expression de CD68 (aussi nommé macrosialin ou ED1), une protéine lysosomale spécifique des macrophages appartenant à la famille des LAMP (lysosomal-associated membrane protein) et associée à l'activité phagocytaire des cellules a également une expression amplifiée lors de l'activation microgliale. Cette expression accrue de CD68 révèle une capacité phagocytaire augmentée. En addition, l'antigène F4/80 (aussi nommé EMR1 ou Ly71) est un membre de la famille des facteurs de croissance épidermiques à 7 domaines transmembranaires spécifique des macrophages dont l'expression est également accrue en cas d'activation (Lund et al., 2006). Ainsi, les marqueurs immunohistochimiques Iba1, CD11b, CD68 et F4/80 ont une expression de base dans la microglie non-activée et le niveau d'expression de ceux-ci augmente lorsque la microglie entre dans un processus d'activation, mais bien évidemment cette liste des marqueurs dont l'expression suit la même évolution est non-exhaustive.

En revanche, certains marqueurs immunohistochimiques peuvent apparaître lors de l'activation microgliale. Par exemple, l'expression de MHCII (major complex histocompatibility class II) est déclenchée lors de l'activation microgliale afin qu'elles se transforment en cellules présentatrices d'antigènes efficaces et qu'elles interagissent avec les cellules T CD4 (Perry, 1998). De même, l'expression de Mac-2 (aussi nommé galectin-3) apparaît lors d'activation microgliale et l'apparition de ce marqueur révélerait des microglies en prolifération (Lalancette-Hébert et al., 2012) et/ou entrain de phagocyter (Rotshenker, 2009). De plus, l'expression de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) est également provoquée dans la microglie activée et favorise la production neurotoxique de NO (Ding et al., 1997). Ainsi, certains marqueurs immunohistochimiques ont une expression de type « tout ou rien » et ne sont exprimés que lors d'activation microgliale comme, par exemple, MHCII, Mac-2 et iNOS.

En conclusion, le profil immunohistochimique adopté par les cellules microgliales dépend du contexte physiopathologique dans lequel elles se situent et correspond probablement aux différentes fonctions de ces cellules. De plus, certains marqueurs sont exprimés en conditions physiologiques par la microglie et leur expression est régulée lors d'activation alors que d'autres ne sont exprimés que lorsque la microglie est activée.

b. Morphologie

Les cellules microgliales dans le SNC sain et mature sont caractérisées par un corps cellulaire de petite taille à partir duquel de longs et fins prolongements se déploient dans le parenchyme (Figure 5). Ces prolongements microgliaux forment une arborisation distale typique des cellules microgliales ramifiées. Pendant plusieurs années, ces cellules microgliales ramifiées ont été considérées comme des cellules quiescentes en attente de signaux de danger pour s'activer mais le développement de nouvelles techniques a démontré que ces cellules n'étaient pas aussi calmes que cela. En effet, l'étude par microscopie bi-photonique de souris transgéniques adultes dans lesquelles seules les cellules microgliales expriment la GFP a permis d'observer leur comportement de façon non-invasive (Nimmerjahn et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont montré que les prolongements des cellules

microgliales bougent continuellement alors que leur corps cellulaire reste fixe. Ainsi, les prolongements microgliaux s'étendent et se rétractent rapidement (environ 1.47 $\mu\text{m}/\text{min}$) ce qui permet aux cellules microgliales de balayer et de surveiller sans cesse le parenchyme. Par conséquent, ces mouvements dynamiques permettent le balayage et le contrôle de tout le parenchyme toutes les quelques heures et facilitent le déclenchement de réactions rapides lors de détection de changements dans le parenchyme.

En revanche, lors de conditions pathologiques, les cellules microgliales s'activent et changent de morphologies. La microglie réduit la complexité de leur forme en rétractant leurs prolongements (Figure 5). Ces derniers sont alors réabsorbés dans le corps cellulaire ce qui induit une augmentation de la taille du soma. Les cellules microgliales sont alors moins ramifiées voir amiboïdes. Plusieurs morphologies de cellules microgliales activées existent et elles rendent compte de la réponse adaptée au contexte pathologique. Ces remarquables transformations morphologiques suggèrent des ajustements fonctionnels : la microglie adoptera une morphologie particulière selon l'activité requise (migration, phagocytose,...). Toutefois, la morphologie ne reflète pas toujours une orientation fonctionnelle car certaines fonctions microgliales ne nécessitent pas de changements morphologiques massifs comme la phagocytose (Sierra et al., 2010) ou la libération de facteurs. Ainsi, la morphologie microgliale seule ne permet pas de définir l'état fonctionnel de la microglie.

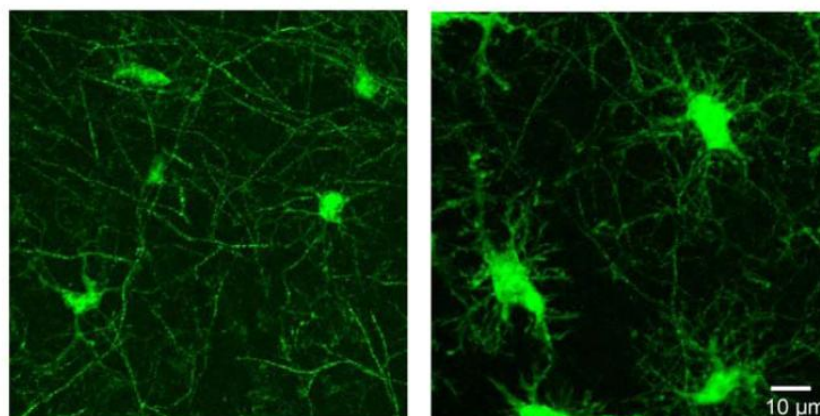


Figure 5: Morphologie des cellules microgliales

(Menteyne et al., 2009)

Gauche : Exemple de cellules microgliales ramifiées présentes dans la région de CA1 de l'hippocampe en conditions contrôles. On note que les cellules microgliales présentent un petit soma duquel s'étendent de longs prolongements ramifiés.

Droite : Exemple de cellules microgliales activées dans la région de CA1 de l'hippocampe en conditions pathologiques (ici, 48h après l'induction d'un Status Epilepticus). On remarque que les cellules microgliales se caractérisent par un large soma et de courts prolongements.

2. Le profil électrophysiologique des cellules microgliales

a. Les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales en conditions physiologiques chez l'adulte

La plupart des études portant sur les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales ont été réalisées sur des cultures cellulaires de microglies ou des lignées cellulaires (exemple : la lignée BV-2). Lors de ces études, les auteurs ont montré que les cellules microgliales pouvaient exprimer des canaux ioniques conduisant les ions K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , ou Cl^- (cf Tableau 1 adapté des revues (Eder, 1998; Kettenmann et al., 2011)).

Tableau 1 : Canaux ioniques exprimés par la microglie

Channel Type	Species (Preparation)
Inward rectifier K^+ channel (~30 pS)	Rat (culture); mouse (culture, slice , BV-2 cell line); bovine (culture); human (culture)
HERG-like K^+ channel	Rat (MLS-9 cell line)
Delayed rectifier K^+ channel	Rat (culture, slice); mouse (culture, slice); human (culture)
Voltage-dependent Ca^{2+}-activated K^+ channel (>200 pS)	Bovine (culture); human (culture) ; rat (culture); mouse (culture, organotypic slice)
Voltage-independent Ca^{2+}-activated K^+ channel	Mouse (culture+ACM)
G protein-activated K^+ channel	Mouse (culture)
H^+ channel	Mouse (culture, BV-2 and MLS-9 cell line); rat (culture, cell line GMI-R1); human (culture)
Na^+ channel	Rat (culture, coculture with astrocytes); human (culture)
Voltage-activated Ca^{2+} channel	Rat (culture)
Ca^{2+}-release activated Ca^{2+} channel	Rat (culture)
Voltage-dependent Cl^- channel (280–325 pS)	Bovine (culture); human (culture)
Voltage-independent stretch-activated Cl^- channel	Rat (culture); mouse (culture, culture+ACM)

Cependant, les cellules microgliales en culture ou lignée cellulaire présentent un phénotype altéré qui ne correspond pas à celui des cellules microgliales ramifiées *in vivo* dans le cerveau sain car la mise en culture de ces cellules les place dans un pseudo-état d'activation (morphologie amiboïde, prolifération, libération de molécules pro-inflammatoires...). Par conséquent, l'étude des propriétés des cellules microgliales dans ces conditions n'est pas pertinente car les fonctions de ces cellules sont modifiées. Pour ces raisons, je ne développerai pas les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales étudiées en culture ou dans des lignées cellulaires.

Néanmoins, quelques enregistrements de cellules microgliales ont été réalisés *in situ* dans des tranches aiguës de cerveaux maintenues dans une solution mimant le milieu extracellulaire (un liquide céphalorachidien artificiel). Les cellules microgliales ont été identifiées par des marquages tomato lectine couplée à un fluorochrome dans des animaux sauvages (Boucsein et al., 2000; Schilling and Eder, 2007) ou via l'expression de protéine fluorescente sous un promoteur spécifique de la microglie dans des animaux transgéniques (Avignone et al., 2008; Rigato et al., 2012). Les cellules microgliales dans les tranches aiguës de cerveaux conservent leur morphologie ramifiée et maintiennent leurs propriétés physiologiques.

Ces cellules non-excitables sont caractérisées par une forte résistance d'entrée (R_{in} , input resistance), de plusieurs Gohms. De plus, les cellules microgliales ramifiées présentent une faible capacitance membranaire (C_m), un paramètre électrophysiologique reflétant la taille de la surface cellulaire. Par ailleurs, les cellules microgliales présentes dans des tranches de cerveaux adultes sains présentent peu de courants dépendant du potentiel. En effet, des enregistrements des courants membranaires microgliaux dans le cortex et le striatum montrent que ces cellules se caractérisent par de petits courants entrants activés par des sauts de potentiel négatif (V_m compris entre -90 et -140 mV) qui ne s'inactivent pas. Ces courants très sensibles au Ba^{2+} résulteraient de l'activation des canaux potassiques Kir2.1 (Schilling et al., 2000). Pour des potentiels de maintien supérieur à -90 mV, les cellules microgliales adultes en conditions physiologiques n'expriment pas d'autre conductance dépendante du potentiel. Ainsi, les courbes I/V des cellules microgliales présentes dans les cerveaux

sains se caractérisent par une rectification entrante au potentiel inférieur à -90 mV puis par une partie linéaire (Figure 6).

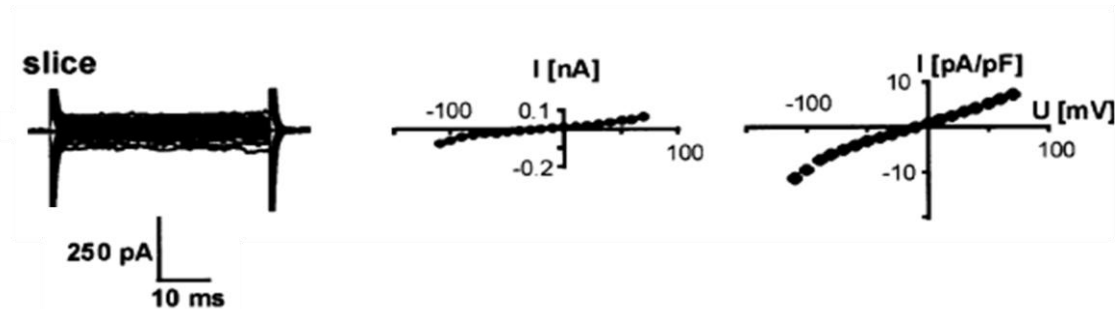


Figure 6: Courants membranaires typiques de cellules microgliales en tranches en conditions physiologiques
(Boucsein et al., 2000)

b. Les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales en conditions pathologiques chez l'adulte

Lors de conditions pathologiques, les cellules microgliales s'activent et leurs propriétés membranaires changent. Une séquence temporelle d'expression de courants entrants et de courants sortants a été observée dans des cellules microgliales activées après une lésion du nerf facial (Boucsein et al., 2000). En effet, 12h après une axotomie du nerf facial les conductances entrantes augmentent sans apparition de courants sortants. Puis, 24h après section du nerf, les cellules microgliales expriment de fortes conductances entrantes et sortantes. Trois jours après, les courants entrants et sortants sont réduits et 7 jours après lésion, l'amplitude des courants entrants et sortants est retournée au niveau de base. Les cellules microgliales pourraient donc rentrer dans des cycles d'activation/inactivation au cours de leur vie.

Il a été démontré que 48h après l'induction d'un *Status Epilepticus* (SE), la R_{in} des cellules microgliales diminue ce qui suggère un changement de la composition membranaire. De plus, la C_m des cellules augmente ce qui reflète un changement de la surface membranaire qui peut être corrélé à un changement de la taille de la cellule (Avignone et al., 2008). Dans ce modèle d'étude pathologique, les courants entrants observés en conditions physiologiques augmentent 24h après induction du SE et simultanément des courants sortants à rectification retardée apparaissent. Ensuite, 48h après induction

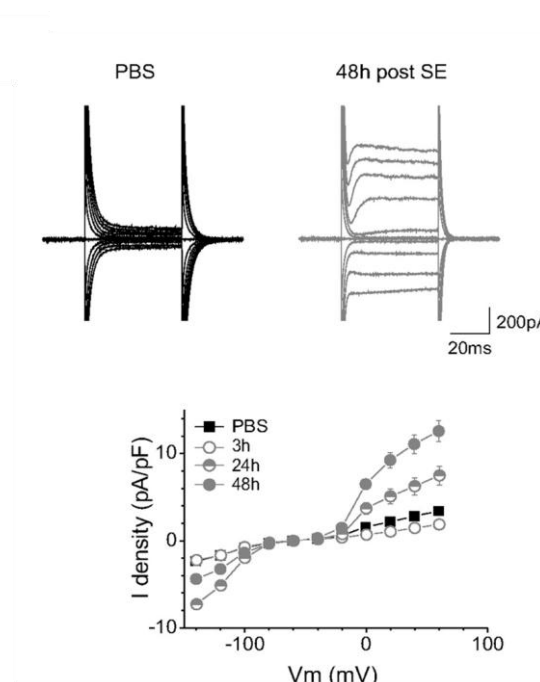
du SE, l'amplitude des courants entrants diminue alors que celle des courants sortants augmente fortement (Figure 7).

Figure 7: Evolution des propriétés électrophysiologiques de la microglie après un Status Epilepticus

(Avignone et al, 2008)

Haut : Exemple de réponses induites par des sauts de potentiel dans des cellules microgliales d'animaux contrôles (trace noire) et 48h après induction d'un SE (trace grise).

Bas : Courbes I/V obtenues dans des microglies enregistrées dans des animaux contrôles (carrés noirs) et après 3 (cercles blancs), 24 (cercles demi-noirs) et 48h (cercles noirs) après SE.



Ces résultats indiquent que les changements de propriétés membranaires des cellules microgliales activées par un SE suivent une séquence temporelle précise similaire à celle décrite dans le modèle de section du nerf facial. Des études des propriétés pharmacologiques et biophysiques des courants sortants révèlent que ces courants sont principalement médiés par des canaux potassiques homomériques Kv1.3 (Menteyne et al., 2009). Le rôle de cette sous-unité dans les microglies activées après SE n'est toujours pas connu mais elle pourrait être impliquée dans la prolifération et la mort neuronale via la production de radicaux libres et de superoxydes (Fordyce et al., 2005).

D'autres canaux potassiques voltage-dépendants sont exprimés par les cellules microgliales. En effet, des études de cultures cellulaires ou de lignées cellulaires laissent penser que les cellules microgliales peuvent potentiellement exprimer : des canaux homomériques Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6 et Kv3.1 ainsi que des canaux hétéromériques Kv1.3/Kv1.5. Ces canaux peuvent être identifiés par leurs propriétés pharmacologiques et biophysiques (cf table 1 de (Menteyne et al., 2009)). Cependant, il est possible que certains d'entre eux ne soient exprimés que dans des modèles de cultures ou de lignées cellulaires.

Kv1.1 est exprimé par la microglie dans des rats juvéniles ayant été soumis à l'hypoxie (Wu et al., 2009). Dans ces conditions de forte réponses inflammatoires, l'expression de Kv1.1 régulerait l'expression de TNFalpha, Il1beta, endothéline et oxyde nitrique. De façon analogue, l'expression de Kv1.2 est également augmentée dans des rats exposés à l'hypoxie et cette sous-unité modulerait l'expression de TNFalpha, IL1beta et des ROS (reactive oxygen species) (Li et al., 2008). On peut également noter une régulation de l'expression de ces sous-unités au cours du développement. En effet, Kv1.1 et Kv1.2 sont exprimés par la microglie amiboïde dans des stages précoces du développement post-natal, puis cette expression diminue fortement au cours du développement jusqu'à être quasiment indétectable chez l'adulte en conditions physiologiques. De plus, l'expression de Kv1.5 a été détectée par immunohistochimie dans des microglies activées *in vivo* par injection de LPS (lipopolysaccharide) au niveau du cortex (Jou et al., 1998). Cette sous-unité jouerait un rôle dans la prolifération des cellules microgliales lors de conditions pathologiques (Pannasch et al., 2006). A ce jour, aucune étude *in vivo* n'a permis de détecter l'expression des homomères Kv1.6 et Kv3.1 ni de l'hétéromère Kv1.3/Kv1.5. Par ailleurs, il est important de noter que le profil d'expression des sous-unités potassiques dépend du contexte dans lequel se développe la réponse microgiale. Par conséquent, les cellules microgliales expriment un patron particulier de canaux potassiques dépendant du potentiel suivant leur état d'activation.

D'après les études réalisées sur des cellules en culture, des tranches organotypiques et des lignées cellulaires, les cellules microgliales pourraient exprimer d'autres types de canaux ioniques tels que des canaux Na^+ , H^+ , Cl^- ou Ca^{2+} . Mais la présence de ces canaux dans des tranches aigües de cerveaux adulte n'a toujours pas été détectée et cela même dans des conditions pathologiques particulières.

IV. Les récepteurs microgliaux : éléments importants de la signalisation « on »/« off » et leurs implications dans la régulation des fonctions microgliales

De multiples signaux convergent vers les cellules microgliales pour maintenir ou au contraire modifier son état fonctionnel. Ces transitions d'un état de surveillance vers celui d'activation sont

déclenchées lorsque la microglie perçoit l'apparition soudaine de facteurs, des concentrations de molécules anormales, l'entrée de micro-organismes, etc. Les fonctions immunitaires des cellules microgliales sont contrôlées par deux classes de signaux appelés « on » et « off » (Biber et al., 2007). Les signaux « off » sont constitutivement exprimés dans le cerveau en conditions physiologiques et la disparition de ces signaux peut créer un signal d'alerte induisant une activation microgliale. Ainsi, les signaux « off » maintiennent les cellules microgliales dans un état non-activé. Au contraire, les signaux « on » sont produits lors de conditions anormales afin d'initier l'activation des cellules microgliales. La variété de récepteurs exprimée par les cellules microgliales permet de détecter ces changements d'environnement. Dans cette partie, j'aborderai les principales voies de communication intervenant dans cette signalisation « on »/« off » qui participent au dialogue entre les cellules microgliales et son environnement.

1. Récepteurs aux neurotransmetteurs

Les cellules microgliales expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, la noradrénaline, les purines et la dopamine qui peuvent modifier les propriétés fonctionnelles de ces cellules. L'expression de récepteurs aux neurotransmetteurs permet de formuler l'hypothèse que les cellules microgliales détectent l'activité neuronale via le niveau local de neurotransmetteur dans leur environnement. De plus, les changements de concentrations de neurotransmetteurs influenceraient les fonctions microgliales afin d'induire une réponse adaptée au contexte. En effet, il a été montré que des changements du niveau de transmetteurs apparaissant dans certaines maladies ou troubles neuronaux déclenchent une excitotoxicité et une activation microgliale.

a. Les récepteurs purinergiques

La signalisation purinergique est importante dans les interactions neurone/glie. En effet, lors de mort cellulaire associée à des dommages cérébraux, les neurones et les astrocytes libèrent massivement de l'ATP (adénosine triphosphate) qui agit comme un signal de danger lorsqu'il est détecté par les récepteurs purinergiques gliaux. L'ATP libéré par les cellules est rapidement dégradé par des ectonucléotidases extracellulaires en dérivés ATP tels que ADP (adénosine diphosphate),

AMP (adénosine monophosphate) et adénosine qui agissent également comme des signaux d'alerte. Les cellules microgliales expriment des récepteurs métabotropiques à l'adénosine P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), les récepteurs purinergiques ionotropiques P2X ($P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_7$) et les récepteurs métabotropiques P2Y ($P2Y_6$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$). De récentes études ont montré que les récepteurs purinergiques contrôlent des fonctions microgliales importantes telles que la phagocytose, la migration, la motilité, la libération de médiateurs... et ces fonctions sont plus ou moins développées selon l'état d'activation des cellules microgliales (Avignone et al., 2008; Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Koizumi et al., 2007; Tsuda et al., 2003). Ainsi, le niveau d'expression de ces récepteurs évolue avec les changements d'environnement et l'état d'activation des cellules microgliales. Par ailleurs, certains récepteurs seraient activés simultanément et auraient des effets synergiques alors que d'autres fonctionneraient de façon indépendante.

Les récepteurs P2Y₁₂

Les récepteurs métabotropiques P2Y₁₂ sont des récepteurs couplés aux protéines G_{i/o} connus pour inhiber l'adénylate cyclase et pour moduler l'activité des canaux ioniques.

L'étude par imagerie bi-photonique de cellules microgliales fluorescentes *in vivo* en conditions physiologiques a mis en évidence une motilité basale des prolongements microgliaux dépendante de l'ATP/ADP extracellulaire (Davalos et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont également montré que lors de lésions aiguës avec un laser, la microglie augmente sa motilité et étend ses prolongements vers le site de lésion (Figure 8). Ce mouvement dirigé et synchronisé des prolongements vers le site de lésion est dépend de l'expression du récepteur purinergique P2Y₁₂ (Haynes et al., 2006).

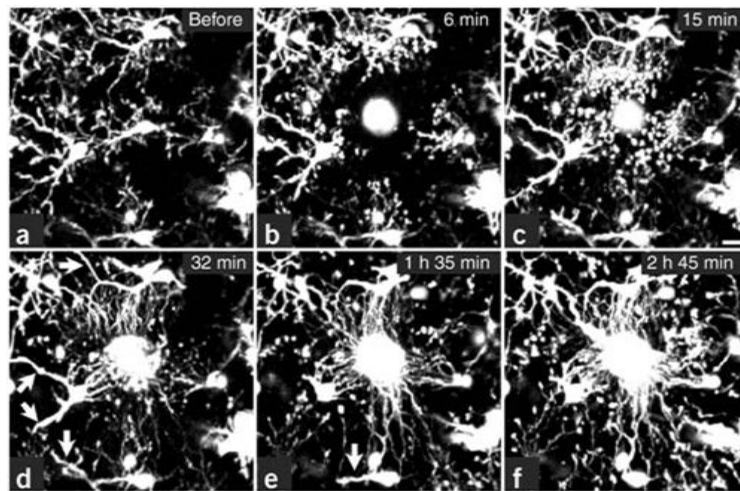


Figure 8: Mouvements rapides des prolongements microgliaux vers le site de lésion
(Davalos et al., 2005)

Après la création d'une lésion localisée dans le cortex par un laser bi-photonique de 15 μm de diamètre au centre de l'image, les prolongements microgliaux répondent immédiatement par une extension de ces derniers vers la zone lésée. Ces prolongements forment un endiguement sphérique autour la zone détruite. En même temps que l'extension des prolongements vers la lésion, on peut observer une rétraction des prolongements microgliaux se situant du coté opposé à celui de la lésion (flèches en d et e). La barre d'échelle représente 10 μm .

Les dommages neuronaux engendrés par la lésion entraînent une libération (ou une fuite) d'ATP qui apparaît comme un signal chimio-attractant ou signal « find-me » des neurones lésés vers les cellules microgliales. Cependant, cette attraction des cellules microgliales pourrait être indirecte et les astrocytes qui expriment également les récepteurs P2 seraient des intermédiaires nécessaires au recrutement des prolongements microgliaux (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006). Le mouvement des prolongements microgliaux a aussi été observé vers une pipette insérée dans le tissu contenant de l'ATP ou un agoniste des récepteurs P2Y₁₂ comme le 2-MeSADP (2-méthylthio-adénosine-triphosphate) (Wu et al., 2007). De plus, les enregistrements électrophysiologiques des courants induits par l'activation des récepteurs P2Y₁₂ montrent que l'activation de ces récepteurs métabotropiques induit un courant sortant. Wu et son équipe a également montré que la chimiotaxie déclenchée par l'ATP implique une voie de signalisation PI3K qui serait activée par P2Y₁₂.

Le récepteur P2Y₁₂ est exprimé par la microglie surveillante et activée mais il y aurait une régulation de l'expression de ce récepteur suivant le phénotype microglial. En effet, suivant les modèles d'étude, les auteurs ont observé soit une augmentation, soit une diminution du niveau d'expression. Par exemple, l'activation des cellules microgliales en culture avec du LPS entraîne une baisse de

l'expression de P2Y₁₂ (Haynes et al., 2006). Cependant, une lésion du nerf périphérique ou l'induction d'un SE entraîne une augmentation significative de P2Y₁₂ dans la microglie (Avignone et al., 2008; Kobayashi et al., 2008). Par conséquent, la régulation de l'expression de P2Y₁₂ dépend du phénotype microglial.

Les récepteurs P2Y₁₃ et P2Y₁₄

Malheureusement très peu d'études ont été menées sur l'expression microgliale des récepteurs P2Y₁₃ et P2Y₁₄, des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G_{i/o}. A ce jour, une seule étude conduite par l'équipe de Kobayashi a identifié ces récepteurs par RT-PCR et hybridation *in situ* dans la microglie de la moelle épinière (Kobayashi et al., 2008). Les auteurs de ces travaux ont montré que l'expression de ces récepteurs augmente lors de lésion du nerf périphérique et l'inhibition de ces récepteurs diminue la douleur neuropathique associée à la lésion via une baisse de la libération de cytokines pro-inflammatoires. Néanmoins d'autres études sont requises pour déterminer les fonctions de ces récepteurs ainsi que leur expression dans le parenchyme cérébral.

Les récepteurs P2Y₆

Les récepteurs métabotropiques P2Y₆ sont liés aux protéines G_q régulant l'activation de PLC (phospholipase C) et la formation d'IP3 (inositol triphosphate) permettant de libérer le calcium contenu dans le réticulum endoplasmique. Les cellules microgliales expriment également des récepteurs métabotropiques P2Y₆ fonctionnels dont l'agoniste est l'UDP (uridine diphosphate) (Koizumi et al., 2007). Des microglies en cultures traitées avec de l'UDP présentent des changements morphologiques, à savoir prolongements microgliaux avec des protusions de type filopodes et des vacuoles type phagosomes. Ainsi, ces changements morphologiques contrôlés par l'UDP permettraient à la microglie de participer à des activités endocytiques telles que la pinocytose, la macropinocytose et la phagocytose qui sont des fonctions de la physiologie microgliale importantes. L'équipe de Koizumi a montré que les cellules microgliales stimulées par l'UDP phagocytent rapidement des particules fluorescentes. Le signal UDP est donc un signal « eat me » permettant la phagocytose de débris cellulaires, de cellules endommagées ou mortes et de pathogènes.

De plus, le niveau d'expression de ce récepteur serait également régulé par le phénotype microglial. En effet, lors de conditions pathologiques telles que l'induction d'un SE, l'expression de P2Y₆ est augmentée (Avignone et al., 2008; Koizumi et al., 2007). Dans ce modèle d'inflammation, un nombre important de neurones meurt au cours des crises épileptiques et une forte activation microgliale se développe au cours de l'épileptogénèse. On peut supposer que cette augmentation de l'expression de P2Y₆ au niveau microglial permettrait de « nettoyer » le cerveau des cellules mortes et des débris cellulaires associés.

Il a été proposé que les cellules microgliales soient recrutées par l'ATP ou ADP puis elles reconnaîtraient l'UTP ou UDP. Les cellules mourantes utiliseraient donc des signaux « find me » combinés à des signaux « eat me » afin d'attirer les cellules microgliales via l'activation successive des récepteurs P2Y₁₂ et P2Y₆.

Les récepteurs P2X₁

Le récepteur P2X₁ est un récepteur ionotrope dont les fonctions sont encore mal connues. Ce récepteur est détecté dans la majorité des cellules microgliales au cours du développement en immunohistochimie et RT-PCR mais vers P30 ce récepteur n'est plus exprimé (Xiang and Burnstock, 2005). Néanmoins, aucune étude n'a montré que ce récepteur est fonctionnel et son rôle au cours du développement n'est toujours pas déterminé. On peut cependant envisager un rôle de ce récepteur dans la différenciation et la maturation des cellules microgliales.

Les récepteurs P2X₄

Le récepteur P2X₄ est un récepteur ionotrope ayant une forte perméabilité au calcium qui peut conduire à une dépolarisation de la cellule et à l'activation de processus intracellulaires dépendants du calcium. L'expression microgliale de P2X₄ évolue au cours du développement post-natal (Xiang and Burnstock, 2005). En effet, il a été montré par immunohistochimie qu'à partir de E16 quasiment toutes les cellules microgliales expriment le récepteur P2X₄ et cette expression perdure jusqu'à P14. Mais, vers P30, l'expression de P2X₄ change et ce sont seulement les cellules

microgliales localisées près des vaisseaux sanguins et des espaces sub-arachnoïdes qui continuent à exprimer ce récepteur. Ainsi, il y aurait une expression de P2X₄ régulée par la localisation des cellules et par le développement. Cependant, le rôle de P2X₄ en conditions physiologiques n'est toujours pas clairement déterminé. Une étude menée en culture cellulaire suggère que P2X₄ pourrait agir en coopération avec P2Y₁₂ dans la migration cellulaire et les réarrangements du cytosquelette nécessaire au mouvement induits par l'ATP extracellulaire (Ohsawa et al., 2007). Les auteurs proposent que l'activation de P2X₄ permette une entrée massive de Ca²⁺ activant la voie de signalisation PI3K/Akt nécessaire à la chimiotaxie. Par ailleurs, l'influx local de Ca²⁺ via P2X₄ aux plis membranaires pourrait être nécessaire à la maintenance ou à l'amplification des signaux locaux PI3K activés par P2Y₁₂.

En conditions pathologiques, il y aurait une expression *de novo* du P2X₄ microglial dans le SNC. Après une lésion du nerf périphérique, P2X₄ est à nouveau exprimé par la microglie activée au niveau de la corne dorsale et son expression contribue à une hyperexcitabilité locale ainsi qu'à une douleur neuropathique (Beggs and Salter, 2010) (Figure 9). Cette expression de P2X₄ dans la microglie de la moelle épinière pourrait être induite par IFN γ (Tsuda et al., 2009), CCL21 (Biber et al., 2011) et CCL2 (Toyomitsu et al., 2012). Dans ce modèle de lésion, le récepteur P2X₄ est activé par l'ATP libéré en excès dans ces conditions d'inflammation et l'activation de P2X₄ entraîne la production de BDNF via une voie de signalisation p38-MAPK (Trang et al., 2009). Le BDNF libéré par la microglie se fixe à son récepteur TrkB localisé à la surface des neurones de la corne dorsale et la mise en jeu de TrkB induit une baisse d'expression de KCC2, un transporteur des ions Cl⁻. Cette diminution d'expression de KCC2 entraîne une inversion du mouvement des ions Cl⁻ qui sortent des neurones au lieu d'y entrer via les canaux ouverts par le GABA ou la glycine. Ainsi, cette diminution d'expression de KCC2 entraîne une modification du fonctionnement des synapses inhibitrices qui deviennent excitatrices d'où une hyperexcitabilité du réseau de la corne dorsale causant des douleurs neuropathiques (Coull et al., 2005). Par ailleurs, le BDNF libéré par les cellules microgliales lors de l'activation de P2X₄ pourrait induire une phosphorylation de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA des neurones de la corne dorsale ce qui contribuerait aussi à l'hyperexcitabilité du réseau neuronal (Ulmann et al., 2008). Le récepteur P2X₄ apparaît donc comme une cible thérapeutique attractive pour

réduire les fonctions douloureuses de la microglie. Ainsi, les cellules microgliales via leur activité de libération de médiateurs peuvent influencer les propriétés neuronales.

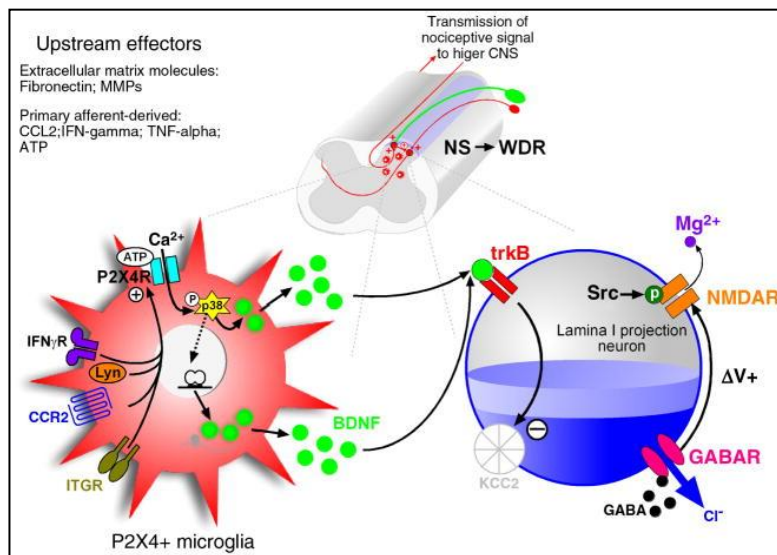


Figure 9: Signalisation neurone-microglie impliquée dans la lésion du nerf périphérique (Beggs and Salter, 2010)

Récemment, il a été montré que lors de l'induction d'un SE, il y avait également une expression de P2X₄ *de novo* dans la microglie. Des analyses menées dans la souris P2X₄^{-/-} indiquent que ce récepteur est impliqué dans l'augmentation de la densité de cellules microgliales au niveau de l'hippocampe mais également dans l'augmentation de la conductance potassique sortante médiée par Kv1.3 (Ulmann et al., 2013). De plus, une réduction de la mort neuronale est observée chez les animaux P2X₄^{-/-}. Dans ce modèle de SE, l'altération de l'activation microgliale et la diminution de la mort neuronale observées dans les animaux déficients pour P2X₄ pourrait résulter d'une réduction de la sensibilité des neurones pyramidaux aux épisodes d'hyperexcitabilité car eux aussi expriment ce récepteur. Un knock-out conditionnel aiderait à mieux comprendre si ces effets sont dus aux P2X₄ microgliaux ou neuronaux. Par ailleurs, des enregistrements EEG permettraient de déterminer la sensibilité des neurones aux crises chez les animaux déficients pour P2X₄ et chez contrôles et d'évaluer l'implication du P2X₄ microglial sur la régulation de la mort neuronale.

Les récepteurs P2X₇

Les récepteurs ionotropiques P2X₇ ont initialement été nommé récepteurs P2_Z. Ces récepteurs P2X₇ sont couplés à des canaux cationiques non-sélectifs laissant entrer du Na⁺ et du Ca²⁺ ou sortir du K⁺. Les récepteurs P2X₇ ont une sensibilité très basse pour l'ATP : 1 mM d'ATP est nécessaire pour activer P2X₇. La stimulation transitoire de P2X₇ de quelques millisecondes par l'ATP ou un agoniste synthétique Bz-ATP (benzoylbenzoyl ATP) permet l'ouverture d'un canal perméable aux cations de petite taille alors qu'une stimulation prolongée de quelques secondes permet le passage de molécules pouvant atteindre une masse de 900 daltons via un large pore. La formation du pore par l'activation de P2X₇ oppose deux hypothèses : 1) la formation du pore serait due à une dilatation du récepteur P2X₇ lui-même comme observé dans la microglie de la moelle épinière au cours du développement embryonnaire (Rigato et al., 2012), 2) le pore est une structure séparée du récepteur comme observé *in vitro* dans des macrophages en culture cellulaire (Pelegriin and Surprenant, 2006). Dans cette seconde hypothèse, Pelegriin et Surprenant ont montré que P2X₇ est couplé à l'hémi-canal pannexin-1 et que cette structure est le pore conduisant les courants observés lors de stimulation prolongée du récepteur P2X₇. L'expression du récepteur P2X₇ est augmentée lorsque la microglie est activée en conditions pathologiques (Avignone et al., 2008; Franke et al., 2004; Rappold et al., 2006) et jouerait un rôle important dans les réponses immunitaires via la libération d'une variété de cytokines.

Il a été montré que P2X₇ est impliqué dans des processus d'inflammation par sa capacité à induire la libération massive de la cytokine IL1beta mature (Ferrari et al., 2006). Cette cytokine est présente en quantité élevée et est un médiateur clé dans la réponse immunitaire lors d'infections ou de maladies neurodégénératives chroniques sévères. En culture cellulaire, l'activation de P2X₇ par l'ATP dans des macrophages traités au LPS entraine une rapide activation de caspase-1, une protéase cystéine aussi appelée ICE (IL-1β-converting enzyme), qui va convertir le pro-IL1beta en IL1beta mature actif (Sanz and Virgilio, 2000). Par ailleurs, une extrusion du K⁺ microglial intracellulaire semble nécessaire à l'activation d'ICE et par conséquent à la libération d'IL1beta. De plus, la

maturation de pro-IL1beta est compromise dans les animaux $P2X_7^{-/-}$ alors que la production d'ARNm pro-IL1beta est normale (Chessell et al., 2005; Solle et al., 2001).

L'activation du récepteur $P2X_7$ par l'ATP déclenche également la production et la libération d'une autre cytokine pro-inflammatoire : le TNFalpha (Inoue, 2006). L'expression de cette cytokine est augmentée lors de lésions et elle est principalement exprimée par les cellules microgliales proches de la zone lésée. La production de TNFalpha déclenchée par l'ATP et l'activation de $P2X_7$ dépendent des voies de signalisation des MAPK ERK, JNK et p38 (Suzuki et al., 2004). Cependant l'effet toxique ou protectif du TNFalpha sur les neurones est toujours débattu.

Les récepteurs à l'adénosine

Etant donné que l'adénosine est libérée en quantité excessive dans des conditions pathologiques type hypoxie et ischémie, ce neuromodulateur pourrait participer à l'activation microgliale. Les récepteurs à l'adénosine ont principalement été étudiés dans des cultures cellulaires de microglies provenant de rat ou de souris. L'application d'adénosine dans des cultures de microglies provoque un courant sortant lorsque les cellules sont maintenues à un potentiel de maintien de 0 mV. Ce courant résulte de l'activation de canaux potassiques (Langosch et al., 1994). Par ailleurs, les études menées en culture évoquent une fonction physiologique des récepteurs adrénergiques A_1 et A_2 dans la prolifération microgliale (Gebicke-Haerter et al., 1996).

Cependant, des études dans le cerveau adulte sain montrent que la microglie exprime fortement les récepteurs A_1 et A_3 et à un niveau très bas les récepteurs A_2 . Mais, lors d'activation microgliale via action du LPS ou dans un contexte pathologique (maladie de Parkinson ou ischémie) l'expression d' A_2 augmente. Le récepteur A_3 semble impliqué dans l'extension des prolongements induite par l'ATP et ce récepteur A_3 agirait de concert avec $P2Y_{12}$. De plus, la migration cellulaire de la microglie dépendrait de l'activation du récepteur A_1 et le récepteur A_2 participerait à la rétraction des prolongements microgliaux s'opérant lors de l'acquisition d'une forme amiboïde pendant l'activation microgliale (Koizumi et al., 2013).

b. Les récepteurs au glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur et par conséquent un élément clé de la communication neuronale. Ce neurotransmetteur libéré en excès en conditions pathologiques a des effets excitotoxiques et constitue un signal « on » pour l'activation microgliale. Cependant, l'activation de certains récepteurs glutamatergiques microgliaux a des effets neuroprotecteurs.

Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques

Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques sont les récepteurs AMPA, kainate et NMDA et l'activation de ces récepteurs exprimés par la microglie module différentes fonctions cellulaires : la motilité, la libération de facteurs, l'induction de la mort cellulaire,...

Dans des modèles de cultures cellulaires de microglie, l'administration de glutamate et de kainate déclenche des courants cationiques inhibés par une application de CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), un bloquant des récepteurs AMPA et kainate (Noda et al., 2000). L'expression des récepteurs AMPA (GluR2-4) et kainate (GluR5) est également confirmée par RT-PCR sur ces cellules microgliales en culture. L'activation des récepteurs AMPA et kainate microgliaux mobiliserait le calcium intracellulaire microglial et permettrait la libération de la cytokine pro-inflammatoire TNFalpha.

Par ailleurs, les récepteurs AMPA microgliaux pourraient être impliqués dans la chimiotaxie induite par le glutamate. En effet, il a été montré en culture cellulaire et dans des tranches de moelle épinière que la microglie exposée au glutamate présentait des déformations membranaires et migrait vers la source de glutamate (Liu et al., 2009).

Concernant les récepteurs NMDA, peu de données sont disponibles dans la littérature. Il a été montré que la microglie au cours du développement post-natal exprime transitoirement les récepteurs NMDA dans la matière blanche péri-ventriculaire (Tahraoui et al., 2001). Cette expression transitoire des récepteurs NMDA pourrait expliquer la présence d'une fenêtre temporelle de sensibilité aux dommages excitotoxiques dans la matière blanche. L'activation des cellules microgliales via la mise

en jeu des récepteurs NMDA microgliaux causerait une mort gliale et des lésions dans la matière blanche. Cette induction de la mort cellulaire par les cellules microgliales seraient due à une surproduction de cytokines inflammatoires comme IL1beta et TNFalpha.

L'expression des récepteurs NMDA au niveau microglial a également été confirmée par les travaux du groupe de Pierre Gressens (Kaindl et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la microglie de la matière blanche corticale exprime la sous-unité GluN1 dans des souris âgées de 5 et 56 jours. L'expression microgliale de GluN1 a également été observée chez l'humain au stage fœtal et adulte. Ainsi, la microglie exprime des récepteurs NMDA dans le SNC immature et mature. Des analyses *in vitro* de cellules en culture révèlent, par imagerie calcique et par électrophysiologie, que ces récepteurs NMDA sont fonctionnels. La stimulation des cellules microgliales par le NMDA en culture est comparable à une stimulation par LPS. En effet, lors de stimulation par le NMDA il y a une augmentation significative dans le milieu du niveau de nombreuses interleukines, GM-CSF, MCP1, NO, ROS et TNFalpha. La libération et l'accumulation massives de ces médiateurs neurotoxiques produits par la microglie cause la mort des neurones environnants qui à leur tour vont libérer du glutamate et activer les récepteurs microgliaux NMDA créant un cercle vicieux. La perte de fonction des récepteurs NMDA microgliaux protège les neurones de la mort cellulaire dans des modèles murins d'ischémie et lésion cérébrale traumatique. En conclusion, l'activation des récepteurs microgliaux NMDA constitue un signal « on » d'activation microgliale.

Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques

Dans des modèles de microglie en culture cellulaire, l'expression de récepteurs au glutamate métabotropiques des groupes I, II et III a été détectée. Selon le type de récepteur métabotropique impliqué, l'activation des mGluR microgliaux a des effets neuroprotecteur ou neurotoxique.

L'expression microgliale de mGluR5 (groupe I) a été identifiée par RT-PCR et par enregistrements calciques après stimulation du récepteur avec un agoniste spécifique (Biber et al., 1999). L'activation du mGluR5 microglial inhiberait l'inflammation et la neurotoxicité associée à l'activation microgliale via une baisse de production de NO, ROS et TNFalpha (Byrnes et al., 2009).

Par ailleurs, les microglies de rat en culture expriment les ARNm et les protéines du groupe II : mGluR2 et mGluR3 (Taylor et al., 2002). La stimulation des mGluR2 a un effet neurotoxique et favorise l'activation microgliale alors que l'activation des mGluR3 a un effet neuroprotecteur et agirait comme un signal calmant (Pinteaux-Jones et al., 2008).

Les cellules microgliales expriment aussi les ARNm et les protéines de récepteur du groupe III comme mGluR4, mGluR6 et mGluR8 mais pas mGluR7 (Taylor et al., 2003). L'activation des récepteurs du groupe III par des agonistes réduit l'activation microgliale lorsque la microglie est stimulée par LPS ou chromogranine A via une réduction de la production de neurotoxines (Taylor et al., 2003). Ainsi, l'activation des récepteurs de ce groupe protégerait les neurones lors d'activation microgliale. Ces effets neuroprotecteurs ont été observés dans un modèle de neurotoxicité microgliale induit par des débris de myéline (modèle mimant la maladie de sclérose multiple) (Pinteaux-Jones et al., 2008).

De plus, l'activation des récepteurs métabotropiques des groupes II et III réduirait la libération de glutamate par la microglie (export vers le milieu grâce à un antiport xCT) via une inhibition de l'adénylate cyclase. Cette réduction du relargage de glutamate permettrait de diminuer les effets neurotoxiques de la microglie (McMullan et al., 2012).

c. Les récepteurs au GABA

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le SNC. Par conséquent, le GABA pourrait également être un élément de la communication neurone-microglie.

Des récepteurs GABA_B fonctionnels ont été identifiés dans la moitié des cellules microgliales en culture. Mais, *in vivo* environ 5% des cellules microgliales en conditions physiologiques expriment GABA_B alors que lors de lésion du nerf facial 80% des cellules microgliales activées dans le noyau facial l'expriment (Kuhn et al., 2004). La stimulation de ces récepteurs dans des cellules microgliales, en culture ou en tranche, active des courants potassiques sortants (Kuhn et al., 2004). Des transitoires calciques ont aussi été observés lors de l'activation des récepteurs GABA_B dans des cellules microgliales en culture. De plus, l'activation de GABA_B dans des cellules microgliales activées par LPS induit une baisse de la libération d'IL10 et IL12 sans changer la production de NO et de

TNFalpha. Par conséquent, l'activation des récepteurs GABA_B microgliaux atténue les propriétés inflammatoires des cellules microgliales activées. Le GABA agirait donc comme un agent neuroprotecteur.

L'application de muscimol, un agoniste des récepteurs GABA_A déclenche des conductances potassiques entrantes dans des microglies amiboïdes présentes dans le corps calleux de tranches de cerveau de souris en développement (P6-8) (Cheung et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont montré que l'activation de ces courants ne résultait pas de l'activation des récepteurs GABA_A microgliaux mais des récepteurs macrogliaux. L'activation des récepteurs GABA_A macrogliaux déclenche une hausse de la concentration de K⁺ extracellulaire qui va créer ces courants potassiques microgliaux et favoriser la libération de MIP-1alpha permettant la maturation neuronale et astrocytaire. Ainsi, les cellules microgliales peuvent détecter l'activité GABAergique au cours du développement post-natal. Ces courants potassiques microgliaux ne sont plus retrouvés lors d'application de muscimol dans des tranches de cerveau adulte (P35-40) car l'augmentation de la concentration de K⁺ extracellulaire est faible. Ainsi, il n'y a toujours pas de preuve directe de l'expression des récepteurs GABA_A par les cellules microgliales.

d. Les autres récepteurs aux neurotransmetteurs

Les cellules microgliales pourraient exprimer d'autres récepteurs aux neurotransmetteurs comme les récepteurs cholinergiques, adrénergiques et dopaminergiques mais ces récepteurs ont, pour la plupart, seulement été étudiés dans des microglies en culture et leur importance physiologique n'est pas encore déterminée.

Les cellules microgliales en culture expriment les récepteurs nicotiniques alpha7 qui seraient liés à une voie de signalisation PLC/IP3/Ca²⁺ (Suzuki et al., 2006). Le signal calcique induit par la nicotine baisse la libération de TNFalpha lors d'activation microgliale par stimulation au LPS. Ainsi, l'activation des récepteurs cholinergiques inhibe les réponses immunitaires microgliales et représente une voie anti-inflammatoire qui serait neuroprotectrice. Cependant, la libération de TNFalpha par

activation de P2X7 est amplifiée lors de stimulation nicotinique. Par conséquent, la modulation de libération de TNFalpha par la nicotine dépend du contexte d'activation microgliale.

Les récepteurs adrénergiques alpha1A, alpha2A, beta1 et beta2 ont également été détectés par RT-PCR dans des cellules microgliales en culture (Mori et al., 2002). La noradrénaline atténue la libération de NO, TNFalpha et IL6 (Färber et al., 2005; Mori et al., 2002) via stimulation des récepteurs alpha1, beta1 et beta2. De plus, la stimulation des récepteurs beta2 supprime la libération d'IL12 lors d'activation microgliale induite par LPS en culture (Prinz et al., 2001). Ainsi, l'activation des récepteurs adrénergiques microgliaux atténuerait la libération de médiateurs inflammatoires lors de réponses immunitaires. Néanmoins, un rôle délétère de l'activation des récepteurs beta2 a également été proposé. L'activation de beta2 pourrait induire une activation microgliale et la production de ROS dans des co-cultures neurone-glie (Qian et al., 2009).

Des récepteurs dopaminergiques fonctionnels ont été identifiés par électrophysiologie dans des microglies en culture mais aussi en tranches (Färber et al., 2005). Par RT-PCR dans des microglies en culture, Fäber et collaborateurs ont montré que la microglie exprime les récepteurs D1, D2, D4 et D5. D'après les résultats obtenus dans des tranches de souris en développement post-natal, seulement 1/3 des cellules répond à l'application d'agonistes spécifiques des récepteurs de la famille D1 (D1 et D5) ou D2 (D2, D3 et D4) et aucune n'exprime les deux types de récepteurs. La stimulation des récepteurs dopaminergiques dans des microglies activées par du LPS en culture ne modifie pas la libération de TNFalpha ni d'IL6 mais elle atténue la libération de NO. Par ailleurs, la dopamine régulerait positivement la migration des cellules microgliales.

2. Les récepteurs aux cytokines et aux chimiokines

Les cytokines sont une grande famille de protéines de signalisation regroupant : les interleukines, les chimiokines, les lymphokines, les hématoprotéines, les interférons, les PDGF, les TNF et les TGF. Ces protéines peuvent être sécrétées par la microglie, les astrocytes et les neurones dans le SNC. Les cytokines jouent un rôle dans différents aspects des fonctions du SNC. En conditions physiologiques, elles participent à la régulation du sommeil, diverses fonctions endocriniennes, le développement

neuronal et le vieillissement normal (Galic et al., 2012). Dans des conditions pathologiques, les cytokines informent les cellules immunitaires des anomalies apparaissant dans le parenchyme afin de permettre le développement d'une réponse immunitaire appropriée. Lors d'états inflammatoires, la production de cytokines et l'expression des récepteurs aux cytokines sont augmentées. Il est important de noter l'existence de cytokines inflammatoires dont l'expression est induite lors de conditions inflammatoires (signal « on ») et les cytokines homéostatiques dont l'expression est constitutive (signal « off »). Par ailleurs, l'arrêt d'expression des cytokines homéostatiques constitue un signal « on » d'activation microgliale. L'activation des cellules microgliales dépend de la fine régulation homéostatique de production des cytokines (balance des signaux « on » et « off »). Etant donné le vaste répertoire de signaux appartenant à la famille des cytokines, je vais décrire que quelques exemples de régulation de l'activité microgliale par ces cytokines.

a. Les signaux « off » sous le contrôle des cytokines

TGFbeta

Les TGFbetas sont représentés par 3 isoformes : TGFbeta1, TGFbeta2 et TGFbeta3 qui sont produits par les cellules gliales et les neurones (Böttner et al., 2000). La signalisation TGFbeta implique 2 récepteurs kinase serine/thréonine : TGFbetaI et II qui activent les facteurs de transcription smad2, 3 et 4. La phosphorylation et l'activation forment un complexe hétéromérique de smads qui entrent dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes cibles du TGFbeta.

L'expression et les fonctions de TGFbeta1 ont été décrites dans plusieurs études suggérant un rôle anti-inflammatoire pour cette cytokine. Cette cytokine contrôle et régule l'état d'activation microgliale. Dans des cellules microgliales en culture, il a été montré que TGFbeta1 réprime la sur-activation des cellules microgliales stimulées par du LPS (Kim et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un prétraitement des cellules avec le TGFbeta1 diminue la mort cellulaire et la production de nitrites induite par application de LPS. Une augmentation de l'expression de TGFbeta1 a été détectée dans le SNC lors de lésion du nerf facial, d'ischémie, de lésion de la moelle épinière, de tumeurs...(pour revue (Kreutzberg, 1996)). Il a également été montré que dans la souris ME7, modèle

d'une maladie à prion, le TGFbeta1 joue un rôle critique dans la réduction de la réponse inflammatoire via une réduction de l'activation microgiale (Boche et al., 2006). Ainsi, le TGFbeta1 régulerait négativement l'activation microgiale. Paradoxalement, des enregistrements électrophysiologiques de cellules microgiales en culture traitées au TGFbeta1 indiquent que la microglie développe des courants potassiques sortants médiés par Kv1.3 (Schilling et al., 2000). Ce résultat est surprenant car l'expression de Kv1.3 est habituellement trouvée dans des cellules microgiales activées chez l'adulte en conditions pathologiques. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que l'expression des canaux potassiques n'est pas associée à une expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgiales. Ainsi, différentes propriétés fonctionnelles des cellules microgiales pourraient être régulées de façon indépendante.

CX3CL1 (fractalkine)

La fractalkine appartient à la famille des chimiokines. Les chimiokines sont classées en 4 groupes selon une nomenclature basée sur l'espacement entre les cystéines en N-terminal : C, CC, CXC et CX3C. Toutes les chimiokines exercent leurs effets biologiques en interagissant avec des récepteurs couplés aux protéines G qui sont exprimés par les cellules cibles. La fractalkine est un élément un peu particulier dans la famille des chimiokines car elle est la seule composante de son groupe. La fractalkine est uniquement exprimée par les neurones en conditions physiologiques et son unique récepteur CX3CR1 est seulement exprimé par les cellules microgiales dans le SNC (Harrison et al., 1998). La voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 est donc une voie de signalisation directe neurone/microglie. La fractalkine est constitutivement exprimée au niveau de la membrane des neurones mais cette chimiokine peut être clivée par des protéases telles qu'ADAM10 et ADAM17. La fractalkine membranaire et soluble interagissent toutes les deux avec CX3CR1 et les voies de signalisation sous-jacentes activées n'ont pas encore été clairement identifiées (Figure 10).

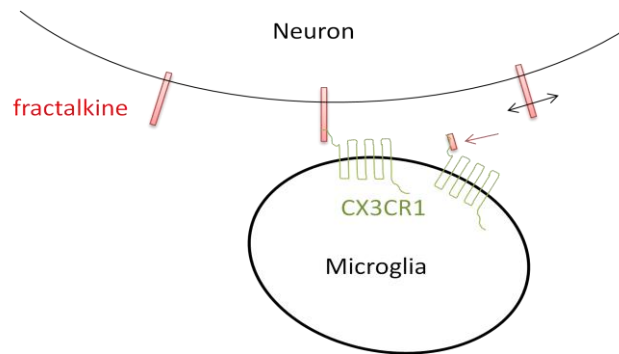


Figure 10: La voie de signalisation fractalkine/CX3CR1

Les neurones expriment la fractalkine (schématisée par un bâton rouge) sous une forme membranaire qui peut être clivée par des protéases (flèche noire) permettant la libération d'une fractalkine soluble (indiquée par une flèche rouge). Les formes membranaire et soluble de la fractalkine peuvent interagir avec leur unique récepteur CX3CR1 (vert) qui est seulement exprimé par les cellules microgliales dans le SNC.

Il a été proposé que la fractalkine soit un signal « off » de la microglie.

In vitro, la fractalkine empêche les cellules microgliales d'entrer en apoptose et elle promeut la survie des neurones (Boehme et al., 2000).

Par la suite, une étude *in vivo* utilisant 3 modèles pathologiques (maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et des injections périphériques de LPS) a montré qu'un déficit d'expression de CX3CR1 perturbe la réponse microgliale et induit une forte production de molécules pro-inflammatoires. (Cardona et al., 2006). Cette réponse immunitaire crée une certaine neurotoxicité qui se traduit par une augmentation de la mort neuronale. D'après cette étude, la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 serait la première voie impliquée lors d'événements pathologiques dans la régulation de la neurotoxicité microgliale.

Récemment, la capacité neuroprotectrice de la fractalkine membranaire et soluble a été étudiée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson induite par la neurotoxine MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Morganti et al., 2012). Dans cette étude, l'équipe de Carmelina Gemma a montré que la fractalkine soluble réduit les symptômes de la maladie en améliorant la coordination motrice et en abaissant la mort neuronale. De plus, les auteurs ont également constaté que la fractalkine soluble atténue la réactivité microgliale ainsi que la production des cytokines pro-

inflammatoires TNFalpha et IL1beta. Ces effets neuroprotecteurs de la fractalkine soluble ne sont pas retrouvés avec la fractalkine membranaire.

A l'inverse, des études ont montré qu'un déficit de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 jouait un rôle neuroprotecteur dans la maladie d'Alzheimer. En effet, un déficit d'expression du récepteur CX3CR1 induit une réduction du dépôts des protéines A β dans deux souris modèles de la maladie (Lee et al., 2010). Cette réduction de l'accumulation d'A β découle d'une augmentation de l'activité phagocytaire des cellules microgliales qui est ainsi plus efficace dans la clairance d'A β . Par ailleurs, le déficit de CX3CR1 réduit l'activation microgliale et diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNFalpha, IL1beta et MCP-1 offrant des effets neuroprotecteurs. Similairement, le défaut d'expression du récepteur CX3CR1 serait également protecteur dans modèles murins d'ischémie cérébrale (Dénes et al., 2008; Fumagalli et al., 2013). En effet, le déficit d'expression de CX3CR1 lors d'occlusion artérielle cérébrale intermédiaire réduit les dommages ischémiques (taille infarctus et rupture de la barrière hémato-encéphalique), la mort neuronale, la production de cytokines inflammatoires et l'activation microgliale.

Ainsi, les fonctions neurotoxiques ou neuroprotectrices de l'activation de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 sont toujours débattues et on peut supposer que son rôle est dépendant du contexte pathologique dans lequel cette voie de signalisation est sollicitée.

A ce jour, très peu d'études ont été conduites afin d'identifier les fonctions de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 en conditions physiologiques. Cependant, cette voie de signalisation est impliquée dans la neurogénèse hippocampique adulte car un défaut d'expression de CX3CR1 entraîne une diminution de la neurogénèse et de la prolifération cellulaire de la zone sous-granulaire (Rogers et al., 2011). De plus, CX3CR1 facilite l'apprentissage moteur ainsi que les performances cognitives. Les auteurs ont également montré que CX3CR1 régule la production microgliale d'IL1beta lors d'induction de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. La principale conclusion de cette étude est que la voie de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 régule le phénotype des cellules microgliales et contrôle des fonctions cognitives ainsi que la plasticité synaptique en conditions physiologiques. Par ailleurs, Rogers et al (2011) ont montré qu'il y a un effet dose-gène de

CX3CR1 et que les souris hétérozygotes CX3CR1^{+/-} présentent un phénotype microglial intermédiaire. Par conséquent, la délétion d'un seul allèle est suffisante pour modifier les fonctions de CX3CR1.

De façon opposée, une autre étude réalisée la même année que Rogers et al (2011) indique que les animaux n'exprimant pas CX3CR1 apprennent plus rapidement les tâches faisant appel à la mémoire des rongeurs par rapport aux animaux sauvages (labyrinthe de Morris) (Maggi et al., 2011). Ainsi, le défaut d'expression de CX3CR1 augmente la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe ainsi que la mémoire spatiale. En revanche, les performances d'apprentissage et de mémorisation ne sont pas améliorées lorsque les animaux sont placés dans des environnements enrichis comme c'est le cas chez les souris sauvages. Ces résultats suggèrent que la signalisation fractalkine/CX3CR1 contrôle les voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique nécessaire aux effets de l'enrichissement environnemental.

b. Les signaux « on » sous le contrôle des cytokines

TNFalpha

Le TNFalpha est une cytokine pro-inflammatoire qui initie de multiples effets dans les systèmes nerveux et immunitaire via la mise en jeu de deux récepteurs membranaires : TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75) (pour revue (Kraft et al., 2009)). Cette cytokine est constitutivement exprimée à la membrane des cellules et elle est clivée par des métalloprotéinases matricielles TNF alpha converting enzyme (TACE; ADAM17). Le TNFR1 lie le TNFalpha soluble et membranaire avec une préférence pour le TNFalpha soluble alors que TNFR2 est préférentiellement activé par le TNFalpha membranaire. Dans le SNC, le TNFalpha et son récepteur TNFR1 sont exprimés par la microglie, les astrocytes et quelques neurones alors que TNFR2 est seulement exprimé par la microglie et les cellules endothéliales. Le TNFR1 contient un domaine de mort (« death domain ») et son activation conduit généralement à une induction de la mort cellulaire, cependant, lors de conditions particulières, l'activation de ce récepteur promeut une survie cellulaire via l'activation du facteur de transcription NFκB. Ces différentes conséquences sont liées à la localisation du récepteur : à la membrane, il supporte la survie cellulaire alors qu'internalisé il contribue à la mort cellulaire. Le second récepteur,

TNFR2, participe généralement à la croissance et à la survie cellulaire mais il peut également s'associer à TNFR1 et induire la mort cellulaire. L'expression de cette cytokine augmente lors de maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ainsi que lors de traumatismes cérébraux (pour revue (Kraft et al., 2009)). Cette cytokine est associée aux effets toxiques induits dans ces contextes neuropathologiques et faciliterait la progression de la maladie.

Une analyse basée sur l'étude de la microglie en culture cellulaire indique que la stimulation de ces cellules par le TNFalpha active les cellules microgliales (Kuno et al., 2005). En effet, l'application de TNFalpha induit une production de TNFalpha via l'activation de TNFR1. Ces données suggèrent l'existence d'une boucle de rétroaction positive participant à l'activation de la microglie de façon autocrine. Par ailleurs, l'activation des cellules microgliales par le TNFalpha déclenche de manière dose-dépendante l'expression de médiateurs inflammatoires : NO, ROS, IL1beta et IL6. De plus, le traitement de cellules microgliales en culture par du TNFalpha stimulerait sa capacité à phagocyter les éléments (von Zahn et al., 1997). *In vivo*, les souris n'exprimant pas les récepteurs TNFalpha présentent une activation microgliale réduite et une moindre neurodégénération dans le striatum d'animaux modèles de la maladie de Parkinson (Sriram et al., 2006). Par conséquent, les voies de signalisation TNFalpha/TNFR favoriseraient l'activation des cellules microgliales et auraient des conséquences neurotoxiques.

IL1beta

IL1beta appartient à la superfamille IL1 qui comprend 11 membres, les plus étudiés étant IL1alpha, IL1beta et leur antagoniste naturel IL1Ra. Ces trois protéines se lient à un même récepteur IL1R. La cytokine IL1beta est synthétisée comme une protéine précurseur, c'est-à-dire sous une forme longue non-active qui sera clivée par ICE (interleukin convertase enzyme) en une forme active et mature plus petite.

L'IL1beta est exprimée constitutivement à un niveau bas en conditions physiologiques mais lors de l'apparition de lésions cérébrales ou de maladies neurodégénératives, son niveau d'expression

augmente considérablement. Cette cytokine aurait des effets délétères et neurotoxiques lors de conditions pathologiques. En effet, le blocage d'IL1beta par administration d'anticorps anti-IL1beta ou d'antagonistes d'IL1R diminuent les effets pathologiques associés aux ischémies, maladie d'Alzheimer et dans le syndrome de Down (trisomie 21). De plus, une étude *in vivo* a montré que lors de lésions cérébrales, l'IL1R est nécessaire et suffisant pour induire une activation microgliale et l'induction de la réponse inflammatoire (Basu et al., 2002). En effet, dans cette étude, Basu et al ont observé une diminution de l'activation microgliale dans des animaux n'exprimant pas IL1R. Ils ont constaté que peu de cellules microgliales adoptent une morphologie amiboïde près de la région lésée et que la production de molécules pro-inflammatoires COX2, IL6, TNFalpha, IL1beta, TGFbeta et GM-CSF est diminuée. Ainsi, l'absence de la voie de signalisation IL1beta/IL1R est protectrice dans ce contexte pathologique. Par ailleurs, d'autres études ont démontré que l'augmentation du niveau d'IL1beta aggrave les dommages cellulaires présents en conditions pathologiques (Stroemer and Rothwell, 1998).

Par conséquent, IL1beta constitue un signal « on » d'activation microgliale et il est nécessaire à l'induction rapide d'une réponse immunitaire lors de lésion du SNC.

IL6

L'IL6 est une interleukine multifonctionnelle impliquée dans différents processus biologiques comme la survie neuronale, la neurogénèse, la réponse immunitaire ainsi que les réactions systémiques induites par un trauma, une infection ou un choc septique (Erta et al., 2012). L'IL6 est rapidement exprimée lors de lésion des systèmes nerveux central et périphérique afin de stimuler les astrocytes, de recruter les leucocytes et de favoriser la survie des neurones lésés. Ainsi, des niveaux élevés d'IL6 ont été trouvés dans plusieurs maladies telles que la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer, les traumatismes, les méningites,... (Gruol and Nelson, 1997). Par ailleurs, il a été montré que la réponse microgliale est altérée dans des animaux transgéniques n'exprimant pas l'IL6 et ayant reçu une lésion du nerf facial (Galiano et al., 2001). Dans cette étude, Galiano et al ont montré par immunohistochimie que les réponses précoces et intermédiaires microgliales (alerte et adhésion aux cellules lésées) sont

diminuées alors que la réponse tardive (phagocytose) n'est pas modifiée. De plus, le recrutement des lymphocytes est fortement impacté lorsqu'IL6 n'est pas exprimé. Ces données suggèrent que cette cytokine joue un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire après une lésion.

Interféron gamma

Les interférons (IFN) sont une famille de protéines comportant 10 membres et ils sont produits en réponse à l'entrée de pathogènes comme des virus, des bactéries, des parasites ou des cellules tumorales. Les IFN, comme leur nom l'indique, « interfèrent » avec les effets des agents viraux mais ces cytokines jouent également des rôles importants dans la mise en place de la réponse immunitaire en favorisant la reconnaissance des cellules infectées ou tumorales par les cellules du système immunitaire. Ils permettent également aux cellules non-infectées de mieux résister aux agents pathogènes.

L'IFNgamma apparaît comme être une cytokine clé dans l'activation des cellules microgliales. En effet, la stimulation des cellules par IFNgamma déclenche l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II ce qui permet aux cellules microgliales de remplir ses fonctions de détection et de présentation d'antigènes aux cellules T (Xu and Ling, 1994). De plus, plusieurs études ont montré qu'IFNgamma modifie le profil fonctionnel des cellules microgliales. En effet, qu'IFNgamma régulerait la capacité de phagocytose des cellules microgliales en culture ainsi que la production de ROS (Tambuyzer et al., 2012). Dans des modèles murins de cellules microgliales en culture, l'exposition des cellules à l'IFNgamma augmente la capacité de phagocytose, la sécrétion d'enzyme protéolytique et le stress oxydatif (Dheen et al., 2007; Smith et al., 1998). Par ailleurs, l'exposition de cellules microgliales en culture à IFNgamma induit la mort des cellules microgliales qui entrent en apoptose (Takeuchi et al., 2006). Les IFNgamma modulent le phénotype des cellules microgliales et les placent dans un phénotype de type activé pouvant même aboutir à la mort de ces cellules.

3. Les récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont des récepteurs appartenant à la famille des « pattern-recognition receptors » (PRRs) reconnaissant des structures moléculaires pathogènes exogènes (les PAMPs pour « pathogen-associated molecular patterns ») et capables d'initier des réponses immunitaires (Kaisho and Akira, 2006). Lors de lésions ou de stress cellulaire, les TLR détectent également des ligands endogènes libérés dans ces conditions (les DAMPs pour « danger-associated molecular patterns ») et influencent la réponse inflammatoire. Ces TLRs mettent en relation les réponses immunitaires innées (via détection des pathogènes et induction de la réponse inflammatoire) et adaptatives (via recrutement et activation des cellules du système adaptatif). Les TLR sont exprimés par des cellules neuronales et non-neuronales dans le SNC et ils contribuent à lutter contre les troubles infectieux et non-infectieux. A première vue, les TLRs ont un rôle bénéfique lors de troubles du SNC grâce à leurs fonctions de détection et d'organisation de la réponse immunitaire mais ces récepteurs ont également des rôles néfastes. En effet, l'activation des TLRs déclenche la production de molécules pro-inflammatoires qui participent au développement et à la maintenance de l'inflammation et de la douleur. Ainsi, les TLRs exercent des effets bénéfiques et néfastes dans le SNC qui dépendent du contexte dans lequel ils sont activés, et par conséquent de l'homéostasie cérébrale ou du type de pathologie.

Les cellules microgliales expriment tous les membres connus de la famille des TLR identifiés à ce jour. Chaque TLR a son ligand favori et l'activation d'un TLR déclenche une réponse inflammatoire particulière (cf Tableau 2) (Hanke and Kielian, 2011; Olson and Miller, 2004).

Tableau 2: Les agonistes majeurs des TLRs et les médiateurs produits en réponse à leur activation
(adapté de (Hanke and Kielian, 2011; Olson and Miller, 2004))

TLR	Agonistes principaux	Réponses
1/2	Peptidoglycane et lipoprotéines triacylées	?
2	Peptidoglycane et lipoprotéines	IFNbeta, IL1beta, IL6, IL12, IL18, TNFalpha, iNOS, MIP1alpha, CCL3,

		CCL4, CXCL2, CXCL10
3	ARN double brin viral	IFNbeta, IL1beta, IL6, IL8, IL12, TNFalpha, CXCL10
4	LPS	IFNalpha, IFNbeta, IL1beta, IL6, IL12, TNFalpha, iNOS, MIP1alpha, MCP1, RANTES
5	Flagelline	?
6/2	Lipoprotéines diacylées et zymosan	?
7	ARN simple brin viral	TNFalpha, IL1beta, IL1alpha, IL6, IL12, CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL9, CXCL10
8	ARN simple brin viral	TNFalpha, IL1beta, IL1alpha, IL6, IL12, CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL9, CXCL10
9	ADN contenant des CpG non-méthylés bactérien et viral	IFNbeta, IL1beta, IL6, IL10, IL12, IL18, TNFalpha iNOS

Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont situés au niveau de la membrane plasmique et sont impliqués dans la reconnaissance des composants de la paroi des agents infectieux. Les TLRs 1, 2 et 6 peuvent former des hétérodimères 1/2 et 2/6 ce qui permet d'élargir le spectre de molécules reconnues. Les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont situés au niveau des endosomes et ils reconnaissent des acides nucléiques viraux ou bactériens.

Les TLRs ont des effets communs comme l'induction de cytokines inflammatoires (IL6, IL1beta,...) mais aussi des effets plus spécifiques comme l'induction d'IFNalpha. Par ailleurs, l'activation des TLRs orchestre le recrutement des cellules inflammatoires via la production des chimiokines attractives IL18, CCL3, CCL4 et MCP1alpha. Les TLRs sont des éléments clés permettant la communication cellulaire lors de réaction inflammatoires et leur activation constitue un signal « on » d'activation microgliale.

Le TLR le plus étudié au niveau microglial est le TLR4 (aussi nommé CD284) et son ligand, le LPS, est souvent utilisé pour activer les cellules microgliales et observer les propriétés de cellules microgliales activées (par exemple : (Qin et al., 2005)). Le LPS est un composant de la paroi des bactéries Gram-négatives induisant une robuste réaction inflammatoire des phagocytes via activation

de TLR4 et de la protéine associée MD2 (Lu et al., 2008). De plus CD14 est un corécepteur important de TLR4. Dans des cultures de cellules microgliales stimulées par LPS, il y a une augmentation des propriétés microgliales caractéristiques de cellules microgliales activées : la phagocytose, la chimiotaxie, la sécrétion de cytokines, le stress oxydatif et l'induction de l'oxyde nitrique synthase (Zielasek and Hartung, 1996).

Le récepteur TLR4 est également un élément important dans la communication entre les cellules du parenchyme cérébral et module indirectement le fonctionnement des synapses. Le TLR4 est uniquement exprimé par les cellules microgliales en conditions physiologiques et l'expression de ce récepteur a été détectée occasionnellement dans des neurones ou des astrocytes en conditions pathologiques. La stimulation de ce récepteur par application de LPS dans des tranches d'hippocampe induit une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs) sans modification de l'amplitude des événements synaptiques dans CA1 (Pascual et al., 2012). L'activation du TLR4 microglial entraîne une libération d'ATP par la microglie qui va activer les récepteurs purinergiques P2Y₁ des astrocytes. L'activation des P2Y₁ astrocytaires induit une libération de glutamate par les astrocytes qui va se lier à des récepteurs glutamatergiques mGluR₅ présents au niveau des terminaisons pré-synaptiques des synapses excitatrices. La mise en jeu des mGluR₅ augmenterait la probabilité de libération du glutamate ce qui augmente la fréquence des EPSCs. Ainsi, la modulation de l'activité microgliale par activation de TLR4 augmente l'excitabilité du réseau neuronal. Ces données montrent que les cellules microgliales sont des cellules bien intégrées au réseau synaptique et qu'elles régulent la neurotransmission via un dialogue avec les astrocytes.

4. Les récepteurs aux immunoglobulines

CD200

CD200 (ou OX2) est une glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des immunoglobulines et elle est exprimée par les neurones et les oligodendrocytes de la matière grise dans le SNC en conditions physiologiques (Koning et al., 2009). En conditions pathologiques telles que la sclérose en plaque, les astrocytes réactifs expriment également CD200. Le récepteur de CD200

(CD200R) est exprimé par la microglie et les macrophages périvasculaires. Les interactions CD200-CD200R conduit à une inactivation de la microglie et les maintient dans un état de surveillance (Kierdorf and Prinz, 2013; Neumann, 2001). Les cellules microgliales des animaux n'exprimant pas CD200 sont morphologiquement moins ramifiées et ont des prolongements plus courts. Par ailleurs, les cellules microgliales expriment plus des marqueurs immunohistochimiques d'activation microgliale comme CD11b et CD45. Dans ces souris, les cellules microgliales forment des agrégats qui sont typiquement trouvés lors de maladies neurodégénératives induisant une forte activation microgliale. Après une lésion du nerf facial des souris n'exprimant pas CD200, la réponse microgliale dans le noyau facial lésé est accélérée (Hoek et al., 2000). De plus, dans deux modèles animaux de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque et l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), le défaut d'expression de CD200 induit une activation rapide des cellules microgliales (Hoek et al., 2000). Par conséquent, ces données indiquent que la voie de signalisation CD200-CD200R régule le phénotype des cellules microgliales et en l'absence de cette voie de signalisation, les cellules microgliales adoptent un phénotype activé rapidement. CD200 serait donc un signal « off » d'activation microgliale (Biber et al., 2007).

CD47

CD47 (ou IAP pour « integrin associated protein ») est une protéine transmembranaire exprimée de façon ubiquitaire et interagissant avec les intégrines membranaires ainsi que la trombospondine-1 et SIRPalpha (« signal-regulatory protein alpha ») (Beek et al., 2005). SIRPalpha est exprimée par les cellules de la lignée myéloïde ce qui inclut les cellules microgliales. Le rôle le mieux connu de SIRPalpha est d'inhiber la phagocytose d'une cellule par les macrophages. En effet, la liaison du SIRPalpha microglial au CD47 exprimé par la cellule hôte crée un signal inhibiteur régulant négativement la phagocytose. Par conséquent, l'interaction CD47/SIRPalpha génère un signal « do not eat me » (Kierdorf and Prinz, 2013).

TREM2

TREM2 (triggering receptor expressed by myeloid cells-2) est un récepteur aux immunoglobulines de la famille TREM qui est exprimé par les sous-populations de cellules microgliales en conditions physiologiques (Schmid et al., 2002; Thrash et al., 2009). TREM2 s'associe avec DAP12 (DNAX adaptator protein-12), une molécule de signalisation afin de médier ces effets. Des mutations de perte-de-fonction de TREM2 ou DAP12 cause la maladie neurodégénérative de Nasu-Hakola caractérisée, entre autres, par une démyélinisation, une atrophie cérébrale et une forte activation microgliale. Ainsi, TREM2 et DAP12 jouent un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Les mécanismes de neurodégénération de cette maladie ne sont pas encore connus mais il a été proposé qu'un défaut de fonction de TREM2 ou DAP12 altère l'élimination des neurones apoptotiques par les cellules microgliales entraînant une accumulation de débris nécrotiques et de composés nocifs. En effet, le complexe TREM2/DAP12 jouerait un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire et dans la l'élimination des cellules apoptotiques. Il a été montré que le TREM2 microglial reconnaît un ligand TREM2 (TREM2-L) exprimé par les cellules apoptotiques et promouvant la phagocytose (Hsieh et al., 2009). De plus, l'inhibition de l'expression microgliale de TREM2 réduit la phagocytose des neurones apoptotiques et augmente l'expression de TNFalpha et NOS2 (nitric oxide synthase-2) (Takahashi et al., 2005). En revanche, une surexpression de TREM2 accroît la phagocytose et diminue la réponse pro-inflammatoire microgliale. Ainsi, une déficience fonctionnelle de TREM2 réduit l'élimination des neurones apoptotiques et l'inflammation ce qui pourrait être la cause de la dégénération observé chez les patients atteints de la maladie de Nasu-Hakola.

Dans le cas de la maladie d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, l'expression de TREM2 est augmentée dans les microglies de la moelle épinière lors des phases d'inflammation précoce et chronique et l'inhibition de TREM2 par des anticorps dirigés contre ce récepteur exacerbe la maladie avec une réponse inflammatoire augmentée (Piccio et al., 2007).

Le complexe TREM2/DAP12 microglial régulerait la phagocytose et la réponse inflammatoire ce qui réduirait la neurodégénération.

De plus, il a été montré qu'une perte de fonction de DAP12 au cours du développement induit des défauts de fonctions et de plasticité des synapses glutamatergiques au niveau des neurones pyramidaux de CA1 dans l'hippocampe à P18-25 (Roumier et al., 2004). Une des conséquences de la mutation de DAP12 est d'altérer l'accumulation de TrkB (le récepteur au BDNF) aux densités post-synaptiques et de modifier les effets du BDNF aux stades critiques de développement. Ainsi, TREM2/DAP12 faciliterait le développement et la maturation des synapses excitatrices.

5. Les récepteurs aux compléments

Le système du complément est composé d'une soixantaine de protéines circulantes et associées aux membranes qui agissent synergiquement et de façon séquentielle pour exécuter et réguler leurs fonctions. Au niveau du système immunitaire, le complément est la première ligne de défense contre les infections via une élimination rapide des pathogènes entrants et une régulation de la réponse immunitaire. De plus, le système du complément élimine les cellules du soi modifiées telles que les cellules apoptotiques et les débris cellulaires afin de protéger contre une auto-immunité. Les protéines circulantes du complément sont des protéines inactives jusqu'à ce qu'elles s'associent à une membrane cellulaire. Cette liaison de la protéine du complément à une membrane induit des modifications structurales.

Le complément est activé par 3 voies principales : la classique (déclenchée par C1q), l'alternative et celle des lectines (Figure 11). Toutes ces voies convergent vers le composé C3 du complément qui est la protéine effectrice ultime permettant l'élimination des pathogènes, de débris... Une fois que C3 est clivée en C3a et C3b, l'opsonisation avec les fragments C3b induit l'élimination des structures ciblées par phagocytose via les récepteurs C3 exprimés par les phagocytes (C3R/CD11b). Le fragment C3b peut également se lier à C4b2b issu de l'activation des voies classique et lectines pour former un complexe C4b2b3b (soit la C5 convertase) qui génère l'anaphylatoxine C5a reconnu par le récepteur C5aR exprimé par les phagocytes. Ce sont les interactions entre C3b/CR3 et C5a/C5aR qui induisent la phagocytose des structures marquées par le complément. Les composants du complément joueraient également un rôle dans la régulation de la production de cytokines ainsi que la chimiotaxie.

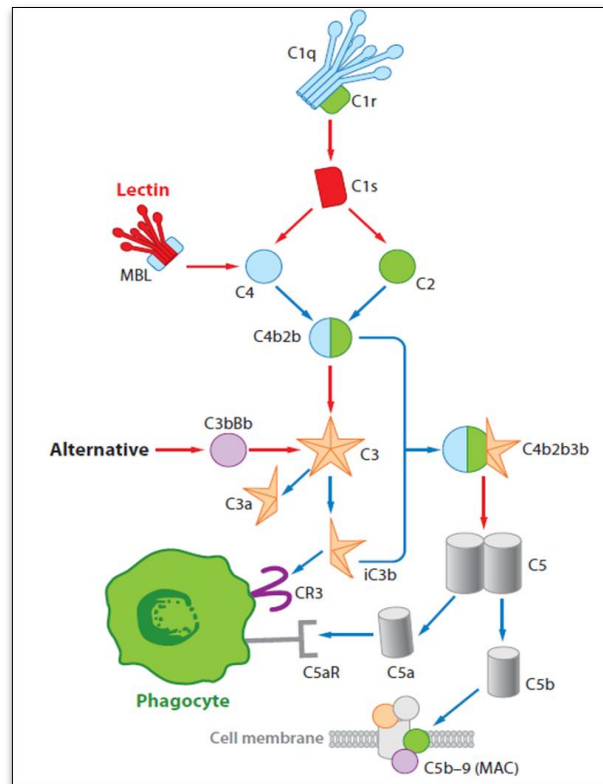


Figure 11: Les voies d'activation du complément
(issu de (Stephan et al., 2012))

Dans le SNC, les protéines du complément sont localement synthétisées par les neurones et les cellules gliales, cependant, la microglie et les astrocytes sont les principales sources de complément dans le SNC sain et malade. Les fonctions des protéines du complément dans le cerveau sont analogues à celles du système immunitaire : élimination du matériel cellulaire marqué. Les cellules microgliales étant les macrophages résidents du SNC, ce sont les seules cellules à exprimer C3R dans le SNC et ce seraient donc ces cellules qui participeraient à l'élimination du matériel opsonisé. Lors de maladies neurodégénératives, on observe une forte expression des composants du complément ainsi qu'une forte mort neuronale induite par de nombreux défauts moléculaires et cellulaires. Il a été montré que la mort neuronale serait précédée par un fonctionnement synaptique aberrant et une perte synaptique massive (Perry and O'Connor, 2010). Ainsi, ces dysfonctionnements et ces pertes synaptiques induiraient la mort neuronale et la progression de la maladie. Il a été proposé que le complément marque ces synapses dysfonctionnelles à éliminer et la microglie activée phagocyterait ces éléments (Perry and O'Connor, 2010). Ce processus au cours duquel la microglie élimine sélectivement les synapses de neurones lésés s'appelle « synapse stripping » (Blinzinger and

Kreutzberg, 1968). Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, on observe une forte dysfonction et perte des synapses dès le début de la maladie. Par ailleurs, cette maladie est caractérisée par une forte activation microgliale et augmentation d'expression et d'activation des composants du complément. En effet, il y a 80 fois plus de C1q (Yasojima et al., 1999) et un défaut d'expression de C1q réduit la perte de synapse et améliore les fonctions cognitives (Fonseca et al., 2004) impliquant ainsi directement la voie classique du complément dans cette maladie. Par conséquent, l'activation par dysfonctionnement synaptique de la cascade classique du complément dans la maladie d'Alzheimer faciliterait la progression de la maladie via élimination des synapses. De façon analogue, de fort taux de C1q ont été trouvés dans la moelle épinière de souris transgénique modèle de la sclérose en plaque (Hovden et al., 2013) et on peut supposer que les composants du complément marqueraient les axones des motoneurones atteints dans cette maladie neurodégénérative.

Par conséquent, les protéines du complément permettent la reconnaissance et l'élimination des éléments dysfonctionnels par les cellules microgliales.

6. Les récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Les éléments du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) sont des molécules transmembranaires de la superfamille des immunoglobulines (pour revue (Shatz, 2009)). Ces éléments sont en particulier connus pour leurs rôles dans le système immunitaire et les interactions cellulaires médiées lors de réponses immunitaires. En effet, l'une de leurs principales fonctions est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T cytotoxiques déclenchant la mort de la cellule présentatrice d'antigène.

Mais, les molécules du CMH I ne participent pas seulement aux interactions cellulaires lors des fonctions immunitaires. En effet, elles pourraient jouer un rôle dans des signalisations neuronales et sculpteraient des changements de connectivités synaptiques dépendantes de l'activité. Ainsi, dans le SNC, il a été mis en évidence que les neurones expriment *in vivo* les ARNm du CMH I et que leur expression est modulée par l'efficacité synaptique (Corriveau et al., 1998).

Par ailleurs, les CMH I et leurs récepteurs jouent également un rôle dans l'élimination des synapses au cours du développement (Xu et al., 2010). En effet, des souris présentant des mutations au niveau des gènes des protéines du CMH de classe I ont une ségrégation œil-spécifique incomplète des projections des axones des cellules du ganglion rétinale (RGC), une augmentation de la densité dendritique des RGCs et un défaut de la neurotransmission excitatrice glutamatergique. Etant donné que les cellules microgliales sont les seules cellules immunitaires présentes dans le cerveau et capables de reconnaître les éléments du CMH, on peut supposer qu'un défaut de reconnaissance des éléments neuronaux à éliminer par les cellules microgliales induit ces défauts.

L'élagage synaptique développemental impliquant des voies de signalisation dépendantes du CMH permet également la maturation des réseaux synaptiques et impliquerait une action des cellules microgliales.

V. Les principales fonctions des cellules microgliales en conditions physiopathologiques

1. Les fonctions de la microglie en conditions physiologiques

a. Une surveillance dynamique et constante du parenchyme cérébral

Dans le SNC, les cellules microgliales en conditions physiologiques contrôlent et surveillent continuellement l'état de l'environnement dans lequel elles se situent. En effet, dans ces conditions, les cellules microgliales sont caractérisées par un soma de petite taille à partir duquel de longs et fins prolongements hautement ramifiés s'étendent. L'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP spécifiquement sous un promoteur de la microglie a permis d'étudier le comportement de ces cellules *in vivo* en imagerie bi-photonique (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Ces prolongements microgliaux sont très mobiles et ils sont en permanence impliqués dans des cycles de rétraction/extension rapides suggérant des réorganisations permanentes du cytosquelette. Cette surveillance dynamique du parenchyme permet aux cellules microgliales de détecter rapidement des

changements anormaux du milieu comme lors d'infections, de lésions, de neurodégénération, de changements d'activité neuronale importante...

Ce comportement dynamique des prolongements microgliaux est sous la dépendance d'une signalisation purinergique médiée par les récepteurs microgliaux P2Y₁₂. En effet, aucune extension des prolongements microgliaux n'est observée dans des animaux n'exprimant pas P2Y₁₂ (Haynes et al., 2006). Ces données indiquent que l'extension rapide des prolongements microgliaux nécessite l'activation des récepteurs P2Y₁₂ par l'ATP présent dans le milieu extracellulaire. L'activation des récepteurs P2Y₁₂ active les intégrines-beta1 microgliales qui s'accumulent à la pointe des prolongements et permettent une adhésion à la matrice extracellulaire (Ohsawa et al., 2010).

De plus, la voie de signalisation neurone/microglie, fractalkine/CX3CR1, régulerait ce comportement dynamique des prolongements microgliaux. L'imagerie *ex vivo* d'explants de rétine indique que les prolongements des cellules microgliales sont moins dynamiques chez des souris déficientes en CX3CR1 (Liang et al., 2009). Ainsi bien que la signalisation CX3CR1 ne soit pas requise pour ces fonctions de mobilité des prolongements, elle permet cependant de réguler ce comportement. Ces données montrent que la motilité des prolongements dépend d'une régulation par les chimiokines neuronales indiquant que les neurones modulent le comportement dynamique des cellules microgliales.

Par ailleurs, cette fonction de balayage du parenchyme cérébrale aurait d'autres rôles que l'attente d'un signal d'activation. En effet, au cours des enregistrements réalisés *in vivo*, les auteurs se sont aperçus que les prolongements des cellules microgliales effectuaient des « pauses » soient des périodes statiques de 4-5 minutes. Ces périodes statiques pourraient servir à éliminer du parenchyme des produits métaboliques accumulés ainsi que les composés tissulaires détériorés. Nimmerjahn et collaborateurs ont montré que les prolongements des cellules microgliales formaient des terminaisons bulbeuses indiquant un ramassage de matériels qui sont par la suite dégradés dans des compartiments présents au niveau du soma. Par ailleurs, cette inspection du microenvironnement permettrait également aux cellules microgliales de contrôler l'état des cellules composant le milieu. En effet,

toujours dans l'étude réalisée par Nimmerjahn, il a été observé que les cellules microgliales entraient en contact avec les autres types cellulaires. Ainsi, les cellules microgliales contacteraient les astrocytes, les neurones et les vaisseaux sanguins. Par ailleurs, l'utilisation de souris dans lesquelles les neurones et les cellules microgliales expriment des protéines fluorescentes différentes a permis d'étudier les interactions neurones-microglies dans le SNC en conditions physiologiques (Wake et al., 2009). Wake et collaborateurs ont montrés qu'au cours des « pauses » des prolongements microgliaux, ces derniers contactaient les éléments clés du circuit neuronal soit les synapses. En effet, les prolongements bulbeux des cellules microgliales forment des contacts avec les épines dendritiques et les synapses (éléments pré- et post-synaptiques). De plus, l'activité synaptique module la fréquence des contacts microglie/synapse. La réduction de l'activité synaptique basale par déprivation sensorielle, injection de TTX (tetrodotoxin) ou abaissement de la température corporelle réduit la fréquence de ces interactions. Des effets de la régulation de la fréquence des contacts neurones/microglie ont également été montrés dans le cortex visuel de souris âgées de 28 jours soumises à des déprivations de lumière à long terme (Tremblay et al., 2010). Par conséquent, les cellules microgliales surveillent l'état fonctionnel des synapses par des contacts rapides en conditions physiologiques alors que lors de conditions pathologiques telles que l'ischémie les cellules microgliales forment des contacts d'une heure avec les synapses présentes dans la pénombre qui aboutit généralement à la disparition de la synapse. Mais quelles instructions moléculaires permettent à la microglie de ressentir l'activité synaptique ? Etant donné le vaste répertoire de récepteurs exprimés au niveau des prolongements des cellules microgliales telles que les récepteurs au glutamate, au GABA, à l'ATP,...(Pocock and Kettenmann, 2007) on peut supposer que ce sont via ces récepteurs que les cellules microgliales détectent le niveau de l'activité des synapses présentes dans le territoire qu'elles contrôlent. Fontainhas et al ont montré que les neurotransmissions glutamatergiques et GABAergiques régulent indirectement le comportement des cellules microgliales (Fontainhas et al., 2011).

b. Contrôle de la plasticité synaptique à long terme

Les cellules microgliales modulent également la plasticité synaptique dans le SNC mature via une régulation de la LTP (long-term potentiation). La LTP est un modèle cellulaire de mémoire reflétant une plasticité synaptique à long terme. Dans une étude menée en 2011 par l'équipe de Carmelina Gemma (Rogers et al., 2011), les auteurs ont montré que des animaux CX3CR1^{-/-} adultes sains présentaient des défauts d'induction de LTP hippocampal causant des défauts de formation de mémoire associative et spatiale dépendantes des mécanismes moléculaires hippocampiques. Ainsi, une voie de signalisation neurone/microglie (fractalkine/CX3CR1) est impliquée dans des fonctions synaptiques permettant la formation de la mémoire chez l'adulte en conditions physiologiques. De plus, les déficits observés au niveau de la LTP chez les animaux CX3CR1^{-/-} sont dus à une surproduction de la cytokine pro-inflammatoire IL1beta par les cellules microgliales activées. De plus, une perturbation d'une autre voie de signalisation neurone/microglie, la voie CD200/CD200-R, induit également des défauts d'induction de la LTP (Costello et al., 2011). Dans ces animaux CD200^{-/-}, les cellules microgliales présentent aussi un phénotype activé et elles libèrent plus de TNFalpha ce qui inhibe l'induction de la LTP. Ainsi, en conditions physiologiques, plusieurs voies de signalisation neurone/microglie contrôle le phénotype des cellules microgliales ainsi que les niveaux de cytokines libérées qui influencent la plasticité synaptique à long terme.

c. Modulation de l'activité synaptique

Les cellules microgliales réagissent rapidement aux changements de l'activité neuronale par une modulation des contacts physiques avec les éléments synaptiques (Wake et al., 2009). Les cellules microgliales sont donc des senseurs de l'activité neuronale et un contrôle réciproque de la neurotransmission par les cellules microgliales peut être attendue (Béchade et al., 2013). Des modulations de l'activité synaptiques par les cellules microgliales ont été observées en culture. En effet, un milieu conditionné par les cellules microgliales augmente l'amplitude et la durée des courants induits par les récepteurs NMDA (Hayashi et al., 2006; Moriguchi et al., 2003). Ainsi, des facteurs

solubles libérés par les cellules microgliales pourraient réguler la transmission synaptique en conditions physiologiques.

Les cellules microgliales produisent de nombreuses molécules qui pourraient influencer directement la transmission synaptique comme les cytokines, les neurotransmetteurs et les protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, la cytokine TNFalpha est une cytokine connue pour contrôler les fonctions synaptiques de base ainsi que la plasticité (Beattie et al., 2002; Santello et al., 2011). Il a d'abord été proposé que les fonctions médiées par le TNFalpha proviennent du TNFalpha sécrété par les astrocytes (Stellwagen and Malenka, 2006) mais de plus en plus d'études suggèrent qu'elles découlent plutôt d'un TNFalpha libéré par la microglie. En effet, les astrocytes ont souvent été considéré comme source de TNFalpha mais il apparaît maintenant clairement que la plupart des cultures astrocytaires utilisées pour montrer ces effets sont contaminées par des cellules microgliales (Saura, 2007). Par ailleurs, l'analyse du transcriptome d'astrocytes purifiés révèlent qu'il n'y pas de transcrits codant pour TNFalpha dans les astrocytes (Zamanian et al., 2012). Ainsi, le TNFalpha contrôlant plusieurs aspects de la transmission synaptique serait produit par les cellules microgliales.

Il a également été montré que les cellules microgliales peuvent créer et fusionner des microvésicules contenant IL1beta quelques secondes après une stimulation par l'ATP probablement via un mécanisme dépendant de l'activation des récepteurs P2X₇ (Bianco et al., 2005). En effet, Bianco et collaborateurs ont montré que l'ATP provenant des astrocytes était suffisant à induire la fusion de vésicules contenant IL1beta sous forme active au niveau des cellules microgliales non-activées. Mais quel est l'effet de la libération de ces microvésicules microgliales sur la transmission synaptiques ? L'analyse des événements synaptiques excitateurs de neurones en culture exposés à ces vésicules microgliales indiquent que les microvésicules induisent une augmentation de la fréquence des courants synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC) via une modulation pré-synaptique (Antonucci et al., 2012). De plus, l'injection de microvésicules dans le cortex visuel de rat induit une augmentation aigue de l'amplitude des potentiels de champs évoqués par des stimuli visuels. La stimulation de l'activité synaptique découlerait d'une augmentation du métabolisme sphingolipidique neuronal car le blocage de l'expression de sphingolipides inhibe l'augmentation de la transmission

synaptique excitatrice. L'importance physiologique de ce mécanisme de communication neurone/microglie reste cependant à démontrer.

Une stimulation des cellules microgliales via CX3CR1 pourrait également moduler les fonctions synaptiques. En effet, l'application de fractalkine sur des neurones en cultures induit une modulation forte et rapide des courants calciques dans les neurones (Meucci et al., 1998). Ainsi, l'activation des récepteurs CX3CR1 microgliaux régulerait via des mécanismes encore inconnus l'activité calcique neuronale. De plus, des cellules microgliales stimulées par la fractalkine induisent une réduction transitoire de l'amplitude des EPSCs évoqués dans les neurones pyramidaux de CA1 dans des tranches aigues d'hippocampe et cet effet serait dû à une augmentation des conductances calciques (Ragozzino et al., 2006). Par la suite, il a été montré que cette réduction des EPSCs impliquée l'activation des récepteurs neuronaux à l'adénosine A3 (Piccinin et al., 2010). Il est probable que la fractalkine induit une libération d'adénosine par les cellules microgliales qui inhibe la libération pré-synaptique de glutamate via activation des récepteurs A3. De plus, les cellules microgliales peuvent également libérer de l'ATP qui est rapidement dégradé en adénosine par des ectonucléotidases. Cependant, une implication de la libération d'ATP par les astrocytes n'est pas à exclure.

Les cellules microgliales contrôlent également l'activité neuronale via un contact avec les neurones présentant une forte activité. Récemment, il a été montré *in vivo* que les cellules microgliales contactent les synapses et modifie l'excitabilité neuronale en utilisant les larves de poisson-zèbre comme modèle (Li et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'une élévation de l'activité neuronale locale attire les prolongements des cellules microgliales via une signalisation purinergique et ces contacts neurone-microglie abaisseraient l'activité du neurone ciblé. Ainsi, en conditions physiologiques, les cellules microgliales contrôlent la régulation homéostatique de l'activité neuronale.

d. Régulation de la neurogénèse adulte

Les cellules microgliales régulent également la neurogénèse adulte. Dans le cerveau adulte, deux niches neurogéniques localisées au niveau de la zone sous-ventriculaire située sous les ventricules latéraux et du gyrus denté de l'hippocampe produisent de nouveaux neurones tout au long de la vie (Taupin and Gage, 2002). Ces niches se composent de cellules souches multi-potentes pouvant donner des neurones ou des astrocytes et elles ont un fort taux de prolifération. Lors de la neurogénèse, seulement un petit nombre de cellules nouvellement créées survivent et sont incorporées au réseau neuronal ce qui signifie que la majorité des cellules immatures meurent par apoptose. Il existe donc une fine balance entre la survie et la différenciation de certaines cellules et l'élimination des cellules apoptotiques dans l'hippocampe adulte. Les cellules microgliales pourraient intervenir dans ces processus. En effet, il a été montré que les cellules microgliales ramifiées présentes au niveau du gyrus denté phagocytent les cellules apoptotiques en conditions physiologiques (Sierra et al., 2010). De façon intéressante, les cellules microgliales reconnaissent les cellules apoptotiques et les éliminent sans passer par un état d'activation.

De plus, les cellules microgliales peuvent promouvoir la migration et la différenciation des cellules nouvellement produites par libération de certains facteurs solubles (Aarum et al., 2003). Dans l'étude *in vitro* menée par Aarum, une co-culture de cellules souches neurales avec des cellules microgliales ou du milieu conditionné par la microglie permet la migration des cellules neurales et une différenciation en neuroblastes. Les effets de la microglie sur ces processus seraient donc médier par des facteurs solubles qui restent à déterminer. Le TGFbeta et IL4 pourraient être de bonnes molécules candidates (Kohman and Rhodes, 2013). De plus, les cellules microgliales pourraient également réguler la prolifération des cellules souches présentes dans les niches neurogéniques. En effet, la voie de signalisation neurone/microglie fractalkine/CX3CR1 est impliquée dans la régulation de la neurogénèse via un contrôle de la prolifération des cellules souches (Maggi et al., 2011; Rogers et al., 2011).

En résumé, les cellules microgliales régulent la neurogénèse chez l'adulte via un contrôle de la prolifération, de la migration et de la différenciation des cellules souches mais également via une élimination des cellules immatures apoptotiques.

e. Elimination des synapses ?

Nous avons vu précédemment que les cellules microgliales influencent la plasticité synaptique à long terme de synapses existante mais elles pourraient également contribuer à des changements structuraux plus profonds. En effet, on peut émettre l'hypothèse que lors d'événements physiologiques tels que la mémoire ou l'apprentissage, les changements d'efficacité synaptique induits par ces processus pourraient amener les cellules microgliales à phagocyter les synapses devenues faibles. Nous verrons par la suite que des mécanismes similaires d'élimination des synapses existent au cours du développement (« synapse pruning ») et lors de conditions pathologiques (« synapse stripping »). On peut donc suggérer un rôle de phagocytose de certaines synapses par les cellules microgliales lors de conditions physiologiques. Cependant des études plus précises sont nécessaires afin de clarifier l'existence d'un tel mécanisme.

2. Les fonctions de la microglie en conditions pathologiques

Les cellules microgliales sont extrêmement sensibles aux changements survenant dans leur microenvironnement et elles sont considérées comme les senseurs de pathologies (Kreutzberg, 1996). En réponse aux perturbations homéostatiques, elles adoptent un phénotype particulier en réponse à ces changements. Il est important de noter qu'il n'existe pas un seul type d'activation microgliale mais plusieurs phénotypes de microglies activées qui répondent à un stimuli précis en fonction de l'environnement (pour revue (Ransohoff and Perry, 2009)). L'activation microgliale est donc un processus complexe qui leur permet d'exercer des fonctions particulières dans contexte d'activation précis. Par ailleurs, l'activation des cellules microgliales a un effet double : neuroprotection versus neurotoxicité. En effet, dans certaines conditions d'activation, les cellules microgliales exacerbent et facilitent la progression de l'inflammation alors que dans d'autres circonstances elle aura un effet bénéfique et protégera le fonctionnement des activités cérébrales. Dans cette partie, je ne présente pas

une revue exhaustive des fonctions des cellules microgliales et pointe seulement les plus générales en mettant l'accent sur les fonctions modulant l'activité synaptique.

a. Motilité et migration vers le site lésé

Précédemment, nous avons vu que les cellules microgliales ramifiées en conditions pathologiques ont des prolongements très dynamiques leur permettant de contrôler l'état de leur environnement sans mouvement du soma (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Lors de lésion réalisée par un laser, la réponse microgliale est immédiate et on observe un mouvement ciblé des prolongements microgliaux vers le site lésé (Davalos et al., 2005; Dibaj et al., 2010; Nimmerjahn et al., 2005). Les prolongements situés du côté opposé de la lésion se rétractent et on observe une extension des prolongements se situant du côté lésé vers la lésion. De plus, les prolongements microgliaux se dirigeant vers le site lésé se déplacent de façon synchronisée. Par ailleurs, le nombre de cellules microgliales répondant dépend de la sévérité de la lésion réalisée. En général, ce sont seulement les cellules microgliales situées dans le voisinage immédiat de la lésion qui s'activent alors que celles présentes plus loin ($>90\text{ }\mu\text{m}$) ne répondent pas ou plus tardivement. Lors des lésions réalisées par laser, le soma des cellules microgliales reste fixe et ce sont seulement les prolongements des cellules microgliales mobilisées qui se déplacent vers la lésion. Davalos et al ont montré que la lésion réalisée par laser induit une forte libération d'ATP par les cellules endommagées créant un signal « find me » qui active les récepteurs P2Y₁₂ microgliaux (Haynes et al., 2006). L'hypothèse que l'ATP active les récepteurs purinergiques astrocytaires qui induit la libération d'un ATP astrocytaire activant les P2Y₁₂ microgliaux n'est pas à exclure. De plus, ce mouvement polarisé des prolongements microgliaux vers une source d'agoniste des récepteurs P2Y₁₂ est plus rapide lors d'activation des cellules microgliales en conditions pathologiques et résulterait d'une augmentation de l'expression de ces récepteurs (Avignone et al., 2008). Cette convergence des prolongements microgliaux vers le site endommagé serait bénéfique car elle préviendrait l'extension de la lésion au tissu proche limitant ainsi une propagation de substances toxiques (Hines et al., 2009). On peut également supposer que les prolongements des cellules microgliales au niveau du site lésé vont jouer un rôle dans l'élimination des cellules touchées par la lésion.

De plus, un mouvement migratoire de la cellule entière a été observé (Dibaj et al., 2010). En effet, lors de sections des axones par laser dans la moelle épinière, un mouvement migratoire des cellules microgliales est observé. Ce résultat s'oppose à celui obtenu par Davalos et collaborateurs où aucun mouvement microglial migratoire n'est observé lors de lésion dans le cortex. Par ailleurs, Dibaj et al ont montré que la voie de signalisation NO/cGMP module l'extension des prolongements microgliaux ainsi que la migration du soma vers une lésion réalisée dans la moelle épinière (Dibaj et al., 2010). Les auteurs de cette étude proposent que lors de lésion, l'ATP et le NO sont libérés simultanément et les actions de ces deux molécules permettent le recrutement des cellules microgliales. L'ATP attire les prolongements microgliaux via une activation des P2Y₁₂ qui induit une polarisation de la cellule et la motilité. Le NO active des guanylates cyclases solubles qui convertissent le GTP intracellulaire en cGMP mobilisant le cytosquelette microglial.

Dans des contextes pathologiques, un mouvement migratoire de la cellule entière a également été observé. Par exemple, l'étude du comportement des cellules microgliales par imagerie *in vivo* dans des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer a permis d'observer un mouvement des prolongements et par la suite du soma vers les plaques amyloïdes (Bolmont et al., 2008). De plus, les cellules microgliales sous-ventriculaires migrent lors de lésions péri-ventriculaires (Carbonell et al., 2005). Cette étude de vidéo-microscopie confocale indique que les cellules microgliales migrent sur plusieurs centaines de micromètres dans le parenchyme vers la lésion touchant l'hippocampe. Dans le cas de l'ischémie, les cellules microgliales présentes dans le parenchyme s'activent et migrent vers la zone touchée formant un tissu cellulaire extrêmement dense au niveau de la pénombre offrant une certaine neuroprotection (Neumann et al., 2006). Ce rapprochement des cellules microgliales vers les zones lésées ou des protéines anormales accumulées leur permettrait de contenir la menace pour les autres cellules saines mais également de jouer leur rôle dans la phagocytose de ces éléments.

Cette migration des cellules microgliales vers les sites lésés serait également contrôlée par une signalisation cellulaire impliquant les chimiokines. La voie de signalisation neurone/microglie, CXCL10/CXCR3, permet le recrutement et la migration des cellules microgliales après lésion du

cortex enthorinal au niveau de la zone de dégénération axonale. Ce recrutement des cellules microgliales ne s'opère pas dans des animaux n'exprimant pas le récepteur microglial CXCR3 (Rappert et al., 2004). La signalisation fractalkine/CX3CR1 interviendrait également dans le recrutement et la migration des cellules microgliales. En effet, lors de lésion réalisée par un laser dans des explants de rétine, les cellules microgliales adoptent un mouvement migratoire caractérisé par une translocation du soma (Liang et al., 2009). Les cellules microgliales présentes dans les rétines d'animaux CX3CR1^{-/-} ont une vitesse de migration moyenne plus lente par rapport aux hétérozygotes. Ces basses vitesses de migration de cellules microgliales dans des animaux CX3CR1^{-/-} ont été observé dans une autre étude (Cardona et al., 2006). Le défaut d'expression de CX3CR1 induirait un défaut de recrutement et de migration des cellules microgliales dans des animaux modèles de maladies neurodégénératives (Parkinson et sclérose en plaque).

b. Neurotoxicité et neuroprotection : le double rôle des facteurs solubles

En général, lors de changements pathologiques de l'homéostasie cérébrale, la réponse inflammatoire initiale résulte en une lésion neuronale accompagnée d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Les cellules microgliales s'activent en quelques minutes (macrophages M1 aussi appelés pro-inflammatoires) et libèrent une variété de facteurs pro-inflammatoires : TNFalpha, IL1beta, IL12, IL6, COX2, ROS, RNS, NO, glutamate, acide quinolinique, histamine, CCL2, CCL3,...(Hernandez-Ontiveros et al., 2013; Jack et al., 2005; Weinstein et al., 2010). La libération de ces facteurs neurotoxiques accentue les dommages neuronaux provoquant la mort de ces cellules. Par exemple, dans un modèle de culture cellulaire mimant le développement de la pénombre lors d'ischémie, les neurones déprivés en oxygène et glucose libèrent du glutamate activant les cellules microgliales via des récepteurs métabotropiques (Kaushal and Schlichter, 2008). L'activation microgliale déclenche la surproduction de TNFalpha qui va amener les neurones à entrer en apoptose via une voie dépendante de caspase-3. Autre exemple, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les protéines beta-amyloïdes ou leurs précurseurs APP (amyloid precursor protein) activent les cellules microgliales qui en libérant du TNFalpha et IL1beta déclenchent la mort neuronale (Combs et al., 2001). Ainsi, dans un premier temps, la microglie adopte un phénotype d'activation classique ayant

des effets neurotoxiques pour son environnement. Les cellules microgliales gardent ce phénotype pendant une période plus ou moins longue selon la pathologie. En effet, dans des animaux modèles de trauma, ce phénotype microglial pro-inflammatoire disparaît en quelques mois, évoluant vers un phénotype microglial activé anti-inflammatoire jouant un rôle dans la réparation et la reconstruction des tissus nerveux. Cependant, l'analyse de cerveaux d'animaux modèles d'impact contrôlé cortical (CCI) indique que les cellules microgliales peuvent rester activées pendant un an. Dans ce genre de pathologie, on parle d'une persistance de l'inflammation chronique médiée par la microglie.

Ainsi, les cellules microgliales adoptent un phénotype activé pro-inflammatoire lors de changements homéostatiques induisant de forts effets neurotoxiques. Mais il a également été montré que les cellules microgliales changent d'état d'activation après une certaine période et adopte un phénotype alternatif (macrophages M2 aussi appelés anti-inflammatoires) soutenant la réparation et la reconstruction du parenchyme après des dommages causés au SNC (Czeh et al., 2011). Ce changement d'état d'activation est médiée par de nombreux facteurs tels que les cytokines anti-inflammatoires IL4, IL10, IL13, et TGFbeta. Dans ces conditions, les cellules microgliales libèrent peu de facteurs pro-inflammatoires et de forte quantité de facteurs anti-inflammatoires et neurotrophiques. Les cellules microgliales visent à promouvoir la survie des cellules. Lorsque les cellules microgliales adoptent ce phénotype dé-activé, elles libèrent TGFbeta, TNFalpha, NGF, BDNF, GDNF, IGF1,... On peut noter que le TNFalpha à forte concentration est neurotoxique alors qu'à faible dose il est neuroprotecteur (Bruce et al., 1996). En effet, le TNFalpha microglial est neuroprotecteur lors d'ischémie cérébrale focale via une action sur son récepteur TNF-p55R et un défaut d'expression de ce facteur par la microglie exacerbe la maladie (Lambertsen et al., 2009). Le facteur TGFbeta1 régule la réponse inflammatoire lors de neurodégénération chronique et limite la mort neuronale survenant dans les maladies à prion (Boche et al., 2006). De plus, TGFbeta1 réduirait la formation des plaques amyloïdes dans des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, les cellules microgliales ne sont pas les seules à s'activer lors de changements de l'homéostasie cérébrale et un dialogue cellulaire entre les cellules microgliales, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones se met en place afin d'établir une réponse adaptée à la situation. Par

exemple, les cellules microgliales via une production d'IL6 communiquerait avec les astrocytes afin d'induire la réparation du tissu cérébral lors d'axotomie du nerf facial (Streit et al., 2000). De plus, lors de maladies engendrant une perte de myéline telles que la sclérose en plaque, les cellules microgliales phagocytent les débris de myéline et participent au recrutement des oligodendrocytes afin de rétablir la gaine de myéline nécessaire une transmission synaptique de qualité (Rawji and Yong, 2013).

Cependant, l'activité microgliale n'est pas manichéenne et il existe une balance entre les activités pro- et anti-inflammatoires lors de conditions pathologiques traduisant les effets neurotoxiques et neuroprotecteurs. La fine régulation des activités sécrétoires des cellules microgliales module la sévérité de l'inflammation ainsi que la réparation des tissus endommagés.

c. Phagocytose du matériel cellulaire endommagé

En tant que macrophages résidents du SNC, une des fonctions les mieux connues des cellules microgliales est sa capacité de phagocyter du matériel cellulaire (Napoli and Neumann, 2009). Lorsque les cellules meurent, elles libèrent de nombreux médiateurs cytotoxiques pouvant endommager les cellules saines environnantes, une élimination rapide et efficace de ces cellules mourantes est donc requise afin de protéger le tissu. La phagocytose est un mécanisme complexe régulée par des signaux captés par les cellules microgliales. Les cellules microgliales expriment plusieurs types de récepteurs qui sont impliqués dans la phagocytose. Les cellules en apoptose ou nécrotiques recrutent les phagocytes présents dans leur voisinage immédiat ou éloignés ou même à partir de la circulation. Pour faciliter le recrutement des cellules microgliales, les cellules en mort cellulaire produisent et libèrent un signal « find me ». Comme nous l'avons vu précédemment, l'ATP libéré par les cellules endommagées pourrait constituer un signal guidant les cellules microgliales vers leurs cibles via activation des récepteurs P2Y₁₂ microgliaux. De plus, les cellules endommagées libèrent également de l'UTP, un agoniste des récepteurs P2Y₆ et qui constitue un signal « eat me ». Les cellules microgliales expriment fortement les P2Y₆ lors de conditions pathologiques. Les neurones

endommagés par l'acide kainate libèrent de forte quantité d'agoniste des P2Y₆ qui reconnu par la microglie conduit à l'élimination des cellules et des débris associés (Koizumi et al., 2007).

De plus, les signaux « eat me » peuvent être exprimés à la surface des cellules apoptotiques et servent de marqueurs de reconnaissance aux phagocytes afin de les éliminer. Il existe deux types de récepteurs impliqués dans la phagocytose (Ravichandran, 2003). Premièrement, les récepteurs reconnaissant les microbes comme les TLRs qui éliminent les pathogènes et simultanément stimulent la réponse pro-inflammatoire microgiale (voir la partie IV.3 Les récepteurs Toll-like). Deuxièmement, les récepteurs reconnaissant le matériel cellulaire apoptotique qui sont des récepteurs reconnaissant les phosphatidylsérine (PS). Ces seconds récepteurs sont importants pour l'ingestion des corps cellulaires apoptotiques et pour la stimulation de la réponse anti-inflammatoire (sécrétion TGF-beta1, PGE₂ et IL10). Les PS sont normalement exprimés au niveau de la couche interne de la membrane et lors d'apoptose, ils se transloquent au niveau de la couche externe de la membrane via l'action de flippases. Les PS sont reconnus par plusieurs récepteurs microgiaux (le récepteur aux PS, CD14, CD36 et CD91) qui coopèrent les uns avec les autres. Cependant, d'autres signaux « eat me » existent et sont exprimés à la surface des cellules apoptotiques tels que les particules lipoprotéines à basse densité oxydées, la trombospondine-1, C1q ou C3b...(Lauber et al., 2004).

d. Elimination des synapses affaiblies : le « synapse stripping »

Les cellules microgiales sont impliquées dans le remodelage synaptique dans le SNC adulte. Ces cellules contactent de façon sélective les synapses dans leur entourage (Wake et al., 2009). Ces contacts intimes entre les cellules microgiales et les synapses suggèrent que les cellules microgiales seraient engagées dans le processus d'élimination des synapses de neurones endommagés appelé « synapse stripping » (Blinzinger and Kreutzberg, 1968)(Figure 12). Une lésion du nerf facial induit une rétraction et une perte des boutons synaptiques de la surface du corps cellulaire et des dendrites proximales des motoneurones du noyau facial. Les cellules microgiales seraient responsables de l'élimination de ces contacts synaptiques comme le suggère l'étude de microscopies électronique et confocale de Blinzinger et Kreutzberg indiquant la présence de cellules microgiales proches des

terminaisons synaptiques. Dans ce modèle de lésion du nerf facial, les cellules microgliales prolifèrent, migrent et interagissent avec les motoneurones via une élimination des entrées synaptiques.

Des résultats similaires ont été observés dans un modèle expérimental de démyélinisation et d'inflammation corticale par injection de bactéries BCG neutralisées (Trapp et al., 2007). Dans ce modèle d'activation des cellules microgliales corticales s'activent et se positionnent proches des corps cellulaires des neurones au niveau du site d'injection. Elles participeraient à l'élimination de 45% des synapses axosomatiques et cette élimination des contacts synaptiques n'entraîne pas la mort neuronale. Par conséquent, Trapp et collaborateurs ont proposé que le « synapse stripping » soit neuroprotecteur. Les cellules microgliales activées libéreraient des facteurs neurotrophiques au niveau des cellules qu'elles contactent favorisant leur survie. De plus, la majorité des synapses présentes au niveau du soma des neurones corticaux sont GABAergiques, i.e. inhibitrices. La perte des synapses axosomatiques réduirait les entrées inhibitrices et par conséquent abaisserait le seuil d'activation des récepteurs NMDA dont l'activité est associée à la survie cellulaire. Ainsi, la perte transitoire des contacts axosomatiques inhibiteurs promouvrait la survie neuronale.

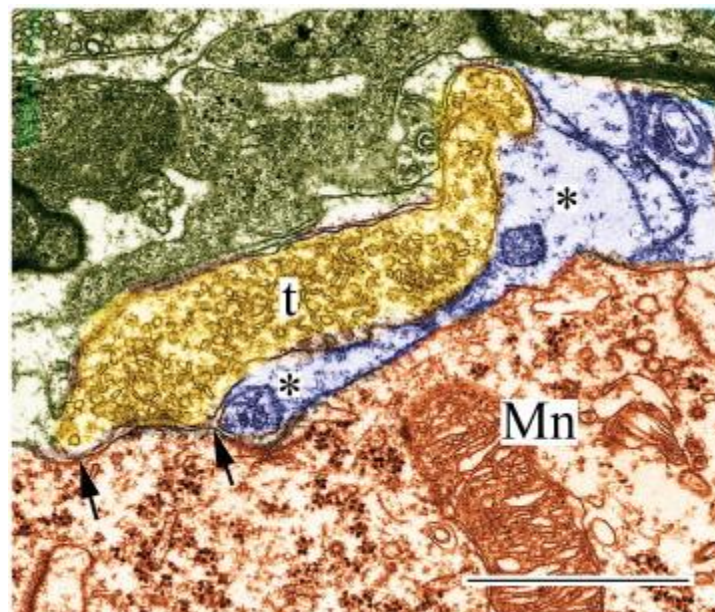


Figure 12: Exemple de "synapse stripping" après une lésion axonale
(Oliveira et al., 2004)

Image de microscopie électronique montrant un détachement partiel d'une terminaison nerveuse (« t » en jaune) à partir d'un motoneurone (« Mn » en orange) dans la moelle épinière une semaine après une

lésion du nerf sciatique. On peut noter la présence d'un prolongement glial entre les membranes du motoneurone et de la terminaison.

De plus, une baisse de l'activité synaptique précédant l'élimination des synapses a été observée au niveau des motoneurones vagues après une axotomie (Yamada et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'il y avait une diminution de la fréquence des courants spontanés et miniatures excitateurs et inhibiteurs post-synaptiques avant la diminution du nombre des terminaux pré-synaptiques et l'apposition de cellules microgliales à la surface des motoneurones lésés. Yamada et collaborateurs suggèrent que les cellules gliales libèrent de l'ATP et son métabolite, l'adénosine, qui inhibent la libération de glutamate et de GABA avant que les microglies éliminent les afférences synaptiques.

Quel mécanisme moléculaire intervient dans le « synapse stripping » ? Dans le modèle de lésion du nerf facial, la lésion apparaît de façon distale par rapport au contact synaptique. Par conséquent, un signal crée au niveau de la lésion arrive au niveau du soma du neurone et par la suite aux contacts pré-synaptique pour initier le retrait des contacts. Récemment, il a été proposé que ces signaux activent une expression *de novo* de la nNOS (neuronal nitric oxide synthase) dans les motoneurones (Moreno-López et al., 2011; Perry and O'Connor, 2010). Des études ont montré qu'il y avait une augmentation de l'expression de nNOS avant le retrait des contacts synaptiques. De plus, des manipulations pharmacologiques de nNOS indiquent qu'en absence de NO pré-synaptique, le retrait est arrêté. Ainsi, le NO est suffisant et nécessaire à l'induction du détachement synaptique. Ce mécanisme implique des actions rétrogrades et paracrines du NO au niveau des structures pré-synaptiques activant par la suite plusieurs voies de signalisation dont celle des ROCK (RhoA/Rho kinase) (Sunico et al., 2010). L'activation des ROCK promeut la phosphorylation des protéines présentes au niveau des chaînes de myosine légère entraînant l'activation de la myosine et une contraction actomyosine. Ces événements causeraient la rétraction des neurites, étape importante du retrait synaptique. Ces données suggèrent que le retrait des contacts synaptiques est un événement dépend du NO neuronal qui ne nécessite pas une participation active des cellules microgliales. Une autre étude portant sur l'élimination des contacts synaptiques lors de maladie à prion supporte

également l'hypothèse que le retrait des contacts synaptiques lors d'un processus dégénératif serait indépendant des cellules gliales (Sisková et al., 2009).

De plus, il a récemment été découvert que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I jouerait un rôle dans l'élimination des synapses après une lésion (pour revue (Cullheim and Thams, 2007)). L'intérêt porté sur cette famille de molécules appartenant au système immunitaire résulte des travaux menés dans le laboratoire de Carla Shatz démontrant que MHC I est exprimé par les neurones et que le niveau d'expression de ces molécules est régulé par l'activité dans le cerveau des mammifères (Boulanger and Shatz, 2004). En général, l'expression de MHC I est considérée comme une étiquette requérant l'élimination de l'élément portant cette expression. Dans le SNC, les cellules microgliales expriment les récepteurs à MHC I et elles pourraient réaliser l'élimination des cellules marquées. De façon surprenante l'étude d'animaux ayant des MHC I non-fonctionnels indique que le « synapse stripping » est plus important chez les animaux ayant subi une lésion axones des motoneurones par rapport à des animaux contrôles (Oliveira et al., 2004). Par ailleurs, seulement une petite proportion des synapses inhibitrices est maintenue au niveau du corps cellulaire du neurone lésé, ce qui signifie que ce surplus d'élimination synaptique est dirigé vers les terminaisons inhibitrices. Ainsi, la présence de MHC I fonctionnel semble être nécessaire à la conservation d'une sous-population de terminaisons nerveuses inhibitrices présentes à la surface du soma du motoneurone axotomisé. Les MHC I pourraient donc constituer un signal de type « do not eat me ».

Par ailleurs, une autre famille de protéines appartenant au système immunitaire pourrait être impliquée dans l'élimination des synapses lors de lésion cellulaire : le complément. Après une lésion du nerf facial du rat adulte, le système du complément s'active et on observe une augmentation de l'expression de C1q et C3 dans les régions lésées (Mattsson et al., 1998). D'autres études portant sur des modèles neurodégénératifs ont également montré une augmentation de l'expression de C1q (Stevens et al., 2007). Etant donné que les cellules microgliales expriment les récepteurs pour les composants du complément, on peut suggérer un rôle des cellules microgliales dans l'élimination des synapses via le système du complément. Il a été montré que le « synapse stripping » apparaissant après axotomie était diminué dans les animaux C3^{-/-} alors qu'aucun changement n'est détecté chez les C1q^{-/-} par rapport aux contrôles (Berg et al., 2012). Ainsi, un défaut d'expression de C3 préserve plus de

terminaisons synaptiques au niveau des neurones lésés. Les auteurs ont par la suite montré que ces neurones récupèrent fonctionnellement plus vite. Ces données suggèrent donc que le « synapse stripping » ne serait donc pas forcément bénéfique comme le montrait les études réalisées dans les souris MHC I déficientes.

En résumé, l'implication des cellules microgliales dans le « synapse stripping » n'est pas encore clairement démontrée lors de lésion nerveuse et les effets de ce processus ne sont pas encore compris.

e. Modulation de l'activité synaptique

L'activation des cellules microgliales aurait également une influence sur la transmission synaptique. En effet, la microglie activée pourrait également contrôler la transmission basale glutamatergique. Pascual et collaborateurs (Pascual et al., 2012) ont montré que la stimulation des récepteurs TLR4 microgliaux induit indirectement une augmentation de la fréquence des événements synaptiques excitateurs dans l'hippocampe. En effet, l'activation du TLR4 microglial entraîne une libération d'ATP agissant au niveau de récepteurs P2Y₁ astrocytaires. Les astrocytes libèrent ensuite du glutamate qui se lie au mGluR5 pré-synaptiques modulant ainsi la fréquence de libération du glutamate synaptique. Ainsi, via une modulation de la libération de glutamate par les astrocytes, l'activité des cellules microgliales contrôlent la neurotransmission glutamatergique. De plus, une étude réalisée *in vivo* indique que la stimulation des TLR4 par LPS induit une augmentation de l'excitabilité neuronale suffisante pour déclencher des crises épileptiques (Rodgers et al., 2009). Ces changements d'excitabilité du réseau neuronal pourraient être dus à une production élevée de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL1 et le TNFalpha par les cellules microgliales activées. Cette étude *in vivo* confirme que les cellules microgliales peuvent moduler directement et/ou indirectement l'activité synaptique.

Par ailleurs, une étude utilisant des souris modèles de la sclérose en plaque indique que l'activité microgliale régule également la transmission excitatrice au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet (Mandolesi et al., 2013). Les auteurs de cette étude ont montré que les cellules microgliales

activées et les lymphocytes infiltrés libèrent de forte dose d'IL1beta qui augmente la transmission glutamatergique via une réduction de l'expression d'un transporteur du glutamate. Cette augmentation de l'excitabilité neuronale représente une cause des dommages excitotoxiques survenant lors de sclérose en plaque.

Les cellules microgliales influencent également la neurotransmission inhibitrice. Dans des modèles de lésion périphérique, on observe une augmentation de l'expression de P2X₄ microgliale au niveau de la corne dorsale qui contribue à une hyperexcitabilité locale du réseau neuronal ainsi qu'aux douleurs neuropathiques (Beggs and Salter, 2010; Ulmann et al., 2008). L'activation de ces récepteurs par l'ATP induit une libération de BDNF qui en se fixant à son récepteur TrkB neuronal entraîne une diminution de l'expression de KCC2 dans les neurones de la corne dorsale (Coull et al., 2005). Ce changement d'expression de KCC2 entraîne une inversion du mouvement des ions Cl⁻ qui sortent des neurones au lieu d'y entrer via les canaux ouverts par le GABA ou la glycine. Par conséquent, on observe une modification du fonctionnement des synapses inhibitrices qui deviennent excitatrices d'où une hyperexcitabilité du réseau de la corne dorsale causant des douleurs neuropathiques.

VI. La microglie au cours du développement post-natal

Dans la partie précédente, nous avons vu que les cellules microgliales adultes ont d'importantes fonctions en conditions physiologiques et pathologiques. Cependant, peu d'études ont été menées afin de caractériser le phénotype de ces cellules au cours du développement et leurs rôles fonctionnels restent sujets à débat. Les cellules microgliales dérivent des progéniteurs myéloïdes primitifs qui naissent dans le sac vitellin extra-embryonique (Ginhoux et al., 2010). Chez les mammifères, l'invasion du SNC par les cellules microgliales se déroule en 2 étapes : la première à la fin de la neurogénèse chez l'embryon (vers E9-11 chez la souris) et la seconde autour de la naissance.

1. Les caractéristiques morphologiques des cellules microgliales immatures

Les cellules microgliales aux stades précoces du développement présentent une morphologie de type amiboïde évoluant vers un phénotype ramifié au cours du développement du SNC. Par exemple, une étude réalisée par l'équipe de Pascal Legendre au niveau de la moelle épinière chez l'embryon indique que les cellules microgliales ont toutes une morphologie de type amiboïde (Rigato et al., 2011). En effet, à E10.5, les cellules microgliales sont caractérisées par un large soma et elles ne présentent pas de prolongements alors qu'à E15.5, les cellules microgliales ont toutes une morphologie de type ramifiée avec plusieurs prolongements ramifiés. Cette morphologie amiboïde caractéristique des cellules microgliales immatures a également été observée dans le corps calleux, le cervelet, le cortex, l'hippocampe, la matière blanche, le bulbe olfactif au cours du développement post-natal (Brockhaus et al., 1993; Dalmau et al., 2003; Fiske and Brunjes, 2000; Marín-Teva et al., 2004). De façon similaire au développement embryonnaire de la moelle épinière, ces cellules microgliales amiboïdes aux stades précoces de développement post-natal évoluent vers une morphologie ramifiée. Ces changements morphologiques des cellules microgliales au cours du développement reflètent l'acquisition progressive d'un phénotype mature.

2. La répartition hétérogène des cellules microgliales

Par ailleurs les cellules microgliales adoptent une distribution particulière au cours du développement. En effet, bien que les cellules microgliales soient présentes dans tout le SNC en développement, elles ne sont pas réparties de façon uniforme mais tendent à résider préférentiellement dans des régions spécifiques. De façon intéressante, les cellules microgliales amiboïdes de la moelle épinière à E10.5 ont une distribution très hétérogène et elles se localisent spécifiquement autour de la moelle épinière à ce stade du développement embryonnaire (Rigato et al., 2011). Puis, elles envahissent progressivement l'intérieur de cette structure au cours du développement et à E15.5, elles se distribuent de façon homogène dans le parenchyme. On note que les cellules microgliales ont une morphologie amiboïde lorsqu'elles migrent au travers du parenchyme et qu'une fois qu'elles ont

atteint leur destination finale, elles adoptent une morphologie ramifiée. Par ailleurs, la migration des cellules microgliales dans la moelle épinière suit un schéma spatiotemporel spécifique qui serait lié aux événements développementaux se déroulant à ces stades du développement. Ainsi, à E12.5, des cellules microgliales s'accumulent au niveau de la région dorsolatérale et interagissent avec des fibres des cellules ganglionnaires de la corne dorsale en apoptose. Similairement, au niveau colonnes motrices latérales situées dans la corne ventrale, des cellules microgliales s'accumulent à E13.5 et cet événement coïncide avec la mort cellulaire développementale des motoneurones. De plus, à ce stade du développement, les cellules microgliales de la zone marginale ventrale interagissent avec les cellules radiales alors que les autres cellules du parenchyme interagissent avec les capillaires sanguins en croissance. Par conséquent, cette distribution hétérogène des cellules microgliales dans la moelle épinière aux stades précoces du développement pourrait s'expliquer par le fait que les cellules microgliales interagissent avec les différents types cellulaires et qu'elles doivent accomplir certaines fonctions clés du développement nécessaires au développement du système nerveux mais également à la vascularisation du tissu. Ces changements remarquables de distribution des cellules microgliales sont également observés au niveau de la rétine (Ashwell et al., 1989; Santos et al., 2008). En effet, à la naissance les cellules microgliales se localisent principalement au niveau des couches vitréennes et elles apparaissent progressivement dans des couches plus sclérales les jours suivants. Il a ainsi été proposé une migration radiale des cellules des couches vitréennes vers les sclérales. Lors de leur migration dans les couches rétinienne, les cellules microgliales interagissent également avec les cellules en mort cellulaire et les vaisseaux sanguins en développement. Ces données permettent de supposer un rôle des cellules microgliales dans l'élimination des éléments apoptotiques via phagocytose ainsi que dans la croissance des vaisseaux sanguins via une libération de facteurs trophiques.

3. Les changements développementaux de la densité des cellules microgliales

En conséquence du recrutement des cellules microgliales dans des aires précises du SNC, une augmentation de la densité de ces cellules est observée dans différentes structures. En effet, au niveau

de la moelle épinière chez l'embryon, les cellules microgliales colonisent progressivement cette structure par une migration dirigée de la périphérie vers le centre (Rigato et al., 2011). Ainsi, la densité des cellules microgliales dans la moelle épinière est multipliée par un facteur de 6 entre E10.5 et E15.5. Ces effets ont également été retrouvés au niveau du cerveau en développement post-natal comme le montre l'étude menée par Dalmau et collaborateurs (Dalmau et al., 2003). En revanche, les auteurs de cette étude ont montré que la densité de cellules microgliales dans le cerveau embryonnaire évoluait très peu, au contraire de ce qui a été observé dans la moelle épinière. Mais ils observent une augmentation significative dans le cerveau post-natal en particulier entre P6-9 et P9-18 suivant la structure cérébrale observée. Par exemple, la population de cellules microgliales est multipliée par 3,5 entre P6 et P9 dans le cortex et la fimbria et elle est multipliée par 4,5 entre P0 et P6 dans le gyrus denté. Par ailleurs, la densité microgliale est, en général, plus importante et atteint plus rapidement son maximum dans la matière blanche comparée à la matière grise. On peut supposer que ces différences dans le déroulement temporel de l'augmentation de la densité microgliale résultent des différences existantes dans le développement et dans la maturation de ces différentes structures. En effet, la densité de cellules microgliales dépend du changement morphogénétique du volume de la structure étudiée, du recrutement des cellules microgliales ainsi que du taux de prolifération de ces dernières. L'apoptose des cellules microgliales étant très faible, ce paramètre a une influence négligeable sur l'évolution de la densité cellulaire.

4. Les rôles microgliaux nécessaires au développement

Au cours du développement, la distribution des cellules microgliales change et elles s'accumulent dans des régions spécifiques. Mais quelles sont les fonctions des cellules microgliales au cours du développement ? Existe-t-il un lien entre cette distribution particulière des cellules microgliales et leurs fonctions et/ou les événements développementaux se déroulant de façon concomitante ?

a. Induction de la mort neuronale

Plusieurs études indiquent que les cellules microgliales contrôlent activement la mort neuronale développementale (pour revue (Bessis et al., 2007)). Au niveau de la rétine du poussin au stade

embryonnaire, environ la moitié des neurones meurent au cours de la période de mort cellulaire programmée (PCD pour « programmed cell death ») et cet événement coïncide avec l'entrée des cellules microgliales dans le parenchyme. Par la suite, il a été montré que le NGF libéré par les cellules microgliales pénétrant le tissu induisait la mort neuronale au niveau de la rétine (Frade and Barde, 1998). Ce rôle d'induction de la mort cellulaire par les cellules microgliales a également été observé dans d'autres structures au cours du développement. En effet, au niveau du cervelet en développement post-natal précoce, les cellules microgliales déclencheraient la mort des cellules de Purkinje (Marín-Teva et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont montré que le stress oxydatif microglial joue un rôle majeur dans ce processus. Les cellules microgliales produisent O_2^- promouvant directement la mort des cellules de Purkinje ou indirectement via une dismutation rapide et spontanée en H_2O_2 connu pour induire l'apoptose. Similairement, dans l'hippocampe en développement post-natal précoce, la mort des neurones nécessite l'activation de CD11b et de DAP12 des cellules microgliales colonisant le tissu par des ligands encore inconnus (Wakselman et al., 2008). L'activation de ces récepteurs déclenche la production d'ions superoxydes (ROS) induisant la mort neuronale dans l'hippocampe.

Ainsi, ces études réalisées dans la rétine et le cervelet démontrent clairement le rôle des cellules microgliales dans l'induction de l'apoptose via une libération de facteurs diffusibles tels que NGF, O_2^- et ROS.

Au niveau de la moelle épinière, l'induction de l'apoptose des motoneurones par les cellules microgliales est un processus un peu plus complexe. Des cultures d'explants isolés à partir d'embryons de rat au stade E13 indiquent que 90% des motoneurones meurent deux jours après alors que si ces motoneurones sont mis en culture à partir d'E12 seulement 50% meurent (Sedel et al., 2004). Ainsi, les motoneurones acquièrent la capacité d'entrer en PCD (« programmed cell death ») entre E12 et E13. Cette période du développement embryonnaire E12-13 coïncide avec l'invasion du parenchyme par les cellules microgliales (Rigato et al., 2011) et ces cellules contrôlent l'acquisition de la compétence des motoneurones à mourir par une sécrétion de TNFalpha (Sedel et al., 2004). Ainsi,

entre E12 et E13, la mise en place transitoire d'une voie de signalisation neurone/microglie, TNFR1/TNFalpha respectivement, confère aux motoneurones la capacité d'entrer en PCD à E15.

En résumé, les cellules microgliales envahissant le SNC au cours du développement de façon concomitante ou très peu de temps avant que les neurones meurent et ces cellules sont activement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire via une sécrétion de facteurs solubles. Etant donné que les cellules microgliales sont les macrophages du SNC, il semblerait que ces cellules soient par la suite impliquées dans l'élimination des débris générés lors de la PCD.

b. Régulation de la synaptogénèse

Les cellules microgliales envahissent le SNC aux stades prénataux, mais leur densité augmente de façon très significative au cours des premières semaines post-natales atteignant leur maximum vers P18 (Dalmau et al., 2003). De façon intéressante, cette période d'invasion du tissu neural par les cellules microgliales correspond à une période de forte synaptogénèse. Il apparaît donc possible que les cellules microgliales soient impliquées dans la mise en place des connections synaptique au cours du développement. Il a été montré que les cellules microgliales peuvent exprimer la thrombospondine (Chamak et al., 1995), une protéine de la matrice extracellulaire capable d'induire la croissance des axones ainsi que la synaptogénèse. En effet, les cellules microgliales présentes dans les régions corticales et sous-corticales jusqu'à la fin de la deuxième semaine post-natale d'après les marquages immunohistochimiques *in situ* menés par Chamak et collaborateurs. Par ailleurs, il est important de noter que les cellules microgliales ne sont pas les seules cellules du SNC à exprimer la thrombospondine et que l'implication de la thrombospondine astrocytaire dans l'assemblage des molécules neuronales aux synapses a déjà été démontrée (Christopherson et al., 2005). Néanmoins, on peut supposer que la thrombospondine microgliale interagit avec le récepteur neuronal gabapentine $\alpha 2\delta$ -1 afin d'induire une adhésion synaptique et d'initier des événements conduisant à l'établissement de spécialisations pré- et post-synaptiques (Eroglu et al., 2009). Ainsi, la microglie pourrait réguler la synaptogénèse durant le développement.

c. Contrôle des propriétés synaptiques

Les cellules microgliales sont également impliquées dans le développement des synapses glutamatergiques de l'hippocampe. Par exemple, une altération des propriétés microgliales périnatales modifie les propriétés des synapses des fibres collatérales de Schaffer sur les neurones pyramidaux de CA1 (Roumier et al., 2004). En effet, bien que la microglie exprime KARAP/DAP12, un polypeptide transmembranaire associé aux récepteurs membranaires, qu'aux stades périnataux, une perte de fonction de cette protéine présente des changements des fonctions synaptiques ainsi que de la plasticité. L'étude des souris mutées pour KARAP/DAP12 à P18-25 présente une augmentation de la LTP hippocampique due à une perméabilité des récepteurs AMPA plus importante aux ions Ca^{2+} (récepteurs AMPA ne contenant pas la sous-unité GluA2) et une sensibilité plus importante à l'ifenprodil, un antagoniste des sous-unités GluN2B du récepteur NMDA sans changement d'expression des sous-unités du récepteur NMDA suggérant que les synapses sont moins matures dans les animaux mutés. De plus, la mutation KARAP/DAP12 perturbe l'accumulation spécifique de TrkB au niveau des densités post-synaptiques induisant une altération de la voie de signalisation BDNF/TrkB à ce stade critique du développement. L'ensemble de ces résultats démontrent que les propriétés des cellules microgliales aux stades périnataux jouent un rôle important dans les fonctions synaptiques et la plasticité révélant une interaction développementale entre la microglie et les synapses.

d. Remodelage synaptique et « synapse pruning »

Le remodelage des circuits neuronaux est un processus important dans l'affinement et la maturation du réseau synaptique. Au cours du développement précoce du SNC, les neurones font beaucoup plus de connections synaptiques que celles maintenues dans le cerveau mature (Rakic et al., 1986). Ainsi, de nombreuses synapses sont mises en place au cours du développement et ce sont seulement les synapses appropriées et fonctionnelles, sélectionnées par leur activité, qui vont être conservées et renforcées par la suite. Etant donné les fonctions phagocytiques des cellules microgliales, il a été proposé que ces cellules jouent un rôle dans l'élimination des synapses aberrantes

permettant une maturation synaptique développementale correcte. Ce processus développemental est appelé élagage synaptique (« synapse pruning »). Cette hypothèse a été renforcée par l'observation d'éléments synaptiques phagocytés par les cellules microgliales au cours de la maturation fonctionnelle des circuits synaptiques de l'hippocampe (Figure 13) (Paolicelli et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont également montré que la voie de signalisation neurone/microglie, fractalkine/CX3CR1, jouait un rôle dans le recrutement des cellules microgliales phagocytant les éléments synaptiques. En effet, lors d'un défaut d'expression du récepteur microglial CX3CR1, le nombre de cellules microgliales est transitoirement réduit dans l'hippocampe et l'élimination des synapses incorrectes est retardée. En conséquence de ce déficit d'élimination synaptique, un excès de synapses immatures persiste et les propriétés du réseau mûrent moins vite.

Mais quels sont les mécanismes moléculaires permettent à la microglie de reconnaître et d'éliminer les synapses inappropriées ? Et quelles sont les conséquences à long terme d'un défaut d'élimination de ces synapses sur l'activité synaptique ?

Dans le noyau géniculé latéral dorsal, les projections rétino-géniculées des deux yeux se chevauchent à la naissance puis une ségrégation des projections de chacun des yeux se met en place au cours du développement post-natal et elles occupent par la suite des territoires topographiques bien distincts dans ce noyau du thalamus. Cette redéfinition des territoires occupés par les projections rétino-géniculées requiert un intensif élagage synaptique des connections de faible activité qui atteint un pic à P5 chez la souris. Schafer et collaborateurs ont montré qu'à P5 les cellules microgliales phagocytent les éléments pré-synaptiques des projections rétino-géniculées ayant une faible activité synaptique et ces éléments synaptiques sont retrouvés dans le compartiment lysosomal des cellules microgliales (Figure 13) (Schafer et al., 2012). Ainsi, dans le système rétino-géniculé de la souris en développement post-natal, les cellules microgliales éliminent sélectivement les connections faibles. L'interaction des cellules microgliales avec les synapses à éliminer serait médiée par la cascade classique du complément. En effet, Schafer et al ont démontré que cette élimination des connections implique la voie de signalisation impliquant des protéines du complément et qu'un défaut d'expression du récepteur microglial (CR3) ou du ligand neuronal (C1q et C3) réduisait le « synapse pruning ».

Cette réduction d'élimination des synapses cause un défaut de ségrégation des projections rétino-géniculées observable à long terme dans un cerveau de souris adulte. Par conséquent, les cellules microgliales sont impliquées dans le remodelage structural des projections rétino-géniculées survenant au cours du développement dans le thalamus via une élimination des projections de faible activité synaptique, un processus qui est médié par la voie de signalisation dépendante du système du complément. De façon intéressante, l'élimination des fibres rétino-géniculées par les cellules microgliales coïncide avec le pic d'expression rétinale de C1q et cette augmentation d'expression de C1q à cette période du développement serait régulée par le TGFbeta sécrété par les astrocytes (Bialas and Stevens, 2013).

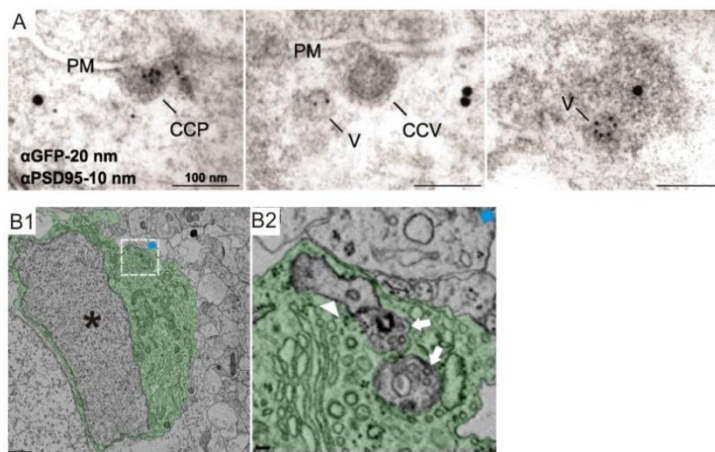


Figure 13 : Cellules microgliales éliminant des éléments pré- et post-synaptiques

A : Image de microscopie électronique du stratum radiatum montrant du matériel post-synaptique (PSD95-immunoréactif) dans des prolongements microgliaux GFP-positifs. PM : membrane plasmique, CCP : puit couvert de clathrine, CCV : vésicule couverte de clathrine, V : vésicule. La barre de calibration représente 100 nanomètres (adapté d'après Paolicelli et al, 2011).

B : Image de microscopie électronique montrant la présence d'éléments présynaptiques (flèches blanches en B2) à l'intérieur d'une microglie (verte) dans le thalamus d'une souris âgée de 5 jours. L'astérisque en B1 indique le noyau de la cellule microgliale. Le carré blanc en B1 indique la zone agrandie montrée en B2. La barre de calibration en B2 représente 100 nanomètres (adapté d'après Schafer et al. 2012).

Une autre voie de signalisation pourrait être impliquée dans le remodelage des connexions synaptiques au cours du développement et elle dépendrait de l'expression de CMH I. *In vitro*, il a été montré qu'un défaut fonctionnel de CMH I altère la morphologie des synapses et leurs fonctions (Goddard et al., 2007). Cette protéine serait donc impliquée dans la communication entre les éléments pré et post-synaptique afin de mettre en place correctement ces deux éléments. De plus, l'expression

de CMH I à la surface des neurones dépend de leur activité et une baisse de l'activité entraîne une diminution de l'expression de CMH I (Glynn et al., 2011). Il a été rapporté que CMH I régule négativement le nombre de synapses au cours de la synaptogénèse. Ainsi, une baisse de l'expression de CMH I augmente la densité des synapses glutamatergiques et GABAergiques (Glynn et al., 2011). Par ailleurs, un défaut de CMH I entraîne un défaut du remodelage des axones rétino-géniculés dans le noyau géniculé latéral dorsal (Shatz, 2009). L'ensemble de ces données permet de suggérer que les synapses à éliminer pourraient ne plus exprimer CMH I et les cellules microgliales qui possèdent le récepteur à CMH I (DAP12 et CD3zeta) reconnaîtraient un signal permettant leur élimination. Des études plus approfondies sur ce sujet sont nécessaires pour confirmer cette relation entre l'activité des cellules microgliales et la régulation de l'expression neuronale de CMH I au cours du remodelage des connections synaptiques.

Dans les chapitres précédents, nous avons constaté que les cellules microgliales sont activement impliquées dans différents événements survenant au cours du développement tels que la mort neuronale, la synaptogénèse, l'affinement du réseau neuronal via le « synapse pruning », la régulation des propriétés synaptiques... Afin d'étudier plus en détails le phénotype et les fonctions des cellules microgliales ainsi que leur relation avec les neurones au cours du développement, nous avons choisi d'étudier ces différents paramètres dans une structure dont le développement est bien caractérisé : le cortex somatosensoriel primaire de la souris.

VII. Le cortex somatosensoriel primaire comme modèle d'étude

1. Présentation générale des voies anatomiques du cortex somatosensoriel

Les rongeurs étant des animaux nocturnes, le système des vibrisses est le système sensoriel le plus développé chez ces animaux afin de compenser la pauvreté des informations visuelles. Les vibrisses des rongeurs présentent sur leur museau, organisées en colonnes et en lignes, sont des détecteurs sensoriels très sensibles à l'acquisition des informations tactiles (reconstruction de l'environnement

spatial, localisation des objets et distinction de la texture). Le mouvement d'une vibrisse entraîne l'ouverture de canaux ioniques mécano-sensibles au niveau de la terminaison nerveuse d'un neurone sensoriel innervant le follicule pileux. La dépolarisation résultante induit le déclenchement d'un potentiel d'action dans les neurones sensoriels de la branche infraorbitale du nerf trijumeau. Ces neurones sensoriels réalisent des synapses excitatrices au niveau du noyau trijumeau du tronc cérébral (PrV, Figure 14). Les neurones de cette région sont organisés en « barrelettes » et chacun reçoit le signal d'une vibrisse (Veinante and Deschênes, 1999). Ensuite, les neurones trijumeaux se projettent au niveau thalamus ventrobasal (VPM pour « ventral posterior medial nucleus ») de l'hémisphère controlatéral qui est également organisé somatotopiquement en « barreloids ». Les axones thalamiques (TCAs pour « thalamocortical axons ») se projettent au niveau du cortex somatosensoriel primaire (S1) formant des ensembles de structures dans la couche 4 du cortex qui sont à la base de la formation du cortex en champ de tonneaux. L'organisation des tonneaux est identique à celle des vibrisses sur le museau des rongeurs (Woolsey and Van der Loos, 1970). Par conséquent, chaque tonneau reçoit l'information d'une vibrisse spécifique (Figure 14). Cette voie de transmission des informations sensorielles est la voie dite lemniscale et c'est la voie principale relayant l'information sensorielle des vibrisses aux tonneaux. On peut noter que les TCAs forment également des synapses glutamatergiques avec les neurones de la couche 6 du S1 et que ces neurones forment des connections corticothalamiques (CTAs) dans le VPM soulignant la présence d'un contrôle rétro-actif (Figure 15).

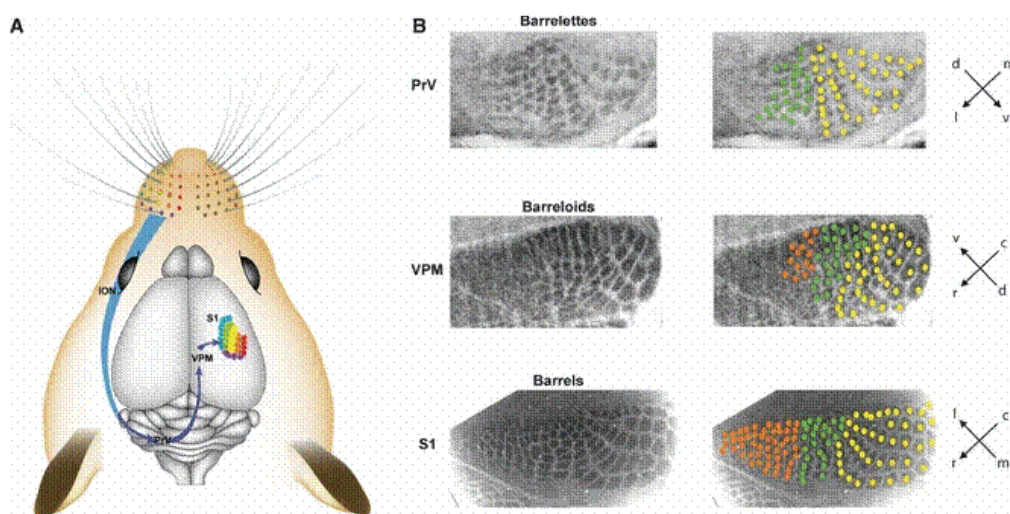


Figure 14: La voie lemniscale des vibrisses aux tonneaux dans le cerveau de la souris (Wu et al., 2011)

- (A) Les vibrisses présentes sur le museau des rongeurs sont innervées par la branche infraorbitale du nerf trijumeau (ION) qui transmet les informations sensorielles au noyau principal rostral (PrV) du tronc cérébral. Les axones trigeminothalamiques du PrV se projettent dans le noyau posteromédial ventral (VPM) du thalamus de l'hémisphère controlatéral. Les axones thalamocorticaux en provenance du VPM se projettent dans le cortex somatosensoriel primaire (S1). Les 5 rangées de vibrisses ont une couleur attribuée que l'on retrouve au niveau du cortex.
- (B) Images représentatives de coloration au cytochrome oxydase de sections coronales montrant les « barrettes » dans le PrV du tronc cérébral, les « barreloids » du VPM du thalamus et les « barrels » du cortex somatosensoriel primaire. En cercles oranges et verts, on observe des structures correspondant aux vibrisses rostroventrales et en cercles jaunes on observe les vibrisses caudodorsales.

En addition de la voie lemniscale, les informations sensorielles en provenance des vibrisses peuvent être relayées au cortex via une voie paralemniscale (Petersen, 2007). Dans ce cas, les afférences des neurones sensoriels de la branche infraorbitale du nerf trijumeau innervent un autre noyau du tronc cérébral : le noyau spinal caudal (SpV) au lieu du PrV. Les neurones du SpV se projettent au niveau du noyau posteriomédial (POM) du thalamus. Les TCAs du POM réalisent des synapses principalement avec les neurones des couches 1 et 5 du cortex somatosensoriel primaire, avec les neurones du cortex somatosensoriel secondaire et le cortex moteur. Cette voie paralemniscale serait importante dans l'exploration active et contribuerait à la coordination sensorimotrice.

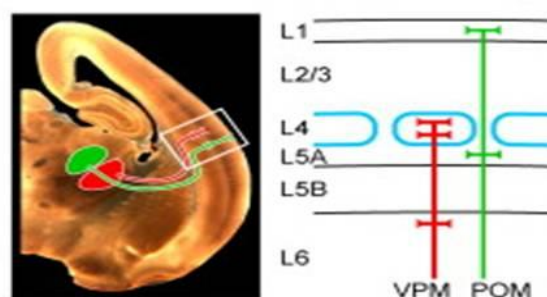


Figure 15: Les deux voies thalamocorticales relayant l'information sensorielle des vibrisses au cortex

(Petersen, 2007)

Voie lemniscale (en rouge) : Les neurones du VPM sont glutamatergiques et ils se projettent dans les tonneaux de la couche 4, avec une légère innervation de la couche 6. Les neurones corticothalamiques de la couche 6 présente un contrôle réciproque de l'activité au VPM.

Voie paralemniscale (en vert) : Les projections des neurones du POM évitent les tonneaux de la couche 4 et ciblent préférentiellement la couche 1 et la couche 5A.

2. Organisation fonctionnelle d'un tonneau

Les TCAs sont considérés comme les organisateurs des tonneaux corticaux. En effet, ce sont les projections des neurones du VPM au niveau de la couche 4 du cortex somatosensoriel qui forment les

tonneaux. Les terminaisons des TCAs se concentrent à l'intérieur des tonneaux alors que les corps cellulaires des neurones étoilés de la couche 4 se localisent à la périphérie du centre des tonneaux soit dans les murs qui délimitent ces modules (Figure 16). Les somas de ces neurones forment ainsi des anneaux autour des tonneaux. De plus, les neurones de la couche 4 développent une morphologie dendritique polarisée vers l'intérieur des tonneaux et forme des synapses excitatrices avec les TCAs.

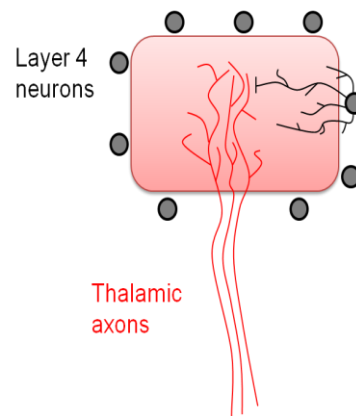


Figure 16: La synapse thalamocorticale

Les neurones de la couche 4 du S1 (en gris) sont localisés dans les septa délimitant le centre des tonneaux soit à la périphérie des regroupements d'axones thalamocorticaux (en rouge). Les neurones de la couche 4 envoient leurs dendrites vers le centre des tonneaux afin de former des synapses avec les axones thalamiques.

Chez les rongeurs, cet arrangement de tonneaux matures dans lesquels les TCAs sont organisés en faisceaux apparaît à P3-P4 (Rebsam et al., 2002). Puis, entre P4 et P8, les connexions synaptiques se forment entre les TCAs et les neurones corticaux et elles développent les caractéristiques de synapses matures au cours des premières semaines post-natales.

3. Mise en place des tonneaux dans la couche 4 du cortex somatosensoriel

Le thalamus et le cortex se développent de façon synchrone au cours du développement embryonnaire. La génération des neurones du thalamus se déroule entre E13 et E19 ce qui coïncide à la période de génération des neurones du cortex. Vers E16/17, le thalamus se différencie en différents noyaux : épithalamus et thalamus ventral et plus tard le thalamus dorsal qui envoient ces projections

vers le cortex. En addition des projections du cortex, des régions thalamiques distinctes envoient leurs projections vers le striatum, l'amygdale, le cortex piriforme, l'hippocampe,... Il a été suggéré que les différents groupes de projections thalamiques trouvent leur cible via une reconnaissance de signaux spécifiques dans ces régions et que lorsqu'elles trouvent leur cible appropriée, elles établissent topographiquement des représentations ordonnées.

Un peu avant la naissance, les axones thalamiques se détachent de la pré-plaque et poussent vers le plateau cortical, formant des branches et des synapses dans les couches appropriées. Il a été suggéré que des signaux « stop » et « branchement » jouent un rôle dans le ciblage spécifique des axones thalamiques vers leur couche appropriée. Plusieurs molécules exprimées à la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire sont exprimées spécifiquement dans certaines couches et ces différences moléculaires entre les couches corticales influenceraient l'arrêt des projections thalamiques. Ainsi, à la naissance, les TCAs ont déjà atteint les couches 4 et 6 du S1 (Rebsam et al., 2002). A P2, les TCAs dans le cortex forment 2 bandes uniformes, une dans la couche 6 et une dans la couche 4. A P3, les TCAs commencent à se ségréger dans des groupes dans la couche 4 qui formeront le centre des tonneaux et cette ségrégation est dépendante des informations sensorielles périphériques. Ce remodelage de l'arborisation des TCAs suggèrent une addition de branches à un emplacement cortical approprié ainsi qu'une rétraction et/ou un déplacement des TCAs. A ce stade du développement, la distribution des dendrites des neurones étoilés est peu polarisée. A P4, la carte de représentation des vibrisses dans le cortex S1 est mise en place. A P6, les neurones étoilés développent une distribution orientée de leurs dendrites vers le centre des tonneaux. Après P6, le nombre de segments dendritiques des neurones de la couche 4 et la complexité de l'arborisation des TCAs continuent à augmenter jusqu'à la fin de la deuxième semaine post-natale.

4. Période critique de la plasticité structurale du cortex en champ de tonneaux

Le concept de la période critique indique une période durant laquelle la présence de conditions spécifiques, d'origine externes ou internes, est nécessaire au développement normal des circuits

neuronaux, et que l'absence de ces conditions entraîne une altération irréversible de la mise en place du réseau (Erzurumlu and Killackey, 1982). Le concept de période critique pour la mise en place de la voie de communication des vibrisses aux tonneaux est largement inspiré des études menées sur la plasticité de la dominance oculaire. En effet, il a été montré que l'occlusion d'un œil à des stades précoces du développement post-natal engendre une perte irréversible de l'acuité visuelle de l'œil déprivé (Hubel and Wiesel, 1964). L'asymétrie de l'expérience visuelle et la compétition dépendante de l'activité entre les deux yeux conduisent à un changement rapide des réponses neuronales dans le cortex visuel en faveur de l'œil ouvert. Ces changements de réponse neuronale dans le cortex seraient dus à une compétition entre les axones géniculocorticaux servant l'œil ouvert et l'œil déprivé. Ainsi, au niveau du thalamus, le territoire occupé par les axones géniculocorticaux appartenant à l'œil déprivé rétrécit au profit du territoire occupé par les axones géniculocorticaux appartenant à l'œil ouvert qui s'étend (Antonini and Stryker, 1996). C'est cette période de malléabilité corticale qui est connue comme étant la période critique de dominance oculaire. Chez la souris, la période P28-32 est généralement considérée comme la période critique pour la plasticité de dominance oculaire (Gordon and Stryker, 1996). Néanmoins, la plasticité de dominance oculaire peut être induite avant ou après cette période mais les effets diffèrent qualitativement et quantitativement.

De façon similaire à la voie rétino-géniculo-cortical, le système somatosensoriel des rongeurs est connu pour présenter une période critique pour la mise en place des tonneaux. Ce terme période critique de plasticité a été adopté en référence aux changements structuraux, fonctionnels et comportementaux qui apparaissent lors de dommages sensoriels périphériques ou simplement lors du retrait de vibrisses. La cautérisation du follicule des vibrisses avant P4 altère irréversiblement l'organisation des tonneaux corticaux. L'exemple le plus connu est celui réalisé par Van der Loos et Woosley qui ont montré que la cautérisation de la rangée C des vibrisses sur le museau de rats à la naissance entraîne une fusion des tonneaux corticaux correspondants et une expansion des tonneaux des rangées B et D (cf figure 17, milieu) (Van der Loos and Woolsey, 1973). Ainsi, la perte de stimulation sensorielle aboutit à une désorganisation de la représentation corticale correspondante. De plus, si les vibrisses sont complètement dénervées de leurs entrées sensorielles par une transsection de

la branche infraorbitale avant P4, aucun tonneau n'est observé dans le cortex et les axones thalamocorticaux sont distribués de façon aberrante (cf figure 17, bas) (Bates and Killackey, 1985). Ces modifications de la carte corticale après cautérisation des vibrisses ou section de la branche infraorbitale ne sont observables que si les perturbations sensorielles sont réalisées avant P4. Ces résultats indiquent que la période critique pour la mise en place des tonneaux finit à P4 et que l'expérience sensorielle guide la formation des tonneaux. Les éléments déterminant l'arrêt de la période critique dans le cortex en champ de tonneaux ne sont toujours pas connus.

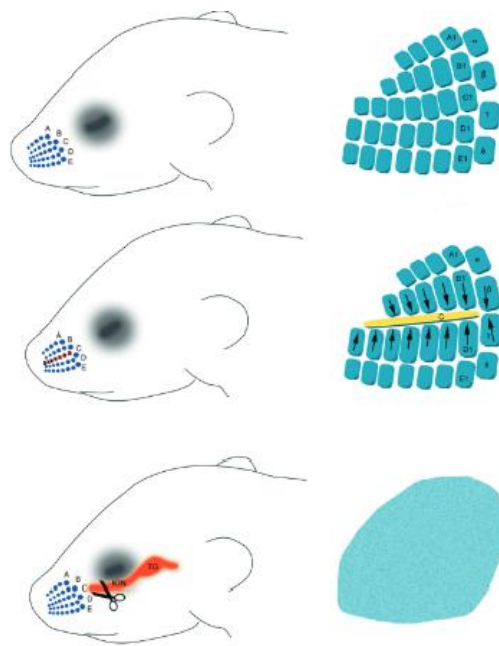


Figure 17 Schéma illustrant la plasticité structurale dans le cortex en champ de tonneau (Erzurumlu and Gaspar, 2012)

Haut : représentation classique du cortex en champ de tonneau

Milieu : représentation du cortex en champ de tonneau après une ablation des vibrisses de la rangée C avant P4

Bas : représentation du cortex en champ de tonneau après une transection de la branche infraorbitale avant P4

5. Les propriétés synaptiques de la synapse thalamocorticale

La méthode de préparation des tranches thalamocorticales décrites par Agmon et Connors (Agmon and Connors, 1991) permettant de préserver les circuits neuronaux connectant les « barreloids » du thalamus ventrobasal aux tonneaux du cortex en champ de tonneaux a fourni une technique adaptée à l'étude des propriétés de la synapse thalamocorticale.

Les neurones de la couche 4 du cortex S1 reçoivent des entrées glutamatergiques via les TCAs et des neurones glutamatergiques corticaux et ils reçoivent des entrées GABAergiques via les interneurones corticaux. La majorité des interneurones connectés aux neurones de la couche 4 reçoivent des entrées directes des TCAs. Ainsi, les axones thalamiques conduisent l'information aux neurones corticaux excitateurs et inhibiteurs, ces derniers déclenchant une rapide inhibition sans rétroaction limitant la fenêtre temporelle d'intégration des entrées thalamiques.

Plusieurs changements développementaux des fonctions synaptiques surviennent durant les deux premières semaines post-natales soulignant la maturation de ces synapses. Étant donné que la synapse thalamocorticale est une synapse excitatrice glutamatergique, le traitement de l'information au niveau des neurones de la couche 4 du cortex somatosensoriel passe par l'activation de récepteurs glutamatergiques ionotropiques : AMPA-R, KA-R et NMDA-R.

a. Changement de la neurotransmission médiée par les récepteurs AMPA et KA

A la synapse thalamocorticale en développement, les récepteurs post-synaptiques KA-R et AMPA-R sont activés par libération du glutamate. Les EPSC évoqués médiés par les récepteurs kainate sont de petites amplitudes et présentent de lentes cinétiques de décroissance ($\tau_{KA}=194.5$ ms) similaires à ceux observés à d'autres synapses (Kidd and Isaac, 1999). Les EPSCs médiés par les KA-R sont facilement isolables de la composante médiée par les AMPA-R d'après leurs propriétés pharmacologiques et leurs cinétiques. Les EPSCs médiés par les AMPA-R ont des cinétiques de décroissance rapides ($\tau_{AMPA}=5.3$ ms) et ils sont facilement bloqués un antagoniste sélectif des AMPA-R, le GYKI 53655 (1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbamy-4-methyl-7,8-methylenedioxy-3,4-dihydro-5H-2,3-benzodiazepine). Lors de l'étude menée par Kidd et Isaac, des EPSCs médiés par les KA-R peuvent être évoqués en absence de la composante AMPA et inversement, des EPSCs médiés par les AMPA-R peuvent être évoqués en absence de la composante KA-R. Ainsi, il y aurait des synapses ne contenant que KA-R ou que AMPA-R et les deux types de récepteurs ne coexistent pas à la même synapse. Par ailleurs, la contribution de ces récepteurs au niveau de la neurotransmission change au cours du développement post-natal. En effet, la contribution des KA-R est importante à P3-5 puis elle

diminue progressivement de P6 à P8 reflétant une baisse du nombre de synapses purement kainates. En outre, une augmentation du nombre de synapses AMPA se déroule durant cette période du développement. Une explication possible de ces changements développementaux est que les synapses kainates sont rapidement remplacées par des synapses AMPA. Cette conversion de récepteurs lors de la première semaine post-natale a également été observée lors de l'étude des propriétés des canaux unitaires et quantiques des ces deux sous-types de récepteurs (Bannister et al., 2005).

La plasticité des synapses thalamocorticales du cortex en champ de tonneaux induite par l'expérience sensorielle dépend de l'activité et des NMDA-R et coïncide avec le profil développemental de la potentialisation à long-terme (LTP). Ainsi, est-il possible que les synapses kainates soient converties en synapses AMPA lors de la LTP ? Kidd et Isaac ont testé cette hypothèse et ils ont montré que la LTP cause une diminution rapide des EPSCs médiés par les KA-R. Par conséquent, il y aurait une conversion rapide des synapses KA en synapses AMPA et ce mécanisme implique un retrait rapide des KA-R qui sont rapidement remplacés par des AMPA-R de manière hautement coordonnée.

Quelle est la fonction des KA-R à la synapse thalamocorticale aux stades précoces du développement post-natal ? Les synapses KA confèrent des caractéristiques particulières au circuit thalamocortical en développement. En effet, les cinétiques lentes des EPSCs médiés par les KA-R indiquent que les synapses kainates aux potentiels hyperpolarisants produisent des dépolarisations de longues durées dans les neurones de la couche 4 en réponse à une neurotransmission à basse fréquence. L'activation des KA-R permet une large fenêtre de détection des activités afférentes de faibles fréquences résultant de l'activation des vibrisses. Le changement développemental de la transmission KA vers la transmission AMPA réduirait temporellement cette fenêtre de détection et permettrait ainsi une transmission fidèle de l'activité évoquée par les vibrisses à haute fréquence aux neurones de la couche 4.

b. Changement de sous-unité des récepteurs NMDA

Les récepteurs au NMDA sont composés de plusieurs sous-unités dont au moins une sous-unité GluN1 et jusqu'à 4 sous-unités de la famille GluN2. La famille GluN2 contient 4 membres : GluN2A-D. L'expression des différentes sous-unités GluN2 est régulée au cours du développement. En effet, la sous-unité GluN2B est hautement exprimée par le plateau cortical chez l'embryon alors que la sous-unité GluN2A commence à être exprimée par le cortex quelques jours après la naissance ; les sous-unités GluN2C et GluN2D sont, quant à elles, très peu exprimées dans le cortex. Il y aurait donc une modification de la composition des sous-unités GluN2 des récepteurs NMDA passant d'une prédominance de NMDA-R contenant GluN2B vers une prédominance de récepteurs contenant GluN2A dans le cortex au cours du développement post-natal. Ces changements développementaux de sous-unités GluN2 ont été rapportés dans de nombreuses structures cérébrales (Monyer et al., 1994; van Zundert et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que le courant médié par les récepteurs NMDA immatures (*i.e.* GluN1/ GluN2B) a des cinétiques très longues dues à une dé-activation lente de ces récepteurs (Tovar et al., 2000; Vicini et al., 1998). Ces études suggèrent que l'incorporation de la sous-unité GluN2A au sein de NMDA-R plus mature permet cette accélération de la décroissance des courants des NMDA-R (Figure 18).

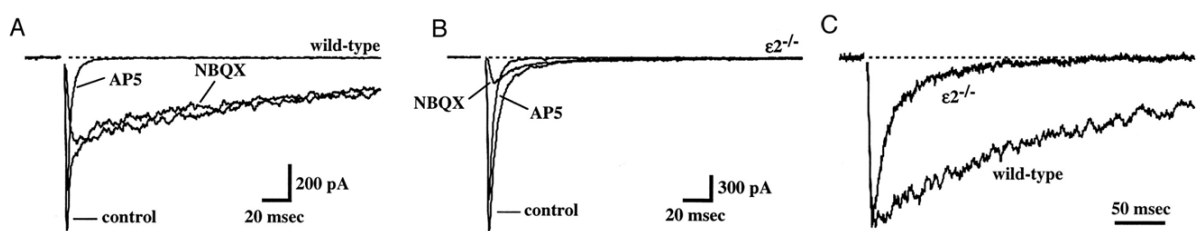


Figure 18: Cinétiques des récepteurs NMDA avec et sans GluN2B dans des neurones hippocampaux en culture

(Tovar et al., 2000)

A : EPSC médié par les récepteurs NMDA dans des neurones isolés à partir de souris sauvages (présence de composantes sensibles au NBQX et au AP5). On note deux composantes lors de la décroissance du courant: une rapide et une lente.

B : EPSC médié par les récepteurs NMDA dans des neurones isolés à partir de souris GluN2B-/- (aussi nommé $\epsilon 2^{-/-}$).

C : Surimposition des courants AP5 sensibles, *i.e.* courants NMDA, montrant que le courant NMDA des neurones des souris sauvage a une déactivation beaucoup plus lente que celui des souris déficientes en GluN2B-/-.

De plus, il existe des outils pharmacologiques bloquant les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B permettant ainsi de tester l'implication de ces récepteurs dans la neurotransmission. Par exemple, l'ifenprodil est un antagoniste sélectif des récepteurs contenant GluN2B (Williams, 1993). De plus, des analogues de l'ifenprodil avec une meilleure sélectivité et une meilleure affinité pour GluN2B ont été synthétisés tel que le composé Ro25-6981 ((α R, β S)- α -(4-hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol) (Fischer et al., 1997).

Il est également possible de bloquer les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A en utilisant du zinc (Paoletti et al., 1997) ou un antagoniste sélectif au GluN2A, le NVP-AAM077 ((R)-[(S)-1-(4-bromophenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-5-yl)-methyl]-phosphonic acid) (Auberson et al., 2002).

Ces changements de sous-unités du NMDA-R survenant au cours du développement a également été étudié au niveau de la synapse thalamocorticale (Lu et al., 2001). En utilisant, l'ifenprodil, Lu et collaborateurs ont étudié la contribution des NMDA-R contenant GluN2B à l'EPSC médié par les NMDA-R à la synapse thalamocorticale à différents âges post-nataux (Figure 19 C et D). Ainsi, la contribution relative des courants GluN2B décroît graduellement au cours du développement. La plupart des courants des NMDA-R à P3-P4 sont sensibles à l'ifenprodil (environ 81%) ; cette sensibilité est déjà significativement diminuée à P5-P6 (environ 67%) et à P9-P11, l'ifenprodil bloque seulement 32% des EPSCs médiés par les NMDA-R. L'augmentation de courant résistants à l'ifenprodil reflète une augmentation de la fraction de NMDA-R contenant GluN2A à la synapse thalamocorticale. Les NMDA-R contenant GluN2A ont une contribution qui commence à augmenter à P5-P6 et elle domine à P9-P11. Afin de confirmer ces résultats, Lu et collaborateurs ont également analysé les cinétiques de décroissance des EPSCs médiés par les NMDA-R (Figure 19, A et B). Ils ont remarqué que les cinétiques des réponses des NMDA-R changent au cours du développement. Au cours de la première semaine post-natale, la décroissance des courants des NMDA-R est lente, environ 307 ± 35 ms pour le τ pondéré à P3-P4 et environ 283 ± 39 ms à P5-P6 alors qu'à P9-P11, la

décroissance des courants des NMDA-R est significativement plus rapide avec une constante de décroissance de 183 ± 22 ms. Ces changements de cinétiques reflètent les changements de sous-unités car les récepteurs contenant GluN2B sont connus pour avoir des cinétiques de désactivation lente.

En conclusion, on observe une corrélation entre l'augmentation de la contribution des récepteurs contenant GluN2A et l'accélération du temps de décroissance des courants NMDA.

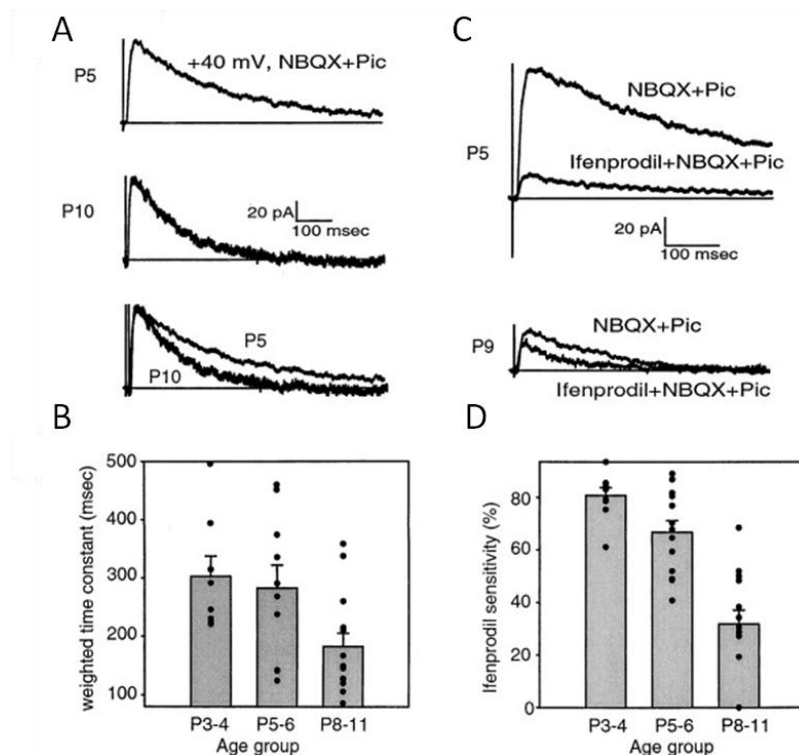


Figure 19: Changements développementaux de la composition en sous-unité des récepteurs NMDA à la synapse thalamocorticale
(Lu et al., 2001)

A : Traces illustrant les courants des NMDA-R qui sont significativement plus long à P5 comparés à P10. Les traces sont normalisées.

B : Valeurs des temps de décroissance des EPSCs médiés par les NMDA-R à la synapse thalamocorticale

C : Traces illustrant les changements de sensibilité à l'ifenprodil au cours du développement post-natal

D : Valeurs de la sensibilité à l'ifenprodil pour différents groupes d'âges montrant une diminution progressive de la sensibilité à cet antagoniste des NMDA-R contenant GluN2B.

De façon intéressante, on peut noter que les NMDA-R composés de GluN2B prédominent lors du développement précoce du développement postnatal qui est une période de forte synaptogénèse dans le cortex. On peut supposer que les NMDA-R comprenant GluN2B sont des marqueurs de synapses immatures.

Par ailleurs, on constate que l'apparition d'une prédominance de NMDA-R contenant GluN2A corrèle temporellement à l'arrêt de l'induction de la plasticité structurale du cortex en champ de tonneaux en réponse à une déprivation sensorielle. Existe-t-il un lien entre ces deux événements ? Afin de tester cette hypothèse, Lu et collaborateurs ont induit des lésions après la période critique d'induction des changements corticaux à des souris déficientes pour GluN2A (Lu et al., 2001). La déprivation des vibrisses après P5 chez les souris GluN2A^{-/-} a peu d'effet sur la carte corticale du cortex en champ de tonneaux, tout comme chez les souris contrôles sauvages, signifiant que la fin de la période critique à la mise en place des tonneaux se déroulent de la même façon dans ces deux groupes. L'analyse du mutant GluN2A révèle que l'expression de la sous-unité GluN2A et par conséquent l'accélération des EPSCs des NMDA-R n'influencent pas la fin de la période critique de la plasticité anatomique du cortex en champ de tonneaux.

c. Changements du ratio des courants AMPA/NMDA

Etant donné que la synapse thalamocorticale est composée d'un mélange de récepteurs KA, AMPA et NMDA dont l'expression fonctionnelle varie au cours du développement, il apparaît également important d'étudier la contribution relative des courants des AMPA-R et des NMDA-R au niveau des réponses synaptiques thalamocorticales. De larges courants médiés par les NMDA-R sont observés dans des souris âgées de moins d'une semaine et la contribution des AMPA-R augmente progressivement (Lu et al., 2001)(Figure 20). Par conséquent, on observe un faible ratio AMPA-R/NMDA-R à P3-P6 (environ 0.27) alors qu'à P8-P11 ce ratio est supérieur à 1 (environ 1.36).

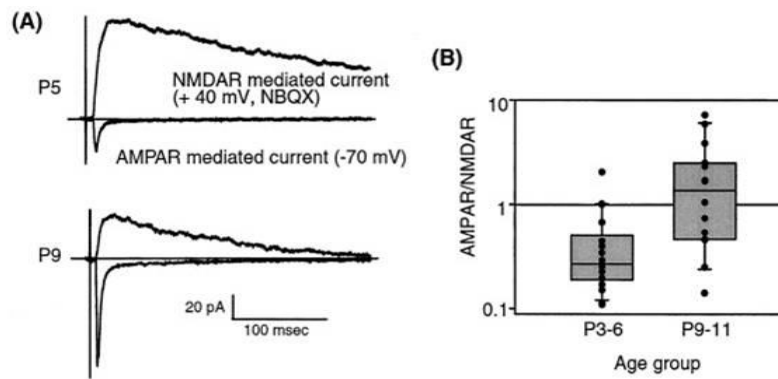


Figure 20 : Evolution des courants AMPA/NMDA

(Lu et al., 2001)

A : Exemple de traces montrant les courants médiés par les récepteurs AMPA et NMDA à P5 (haut) et P9 (bas)

B : Evolution de la valeur du ratio AMPA-R/NMDA-R à des stades précoces et tardifs du développement post-natal

Ces changements de valeurs du ratio AMPA-R/NMDA-R résulteraient d'une diminution de l'amplitude des courants des NMDA-R (conséquence du changement de sous-unités) et/ou d'une augmentation de l'amplitude des courants des AMPA-R. Néanmoins, la composante AMPA-R à la synapse thalamocorticale devient relativement plus importante après la première semaine post-natale chez la souris. Ce constat est consistant avec la suggestion que des AMPA-R sont graduellement incorporés à la synapse thalamocorticale au cours du développement (Crair and Malenka, 1995).

Quels mécanismes permettent l'incorporation des AMPA-R aux synapses corticales ? Il a été montré, dans des neurones corticaux en culture, que les NMDA-R pourraient être impliqués dans la régulation des AMPA-R lors du développement de la synapse (Hall et al., 2007). Les NMDA-R contenant la sous-unité GluN2B régulent négativement l'incorporation des AMPA-R aux sites synaptiques. Hall et collaborateurs proposent dans leur étude que les sous-unités GluN2B bloquent l'expression des protéines accessoires aux AMPA-R (les TARPs, « transmembrane AMPA regulatory proteins») qui sont nécessaires à l'insertion des AMPA-R aux synapses. Il apparaît donc possible que le changement de sous-unités des NMDA-R s'opérant au cours du développement post-natal lève cette répression de l'expression des TARPs et permette l'incorporation des AMPA-R à la synapse. Néanmoins, des études plus abouties sur ce sujet sont nécessaires afin d'établir la pertinence de ces hypothèses *in vivo*.

6. La plasticité synaptique à la synapse thalamocorticale

En addition des changements des propriétés synaptiques se déroulant au cours du développement, les capacités de plasticité synaptique à court et long termes évoluent également lors de cette période critique de la vie.

a. Plasticité synaptique à long-terme

Potentialisation à long terme (LTP)

La LTP est une augmentation de la force synaptique dépendante de l'activité observable à long terme. Cette potentialisation de la neurotransmission à long terme est par ailleurs un mécanisme synaptique impliqué dans certaine forme de mémoire et d'apprentissage. Bien que les mécanismes permettant cette augmentation de la transmission synaptique varient suivant la synapse étudiée, la majorité de ces derniers nécessite une activation des NMDA-R. Il est admis que l'influx de calcium à travers les NMDA-R est nécessaire à l'induction de la LTP à la plupart des synapses et entraîne l'incorporation des AMPA-R à la synapse. De plus, une diminution du nombre d'échecs de transmission synaptique est communément observée. Ainsi, la LTP dépendante des NMDA-R peut être induite à la synapse thalamocorticale en associant une stimulation des fibres pré-synaptiques à une dépolarisation post-synaptique du neurone vers -10 mV (Crair and Malenka, 1995).

La LTP à ces synapses peut seulement être induite entre P3 et P7, une période qui coïncide à la période critique de la plasticité structurale dépendante de l'activité du cortex en champ de tonneaux (Figure 21).

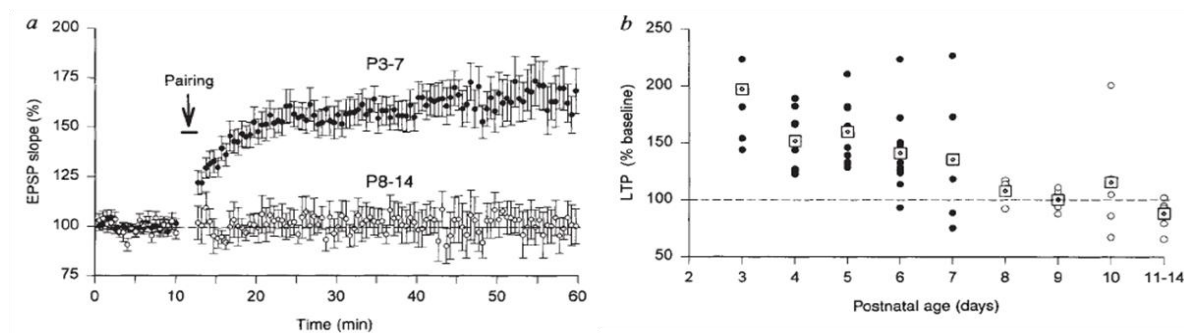


Figure 21 : L'induction de la LTP est limitée à la période critique

(Crair and Malenka, 1995)

a : Graphes résumant les effets sur la transmission synaptique lors d'un protocole d'induction de la LTP à P3-7 (cercles noirs) et P8-14 (cercles blancs).

b : Histogramme montrant la diminution progressive de la capacité d'induction de la LTP au cours du développement post-natal.

De plus, cette perte de la capacité à induire la LTP via une activation des NMDA-R avec l'âge apparaît en même temps que le changement de sous-unité du NMDA-R. Est-ce que le changement de sous-unité des NMDA-R module l'induction de la plasticité synaptique à long terme ? D'après l'étude de Lu et collaborateurs, l'apparition de NMDA-R contenant la sous-unité NR2A n'est pas nécessaire à la fermeture de cette période critique de plasticité synaptique (Lu et al., 2001). En effet, l'étude de la souris mutante $\text{GluN2A}^{-/-}$ indique que la LTP ne peut plus être induite après P7 à la synapse thalamocorticale reflétant un développement normal de la synapse.

De façon alternative, cette réduction de la capacité à induire la LTP pourrait être due à une diminution du signal calcique nécessaire à l'induction de la plasticité par une augmentation de l'expression des tampons calciques post-synaptiques ou par une réduction de l'efficacité des effecteurs en aval de l'entrée de calcium.

Par ailleurs, l'induction de la LTP permet la conversion de synapses silencieuses ne contenant que des NMDA-R en synapses pouvant également exprimer des AMPA-R à la surface membranaire, phénomène appelé « unsilencing ». L'existence des synapses silencieuses a longtemps fait débat mais des preuves expérimentales ont permis de démontrer directement la présence de ces synapses au cours du développement (Isaac et al., 1997). En stimulant à basse intensité les fibres thalamiques afin d'activer une ou un très petit nombre de synapses, Isaac et collaborateurs ont montré que les réponses synaptiques observées étaient seulement médiées par les NMDA-R. L'application d'un protocole

d'induction de LTP permet de faire apparaître des EPSCs médiés par les AMPA-R à ces synapses. De plus, il a été rapporté que l'occurrence des synapses silencieuses diminuées au cours du développement et qu'on n'en détecte plus après P8. Cette décroissance développementale des synapses silencieuses coïncide avec la perte de la capacité à induire la LTP à ces synapses (Crair and Malenka, 1995) suggérant que la conversion des synapses est un mécanisme important pour la LTP. On peut également supposer que cette conversion des synapses participe à l'augmentation du ratio AMPA/NMDA décrite dans une partie précédente.

De plus, la LTP permettrait de renforcer et de stabiliser les axones portant ces synapses fonctionnelles au sein du réseau neuronal via un mécanisme dépendant de l'activité synaptique.

Dépression à long terme (LTD)

Un autre processus impliqué dans le développement et la plasticité des circuits thalamocorticaux basé sur l'expérience sensorielle est la dépression à long terme (LTD). En appliquant un protocole appariant dépolarisation du neurone à -50 mV et une stimulation à basse fréquence des fibres thalamiques, Feldman et collaborateurs ont observé une diminution de l'amplitude des EPSCs évoqués à la synapse thalamocorticale caractéristique de la LTD (Feldman et al., 1998). Les auteurs de cette étude ont également noté une corrélation entre la capacité d'induire une LTD et l'âge de l'animal. En effet, une forte LTD peut être induite chez des animaux aux stades précoces de développement (P4-5) alors qu'après P10-12 la probabilité d'induire une LTD est quasiment nulle. Parce que la LTD dépend de l'activation des NMDA-R et qu'au cours du développement les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs évoluent, il est possible que les courants générés par l'activation des NMDA-R aux stades tardifs du développement soient plus petits que ceux évoqués aux stades précoces conduisant à une incapacité d'induction de la LTD.

De façon similaire à la perte de capacité d'induction de la LTP, on peut supposer qu'une réduction du signal calcique pourrait être à l'origine de cette diminution de la probabilité d'induire une LTD aux stades tardifs du développement. Une augmentation de l'expression des tampons calciques post-

synaptiques ou une réduction de l'expression des effecteurs activés par les ions calciques pourraient être responsable de cette perte d'induction de la LTD.

Quel est le rôle de la LTD à la synapse thalamocorticale au cours du développement ? Il a été proposé que la LTD permette de reconvertir les synapses fonctionnelles en synapses silencieuses. Cependant, il a été montré que lors de l'induction de la LTD, les EPSCs médiés par les AMPA-R sont toujours détectables indiquant qu'il ne s'agit pas de synapses uniquement composées de NMDA-R, *i.e.* silencieuses. Cette première hypothèse suggérant un effet opposé à celui de la LTP n'est donc pas observable dans ce modèle. Par ailleurs, il est possible que la LTD module l'efficacité des synapses thalamocorticales qui ont précédemment été soumises à la LTP. Ainsi, la LTD servirait à stabiliser les synapses thalamocorticales fonctionnelles. Une autre explication est que la LTD permettrait d'affaiblir les synapses non-nécessaires ou incorrectes et conduirait à la rétraction et à l'élimination des prolongements portant ces synapses affaiblies. Ainsi, la LTD affinerait les circuits thalamocorticaux via un mécanisme dépendant de l'activité synaptique. Un rôle des cellules microgliales dans l'élimination de ces processus peut être suggéré.

b. Plasticité synaptique à court-terme

Les propriétés d'induction d'une autre forme de plasticité à la synapse thalamocorticale évolue également au cours du développement post-natal, celle de la plasticité à court terme. Cette forme de plasticité permet d'étudier les propriétés pré-synaptiques telles que la probabilité de libération des terminaisons thalamocorticales. Actuellement, deux méthodes sont utilisées afin d'étudier la probabilité de libération pré-synaptique: 1) le calcul du ratio des courants appariés (PPR pour paired-pulse ratio), soit l'amplitude du pic du second courant évoqué divisé par l'amplitude du pic du premier courant évoqué ou 2) l'étude du blocage progressif des EPSCs médiés par les NMDA-R en utilisant MK-801. A la synapse thalamocorticale, il a été montré que les valeurs de PPR des AMPA-R diminuent au cours du développement post-natal alors que celles du PPR des NMDA-R simultanément augmentent (suggérant une diminution de la probabilité de libération) (Yanagisawa et al., 2004). Ce profil développemental de la probabilité de libération activant les NMDA-R a été confirmé avec

l'étude du blocage de ces courants avec MK-801 (Yanagisawa et al., 2004). Ces différences résultent de la non-uniformité des synapses thalamocorticales en terme de probabilité de libération pré-synaptique et serait consistant avec l'hypothèse que deux classes de libération de haute et basse probabilités existent. La présence de synapses silencieuses à haute probabilité de libération et de synapses fonctionnelles à basse probabilité de libération pourrait expliquer ces profils. En effet, il est admis que la proportion de synapses silencieuses diminue au cours du développement et que si elles sont associées à des fibres pré-synaptiques à forte probabilité de libération alors la disparition des synapses silencieuses entraîne également une diminution générale des fibres à forte probabilité de libération. Cependant, si on considère que la baisse de la proportion des synapses silencieuses est due à l'incorporation des AMPA-R alors les synapses converties fonctionnellement entraînent une diminution de la probabilité de libération pré-synaptique via des substances rétrogrades. Ainsi, ces différences développementales de la probabilité de libération des synapses contenant des AMPA-R et/ou des NMDA-R résulteraient d'interactions possibles entre les propriétés pré- et post-synaptiques.

Par ailleurs, dans le cas des AMPA-R, des changements de propriétés post-synaptiques de ces récepteurs au cours du développement expliquent les changements de PPR. En effet, au cours du développement les AMPA-R désensibilisent plus fortement ce qui pourrait expliquer les changements observés au niveau de la PPR.

Chapitre 2 : Résultats

I. Première publication: “Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex”

Maki Hoshiko*, Isabelle Arnoux*, Elena Avignone, Nobuhiko Yamamoto & Etienne Audinat

The Journal of Neuroscience, 2012, 32(43): 15106-15111

(*co-premières auteures)

1. Présentation de l'article

De récentes données indiquent que les cellules microgliales influencent le développement et la mise en place des réseaux neuronaux. Ces cellules participent à l'induction de la mort neuronale développementale (Frade and Barde, 1998; Marín-Teva et al., 2004), au remodelage des circuits neuronaux via une élimination des éléments synaptiques inappropriés (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007; Tremblay et al., 2010), au contrôle des propriétés synaptiques (Roumier et al., 2004) ainsi qu'à la survie cellulaire via une libération de facteurs trophiques (Ueno et al., 2013). Cependant, les mécanismes par lesquels les cellules microgliales ciblent les synapses et influencent leur maturation fonctionnelle au cours du développement post-natal n'ont pas encore été identifiés. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à identifier le(s) voie(s) de signalisation impliquée dans le recrutement des cellules microgliales aux synapses immatures. Nous avons analysé le rôle de la fractalkine, une chimiokine neuronale dont l'unique récepteur CX3CR1 n'est exprimé dans le CNS que par la microglie et en contrôle des fonctions importantes (voir partie IV.2 de l'introduction).

Dans cette étude nous avons étudié les conséquences d'un déficit d'expression du récepteur microglial CX3CR1 sur le recrutement des cellules microgliales aux sites synaptiques ainsi que sur la maturation des synapses du cortex somatosensoriel de la souris dont le développement et les propriétés

synaptiques sont largement documentés (Daw et al., 2007; Inan and Crair, 2007; López-Bendito and Molnár, 2003).

Nos résultats montrent que le recrutement des cellules microgliales aux sites de maturation synaptique suit un déroulement temporel spécifique. Jusqu'au 5^{ème} jour post-natal les cellules microgliales se situent à la périphérie des tonneaux et ce n'est qu'à partir du 6^{ème} jour post-natal qu'elles commencent à envahir le centre des tonneaux où se situent les synapses thalamocorticales en maturation. Nous avons démontré que le recrutement des cellules avant le 7^{ème} jour post-natal dépend de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 et qu'un défaut d'expression du récepteur microglial retarde l'arrivée des cellules microgliales aux sites synaptiques. Nous proposons que cette voie de signalisation participe à l'attraction des cellules aux sites synaptiques. De plus, l'analyse fonctionnelle des synapses thalamocorticales indiquent que le déficit d'expression de CX3CR1 retarde également la maturation fonctionnelle des synapses. Nous avons montré que chez les animaux invalidés pour CX3CR1, la maturation des récepteurs post-synaptiques glutamatergiques est retardée. En effet, nous avons observé une altération de l'évolution du ratio des courants AMPA/NMDA ainsi qu'un retard dans le changement de sous-unités du récepteur NMDA entre la première et la seconde semaine post-natale. Ces résultats indiquent que les activités des cellules microgliales modulent l'expression fonctionnelle des récepteurs lors du développement.

En conclusion, la voie de signalisation réciproque fractalkine/CX3CR1 participe au recrutement des cellules microgliales aux synapses en développement et participe à la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales.

2. Article

Abstract:

Accumulative evidence indicates that microglial cells influence the normal development of brain synapses. Yet, the mechanisms by which these immune cells target maturing synapses and influence their functional development at early postnatal stages remain poorly understood. Here, we analyzed

the role of CX3CR1, a microglial receptor activated by the neuronal chemokine CX3CL1 (or fractalkine) which controls key functions of microglial cells. In the whisker-related barrel field of the mouse somatosensory cortex, we show that the recruitment of microglia to the sites where developing thalamocortical synapses are concentrated (i.e., the barrel centers) occurs only after postnatal day 5 and is controlled by the fractalkine/CX3CR1 signaling pathway. Indeed, at this developmental stage fractalkine is overexpressed within the barrels and CX3CR1 deficiency delays microglial cell recruitment into the barrel centers. Functional analysis of thalamocortical synapses shows that CX3CR1 deficiency also delays the functional maturation of postsynaptic glutamate receptors which normally occurs at these synapses between the first and second postnatal week. These results show that reciprocal interactions between neurons and microglial cells control the functional maturation of cortical synapses.

Introduction:

Microglial cells (MGCs) derive from myeloid progenitors born in the yolk sac and colonize the CNS during embryonic and early postnatal life (Pont-Lezica et al., 2011). Accumulating evidence indicates that, in addition to their roles in CNS diseases, MGCs also influence brain development. In humans, description of the spatiotemporal organization of microglia in the embryonic and fetal CNS suggests that these cells play active roles in developmental processes (Verney et al., 2010). In rodents, experimental evidence shows that MGCs contribute to developmentally regulated neuronal apoptosis but also to synapse pruning (Mallat et al., 2005; Pont-Lezica et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Tremblay et al., 2011).

In the diseased adult CNS, several signaling pathways control the recruitment of microglia at sites of compromised homeostasis (; Ransohoff and Perry, 2009). During normal CNS development, the signaling mechanisms by which MGCs reach and influence their neuronal targets at the right time remain poorly understood. Fractalkine (or CX3CL1) is one of the signaling molecules which can instruct microglia on neuronal and synaptic maturation. This chemokine is expressed by neurons; its receptor CX3CR1 is only expressed by MGCs and controls their migration and functions (Harrison et

al., 1998; Maciejewski-Lenoir et al., 1999; Cardona et al., 2006; Ruitenberg et al., 2008; Liang et al., 2009; Paolicelli et al., 2011). To explore further the role of MGCs on neuronal network maturation, we analyzed the impact of CX3CR1 deficiency on the development of the barrel field of the mouse somatosensory cortex. Indeed, the structural and functional development of the whisker pad representation in layer 4 of the cortex follows a precise and well documented pattern. Briefly, the first barrel-like structures emerge at postnatal day 4 (P4) from the convergence of thalamocortical axons (TCAs) conveying information from a single whisker and terminating in cortical layer 4. This initial step is followed by the aggregation of layer 4 neuronal cell bodies in the barrel walls around TCA clusters and the reorientation of their dendrites toward the barrel centers. In parallel, several functional parameters of thalamocortical synapses evolve between P4 and the end of the second postnatal week (López-Bendito and Molnár, 2003; Daw et al., 2007; Inan and Crair, 2007). We reasoned that this precise spatiotemporal pattern of development should help deciphering the roles of MGCs in neuronal circuit development. We found that the fractalkine/CX3CR1 signaling pathway controls MGC entry into the barrel centers and the proper functional maturation of thalamocortical synapses.

Material and Methods:

Animals.

All experiments followed European Union and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (council directive 86/609EEC). In few experiments heterozygous CX3CR1^{+eGFP} mice of either sex were obtained by crossing CX3CR1^{eGFP/eGFP} (Jung et al., 2000) with wild-type C57BL/6J mice (Janvier). However, most experiments were performed on homozygous (i.e., knock-out) and heterozygous animals from same littermates by crossing CX3CR1^{eGFP/eGFP} and CX3CR1^{+eGFP} mice. Mice were genotyped using the primers 5'-TTCACGTTTCGGTCTGGTGGG-3'; 5'-GATCACTCTCGGCATGGACG-3' and 5'-TTCACGTTTCGGTCTGGTGGG-3'; 5'-GGTTCCTAGTGGAGCTAGGG-3') producing 970- and 1010-bp-long fragments for wild-type and mutant alleles, respectively.

Immunohistochemistry.

Urethane (2 g/kg)-anesthetized mice were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, followed by overnight fixation of the brains (flattened for tangential sections). Fifty-micrometer-thick coronal or tangential sections were preincubated for 1 h at room temperature (RT) in PBS containing 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and then for 48 h at 4°C with primary antibodies against the serotonin transporter (5-HTT; 1:1000; rabbit polyclonal; Calbiochem), the glutamate vesicular transporter (VGluT2; 1:1000; guinea pig polyclonal; Millipore Bioscience Research Reagents), or the microglia-specific marker Iba1 (1:1000, rabbit polyclonal, Wako Chemicals). After washing, sections were incubated at RT with secondary antibodies Alexa Fluor546 (anti-rabbit IgG 1:300; Invitrogen) or Alexa Fluor633 (anti-guinea pig IgG 1:200; Invitrogen) and with TO-PRO-3 (1:1000; Invitrogen). For CX3CL1 immunostaining, sections were incubated for 1 h with 5% normal donkey serum and 0.5% Triton X-100 at RT, then 48 h at 4°C with CX3CL1 antibodies (1:50; goat polyclonal; R&D Systems). After 5 washes, sections were incubated for 48 h at 4°C with Cy3 (anti-goat IgG 1:200; Millipore Bioscience Research Reagents). Sections were mounted with Vectashield (Vector Labs).

Quantitative analysis.

ImageJ program was used to analyze confocal images spanning $30 \pm 6 \mu\text{m}$. We used tangential sections through layer 4 to count the number of microglial cells inside and outside TCA clusters immunostained for 5-HTT or VGluT2. The periphery of each barrel was defined by the borders of the neighboring TCA clusters. The numbers of MGCs inside and outside TCA clusters were counted. Six barrels of rows B and C were usually considered for each animal. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical evaluation was performed with one-way ANOVA test followed by Mann–Whitney *U* test (GraphPad InStat).

Electrophysiology.

Thalamocortical (TC) slices (400 μm) from P5 to P33 mice were prepared as previously described (Laurent et al., 2002) in an ice-cold solution containing (in mM): 215 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 20 glucose, 5 pyruvate, 1 CaCl_2 and 7 MgCl_2 , bubbled with carbogène, pH 7.4, 310

mOsm. Slices were then incubated for 30–45 min at 33°C, and subsequently maintained at RT (21–24°C) in a solution containing 126 mM NaCl instead of sucrose, 1 mM MgCl₂, and 2 mM CaCl₂. Individual slices were transferred to a recording chamber perfused with the same solution at 4 ml/min at RT. Whole-cell recordings were performed from layer 4 neurons with pipettes (3–5 MΩ) filled with a solution containing (in mM): 125 CsMeSO₃, 10 HEPES, 10 EGTA, 8 TEA-Cl, 5 4-AP, 0.4 GTP-Na, 4 ATP-Na₂, 1 CaCl₂ and 1 MgCl₂ (pH 7.3, 290 mOsm). Biocytin was included in the intracellular solution in 10 experiments and revealed a typical morphology of layer 4 multipolar spiny stellate cells, i.e., multipolar soma from which extended 3–6 spiny dendrites. Voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 200B (Molecular Devices). Currents were low-pass filtered at 1 kHz, collected at a frequency 10 kHz, and analyzed off-line using PClamp 9 (Molecular Devices). During recording, the series resistance (R_s) was not compensated and was monitored continuously. Recordings were discarded if R_s increased by >20%. All potentials were corrected for a junction potential of –8 mV. Synaptic responses were evoked with a stainless steel bipolar microelectrode (100 μm tip diameter, 250 μm intertip distance; Rhodes Medical Instruments) connected to stimulus isolation unit (Iso-stim 01D; npi Electronic) and placed in the internal capsule near the thalamus border. The intensity of stimulation (0.2 ms and 0.05 Hz) was adjusted according to the protocol of minimal stimulation described by Laurent et al. (2002). The amplitude and time constants of EPSCs were quantified from the average of 15–20 consecutive responses. EPSC decays were fitted with a double exponential function $[A_1\exp(t/\tau_1) + A_2\exp(t/\tau_2)]$ and the weighted time constant of the decay was defined as $\tau_{\text{weighted}} = [\tau_1 \times A_1/(A_1 + A_2)] + [\tau_2 \times A_2/(A_1 + A_2)]$. To determine the paired-pulse ratio of TC EPSCs, paired stimulations were evoked at –70 mV with an interval of 60 ms and the ratio of the second over the first EPSC was measured on the averaged response. When outward currents were evoked at 0 mV, gabazine (Gbz; SR-95531; Ascent Scientific) was added to the bath to inhibit GABA_A receptors. The following drugs were also applied in the perfusion: d-(–)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (d-AP-5) and 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX; Ascent Scientific) and Ro256981 (Tocris Bioscience). Values are presented as mean ± SEM. Statistical significance was tested with a Mann–Whitney *U* test or unpaired

t tests (GraphPad InStat). Throughout the text *n* refers to the number of cells and *N* to the number of animals.

Results:

Fractalkine/CX3CR1 signaling controls microglial cell entry into the barrel centers

We first examined the distribution of microglia in layer 4 of the developing barrel cortex of CX3CR1^{+eGFP} mice in which MGCs are the only fluorescent cells in the healthy brain (Jung et al., 2000). In tangential sections through layer 4 at P4 and P5, the first stages at which barrels can be identified (Rebsam et al., 2002), we observed that MGCs remained mostly outside clusters of TCAs (Fig. 1A) which occupy the barrel hollows (Fig. 1C). The invasion of TCA clusters by MGCs started at P6 and became more evident at P7 (Fig. 1A). The ratio of the number of microglia inside and outside TCA clusters (I/O ratio) increased progressively between P5 and P9 (Fig. 1D) and was closed to unity in the barrel field of adult mice (0.93 ± 0.10 ; *N* = 3; P60–P70). A similar developmental pattern was observed in CX3CR1^{+/+} mice with almost no microglia entering TCA clusters before P6 and an I/O ratio at P7 of 0.39 ± 0.19 (Fig. 1C; *N* = 3) similar to that observed in CX3CR1^{+eGFP} mice (Fig. 1D; *p* = 0.28).

We then tested whether CX3CL1/R1 signaling influences this precise spatiotemporal distribution of MGCs distribution in the developing barrel field by analyzing CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice in which MGCs do not express functional fractalkine receptors (Jung et al., 2000). Although MGCs were also distributed around TCA clusters at P5 (Fig. 1B), there was a significant deficit of MGCs inside TCA clusters of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice at P6 and P7 (Fig. 1B,D). This deficit of MGC entry into the TCA clusters of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice was transient and there was no difference in the I/O ratio between heterozygous and homozygous mice at P9 (Fig. 1D). In contrast with recent observations in the developing hippocampus (Paolicelli et al., 2011), we did not observed an overall lower density of MGCs in layer 4 of the somatosensory cortex of these mice compared with that of CX3CR1^{+eGFP} animals (Fig. 1E,F). This suggests that fractalkine favors the recruitment of MGCs at maturing synapses rather than controls the overall density of these cells in the cortex. In agreement with this

hypothesis, we found that fractalkine immunoreactivity labels the barrels of the somatosensory cortex between P5 and P7 (Fig. 1G; $N = 3$). Before the formation of the barrels, at P3, fractalkine immunostaining was more diffuse and did not allow the identification of the barrels ($N = 2$) whereas in the adult cortex individual cells were immunostained in all cortical layers ($N = 2$; Fig. 1G).

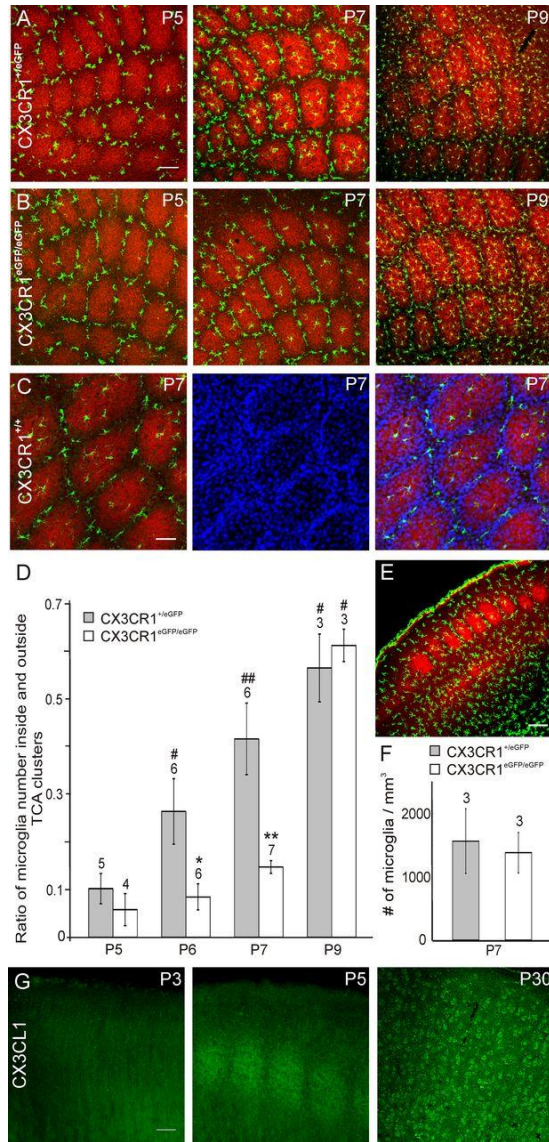


Figure 1. CX3CL1/R1 signaling controls the entry of microglia into TCA clusters.

A, B, Merge confocal images of tangential sections through layer 4 showing TCA (red, anti-5-HTT) and fluorescent microglia (green) of the barrel field of P5, P7, and P9 CX3CR1^{+/eGFP} (**A**) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (**B**) mice.

C, Confocal images of a tangential section through layer 4 of a P7 CX3CR1^{+/+} mouse showing microglia (green, anti-Iba1), TCAs (red, anti-VGLut2) and nuclei (blue, TO-PRO-3).

D, Comparison of the ratio of microglia number inside and outside TCA clusters in CX3CR1^{+/eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$ between CX3CR1^{+/eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ between P5 and other ages; Mann-Whitney U test.

E, Coronal section of the barrel cortex of a P7 CX3CR1^{eGFP/eGFP} used to count microglial cells (green) in layer 4 (red, TCAs, anti-5-HTT).

F, Comparable microglia density in layer 4 of CX3CR1^{+/eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice ($p = 0.44$, Mann-Whitney U test).

G, Postnatal development of CX3CL1 (fractalkine) immunoreactivity in coronal sections of the mouse somatosensory cortex.

Scale bars: **A, E**, 100 μ m; **C**, 50 μ m; **G**, 200 μ m. Numbers above bar histograms refer to animal numbers.

Impaired functional maturation of thalamocortical synapses in CX3CR1 deficient mice

We then asked whether altered MGC development in the barrel field of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice was associated with modifications of the functional maturation of thalamocortical synapses. The proportion of postsynaptic AMPA receptors (AMPA) increases at these synapses between the first and the second postnatal week, leading to an increase of the ratio of AMPAR- to NMDA receptor (NMDAR)-mediated synaptic currents (AMPA/NMDAR ratio) (Daw et al., 2007; Inan and Crair, 2007). We

thus studied postsynaptic currents evoked by minimal stimulations of TCAs in layer 4 neurons in thalamocortical acute slices of the barrel cortex (Fig. 2A,B; see Materials and Methods). The peaks of the fast AMPAR-mediated and of the slow NMDAR-mediated components of the EPSCs were measured at holding potentials of -70 mV and $+40$ mV, respectively (Fig. 2E). As expected, the AMPAR/NMDAR ratio gradually increased in CX3CR1^{+eGFP} mice of P5 ($N = 5$, the number of cells n is given in Fig. 2G), P7 ($N = 10$) and P9 ($N = 17$; Fig. 2F). At this latter stage, the AMPAR/NMDAR ratio of CX3CR1^{+eGFP} mice (0.75 ± 0.09) was not significantly different from that of CX3CR1^{+/+} mice (0.84 ± 0.12 ; $n = 9$, 3 animals). In contrast, the AMPAR/NMDAR ratio at thalamocortical synapses of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice did not change significantly over the same developmental window (Fig. 2F) with mean values remaining below 0.5 at P5 ($N = 3$), P7 ($N = 5$), and P9 ($N = 6$; Fig. 2G). Consequently, the AMPAR/NMDAR ratio at P9 was significantly lower in CX3CR1^{eGFP/eGFP} than in CX3CR1^{+eGFP} mice (Fig. 2G). The paired-pulse depression, which reflects mostly presynaptic properties, did not differ between CX3CR1^{+eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice over the same developmental window (Fig. 2C,D; $N > 3$ animals in each case).

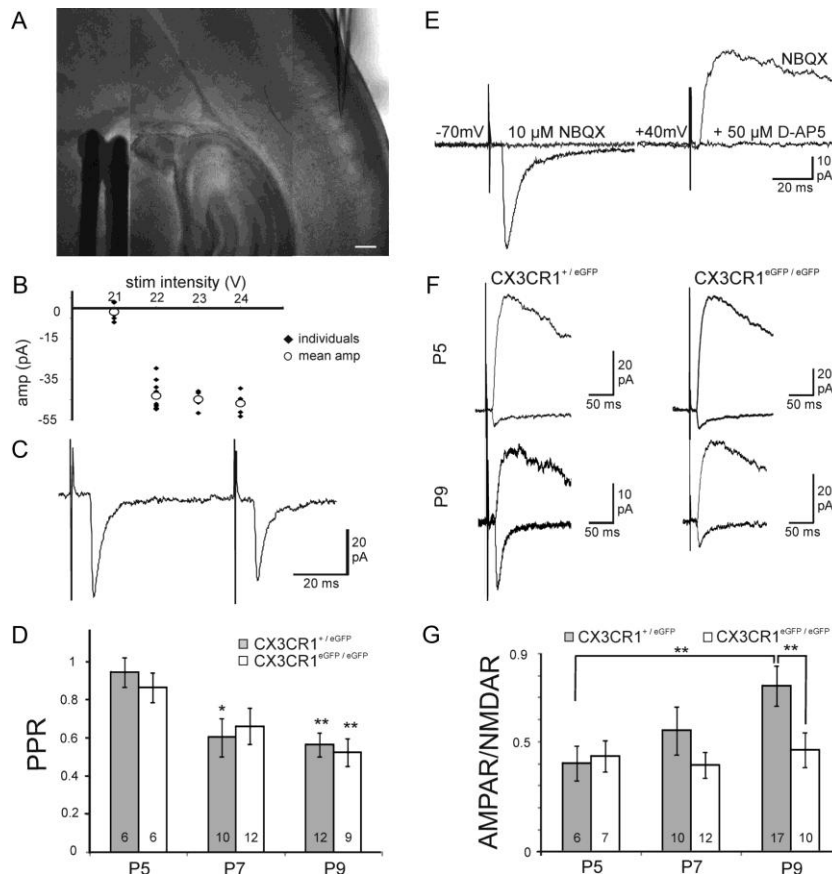


Figure 2. CX3CR1 deficiency impairs the functional maturation of thalamocortical synapses.

A, DIC image of a P7 thalamocortical slice with the recording pipette in a barrel and the bipolar stimulating electrode in the internal capsule. Scale bar, 200 μ m.

B, Peak amplitude of individual (black dots) and mean (white circles) thalamocortical EPSCs plotted as a function of the stimulation intensity for the determination of the minimal stimulation (22 V in this example).

C, Same cell as in **B**, thalamocortical EPSCs evoked by two stimulations for the determination of the paired-pulse ratio.

D, Similar paired-pulse ratios of thalamocortical EPSCs in CX3CR1^{+eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice at P5, P7, and P9. Statistical differences between P5 and other ages within each genotype are indicated.

E, Effect of NBQX and d-AP-5 on thalamocortical EPSCs evoked in a P9 neuron.

F, AMPAR- and NMDAR-mediated EPSCs in layer 4 neurons of P5 and P9 CX3CR1^{+eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice.

G, Comparison of the AMPAR/NMDAR ratio for P5, P7, and P9 CX3CR1^{+eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice. Each trace is an average of 15–20 individual sweeps. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired t test with Welch correction).

Postsynaptic NMDARs at thalamocortical synapses contains predominantly GluN2B subunits during the first postnatal week and GluN2A at the end of the second week. To test whether this developmental maturation process occurs normally in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice, we estimated the relative contribution of GluN2B-containing receptors in NMDAR-mediated synaptic currents of layer 4 neurons of P9–P10 mice by using the GluN2B selective antagonist Ro256981 (300 nm). The charge of NMDAR-mediated responses was reduced by $21.48 \pm 5.38\%$ ($N = 7$) and by $44.32 \pm 5.60\%$ ($N = 5$) in CX3CR1^{+eGFP} and in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice, respectively (Fig. 3A,B), indicating that a higher proportion of GluN2B-containing NMDARs were maintained at maturing synapses of CX3CR1^{eGFP/eGFP}. The decrease in GluN2B relative contribution during development is associated with faster kinetics of NMDAR-mediated synaptic currents (Daw et al., 2007; Inan and Crair, 2007). Accordingly, the weighted decay time constant of NMDAR-mediated synaptic currents at thalamocortical synapses of CX3CR1^{+eGFP} mice decreased from 187.79 ± 6.29 ms at P5–P7 ($N = 7$) to 145.42 ± 12.07 ms at P9–P10 ($N = 11$; Fig. 3C,D). In contrast, in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice this decay time constant did not change between P5 and P7 (198.69 ± 22.15 ms; $N = 6$) and P9 and P10 (197.06 ± 15.07 ms; $N = 10$; $p = 0.95$; Fig. 3C,D). Consequently, the decay time constant of NMDAR-mediated synaptic responses at P9–P10 was slower in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice than in CX3CR1^{+eGFP} mice (Fig. 3D). Finally, this impairment in synapse functional maturation in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice was only transient since the decay time constant of NMDAR-mediated synaptic currents in P27–P33 animals

did not differ between CX3CR1^{+eGFP} ($N = 8$) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} ($N = 4$) mice (Fig. 3D) and was similar to that of CX3CR1^{+/+} animals (107.71 ± 8.23 ms; $n = 12$; $N = 8$; $p > 0.5$, unpaired t test with Welch correction). Overall, our results show that CX3CR1 deficiency induced a transient impairment in the maturation of glutamate receptor functional expression at thalamocortical synapses of layer 4 neurons.

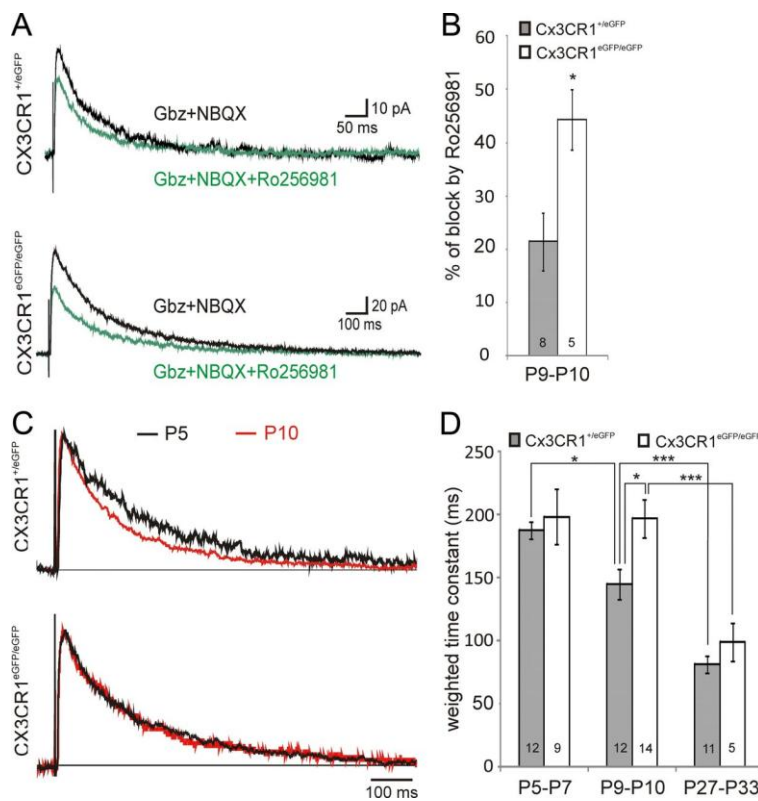


Figure 3. CX3CR1 deficiency impairs the GluN2B to GluN2A developmental switch occurring at thalamocortical synapses between the first and second postnatal week.

A, Effect of 300 nm Ro256981 on averaged (15–20 sweeps) NMDAR-mediated EPSCs in P10 neurons of CX3CR1^{+eGFP} (upper traces) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (lower traces) mice.

B, Summary of Ro256981 effects on NMDAR-mediated current charges for P9–P10 neurons.

C, Normalized average traces of NMDAR-mediated currents recorded in layer 4 neurons of P5 (black) and P10 (red) of CX3CR1^{+eGFP} (upper traces) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (lower traces) mice.

D, Comparison of the weighted decay time constant in P5–P7, P9–P10, and adult CX3CR1^{+eGFP} and CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t test with Welch correction).

Discussion:

Although macrophages are known to influence the development of peripheral organs, the idea that brain resident macrophages could play a role during CNS development is relatively new (Erblich et al., 2011; Pont-Lezica et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011). Our analysis of the developing barrel cortex of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice indicates that fractalkine signaling controls the recruitment of MGCs at maturing synapse sites and that, in turn, MGCs influence the functional maturation of thalamocortical synapses.

The striking distribution of MGCs around TCA clusters until P5 is in marked contrast with their homogeneous distribution in the cortex of adult animals. It resembles that of microglia around glomeruli of the developing olfactory bulb (Fiske and Brunjes, 2000) and indicates that MGC colonization of layer 4 does not proceed randomly. The reasons why MGCs refrain from entering the barrel hollows before P6 remain to be identified but clearly fractalkine signaling does not control this initial step. Indeed, CX3CR1 deficiency does not affect the initial distribution of MGCs around TCA clusters. Surprisingly, despite the fact that MGC entry within TCA clusters is delayed by 2 d in CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice, the overall number of MGCs present in layer 4 at P7 is not different from that observed in CX3CR1^{+/-eGFP} mice in which MGCs have already invaded TCA clusters at this stage. These results are in apparent contradiction with those of Paolicelli et al. (2011) indicating that fractalkine regulates the overall number of MGCs colonizing the hippocampus. Our results support a more local role of fractalkine in which cellular elements localized within the barrel hollows, possibly thalamic fibers, overexpress the chemokine at P5–P7 and thus favor directed migration of microglia (Harrison et al., 1998; Maciejewski-Lenoir et al., 1999) toward maturing thalamocortical synapses.

Impairment of the AMPAR/NMDAR ratio and of the GluN2B-to-GluN2A developmental switch as those described here during postnatal development of CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice have also been reported in the hippocampus of mice deficient for the microglial immunoreceptor adaptor DAP12 (Roumier et al., 2004). In these mice, however, this modification which results from a transient impairment of microglia-neuron interactions during embryonic life is observed at excitatory synapses of mature animals (Roumier et al., 2008). In contrast, we show here that the kinetics of NMDAR-mediated synaptic responses in adult CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice do not differ from those of control mice. Thus, transient impairment in NMDAR maturation seems to result from the transient delay in MGCs recruitment at thalamocortical synaptic sites. A first hypothesis to explain this observation would be that MGCs, once inside TCA clusters, could contribute to the selection of synapses with a mature signature of their glutamate receptors (Yashiro and Philpot, 2008) by pruning immature synapses through phagocytosis (Paolicelli et al., 2011) in a complement-dependent manner (Schafer et al., 2012). Alternatively, signaling molecules such as interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α or brain-

derived neurotrophic factor, known to be released by microglia, can modulate the expression and the function of glutamate receptors (Beattie et al., 2002; Chao, 2003; Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2010). They could therefore influence, directly or indirectly, the functional properties of thalamocortical synapses during development by controlling the expression, targeting, mobility or degradation of glutamate receptors. Several studies on adult rodents have reported that CX3CL1/R1 signaling, probably by controlling the activation state of MGCs, has an impact on functional properties and plasticity of hippocampal glutamate synapses (Ragozzino et al., 2006; Maggi et al., 2011; Rogers et al., 2011). Further studies are thus needed to test whether properties of thalamocortical synapses other than those tested here, such as long-term potentiation, are also controlled by CX3CL1/R1 signaling. Finally, MGCs probably also influence other aspects of barrel maturation such as the rearrangement of dendrites of layer 4 cells and the removal of subplate cell neurites which occurs at the end of the first postnatal week (Hoerder-Suabedissen and Molnár, 2012).

Footnotes:

Received March 9, 2012.

Revision received August 21, 2012.

Accepted August 29, 2012.

This work was supported by Inserm, CNRS, The Agence Nationale de la Recherche (ANR 2010 BLAN 1419 01), the Région Ile-de-France (NeRF), the Collège Doctoral Franco-Japonais, Kakenhi 20021018, and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas “Mesoscopic Neurocircuitry” (No.23115102) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the Uehara Memorial foundation. Confocal pictures were acquired at the microscopy platform of the Saints Pères University Center. The Audinat lab is affiliated to Paris School of Neuroscience (ENP). We thank Nicole Ropert and Alexis Evrard for advice and helpful discussions throughout this study, Serge Charpak and Céline Bidoret for critical reading of an earlier version of the manuscript, Patricia Gaspar for advice on initial experiments, Jérôme Lecoq for computer programs, and Françoise Levavasseur for her help with some experiments and with the breeding of mouse colonies.

Correspondence should be addressed to Etienne Audinat, Laboratoire de Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies, INSERM U603, CNRS UMR 8154, Université Paris Descartes, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. etienne.audinat@parisdescartes.fr

References:

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295:2282–2285.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917–924.

Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309.

Daw MI, Scott HL, Isaac JT (2007) Developmental synaptic plasticity at the thalamocortical input to barrel cortex: mechanisms and roles. *Mol Cell Neurosci* 34:493–502.

Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* 6:e26317.

Fiske BK, Brunjes PC (2000) Microglial activation in the developing rat olfactory bulb. *Neuroscience* 96:807–815.

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387–1394.

Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10896–10901.

Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2012) Morphology of mouse subplate cells with identified projection targets changes with age. *J Comp Neurol* 520:174–185.

Inan M, Crair MC (2007) Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *Neuroscientist* 13:49–61.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106–4114.

Laurent A, Goillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N (2002) Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J Neurosci* 22:886–900.

Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT (2009) Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4444–4451.

Lopez-Bendito G, Molnár Z (2003) Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4:276–289.

Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB (1999) Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol* 163:1628–1635.

Maggi L, Scianni M, Branchi I, D'Andrea I, Lauro C, Limatola C (2011) CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Front Cell Neurosci* 5:22.

Mallat M, Marín-Teva JL, Che´ret C (2005) Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101–107.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456–1458.

- Pont-Lezica L, Be´chade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A (2011) Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 119: 901–908.
- Ragozzino D, Di Angelantonio S, Trettel F, Bertollini C, Maggi L, Gross C, Charo IF, Limatola C, Eusebi F (2006) Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 26:10488–10498.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119–145.
- Rebsam A, Seif I, 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* 22:8541–8552.
- Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, Gemma C (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 31:16241–16250.
- Roumier A, Be´chade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci* 24:11421–11428.
- Roumier A, Pascual O, Be´chade C, Wakselman S, Poncer JC, Re´al E, Triller A, Bessis A (2008) Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One* 3:e2595.
- Ruitenbergh MJ, Vukovic J, Blomster L, Hall JM, Jung S, Filgueira L, Mc-Menamin PG, Plant GW (2008) CX3CL1/fractalkine regulates branching and migration of monocyte-derived cells in the mouse olfactory epithelium. *J Neuroimmunol* 205:80–85.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691–705.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F (2011) Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 21:5–10.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064–16069.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P (2010) Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 217: 436–448.
- Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081–1094.
- Zhang R, Sun L, Hayashi Y, Liu X, Koyama S, Wu Z, Nakanishi H (2010) Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1 β . *Neurobiol Dis* 38:68–77.
- Zhong Y, Zhou LJ, Ren WJ, Xin WJ, Li YY, Zhang T, Liu XG (2010) The direction of synaptic plasticity mediated by C-fibers in spinal dorsal horn is decided by Src-family kinases in microglia: the role of tumor necrosis factor- α . *Brain Behav Immun* 24:874–880.

II. Deuxième publication: “Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory barrel cortex”

Isabelle Arnoux*, Maki Hoshiko*, Léo Mandavy, Elena Avignone, Nobuhiko Yamamoto & Etienne Audinat

Glia 2013, 61(10):1582-1594

(*Co-premières auteures)

1. Présentation de l'article

Les cellules microgliales influencent le développement du CNS par différents processus tels que l'induction de l'apoptose neuronale mais aussi via l'élimination de synapses inappropriées. Dans notre précédente publication (voir partie I. Premier article), nous avons montré que les cellules microgliales, dans la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire de la souris, sont recrutées seulement après le 5^{ème} jour post-natal au centre des tonneaux où se situe les synapses thalamocorticales en maturation. Nous avons démontré que la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 était impliquée dans ce recrutement des cellules microgliales et qu'un recrutement retardé des cellules microgliales coïncidait avec un retard dans la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales situées au centre des tonneaux. Ces résultats suggèrent que la microglie joue un rôle actif dans la maturation synaptique à ce stade du développement, ce qui devrait se traduire par une modification du phénotype microglial pendant cette période (voir introduction).

Nous avons donc étudié le phénotype des cellules microgliales au cours du développement post-natal dans le cortex somatosensoriel primaire en combinant des approches immunohistochimiques et électrophysiologiques. Nous montrons que les cellules microgliales évoluent vers une morphologie plus ramifiée avec un soma plus réduit entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour post-natal. De plus, nous retrouvons l'expression de marqueurs immunohistochimiques des cellules microgliales mais nous n'avons pas observé d'expression de marqueurs classique d'activation Mac-2 et MHCII. De façon intéressante, les enregistrements électrophysiologiques des cellules microgliales mettent en évidence l'expression de canaux potassiques dépendants du potentiel Kv1.3 au sein d'une proportion des cellules microgliales

de la couche 4. Cette proportion de cellules exprimant Kv1.3 augmente transitoirement au cours du développement post-natal et atteint son maximum au moment où les cellules microgliales atteignent les sites synaptiques en maturation fonctionnelle. Enfin, l'analyse des réponses purinergiques indiquent que, en comparaison des cellules microgliales n'exprimant pas Kv1.3, un fort pourcentage de celles qui expriment ce canal potassique exprime aussi des récepteurs P2Y6 et P2Y12 fonctionnels, alors que toutes les cellules expriment P2X7.

Nous émettons plusieurs hypothèses concernant l'expression de Kv1.3 : 1) l'expression de cette sous-unité est nécessaire à la migration des cellules microgliales, 2) Kv1.3 joue un rôle dans les activités des cellules microgliales et participe à la maturation des synapses et 3) l'expression de Kv1.3 est nécessaire aux transformations morphologiques microgliales et serait un marqueur de maturation des cellules microgliales. Par ailleurs, Kv1.3 est une sous-unité classiquement trouvée dans des cellules microgliales activées en conditions pathologiques chez l'adulte et des études précédentes proposent que cette sous-unité soit un marqueur d'activation des cellules microgliales. Nous démontrons ici que les cellules microgliales peuvent exprimer Kv1.3 sans pour autant exprimer d'autres marqueurs d'activation.

En conclusion, cette étude indique que les propriétés des cellules microgliales évoluent de façon différentielle au cours du développement post-natal et que la maturation de certaines de ces propriétés serait sensible aux changements survenant dans leur environnement local.

2. Article

Abstract:

Accumulative evidence indicates that microglial cells influence the normal development of central nervous system (CNS) synapses. Yet, the functional properties of microglia in relation with synapse development remain unclear. We recently showed that in layer 4 of the whisker-related barrel field of the mouse somatosensory cortex, microglial cells are recruited only after postnatal day (P)5 in the center of the barrels where thalamo-cortical synapses are concentrated and begin their maturation. In

the present study, we analyzed the phenotype of microglia during this developmental process. We show that between P5 and P7 microglial cells acquire a more ramified morphology with a smaller soma, they express classical markers of microglia (Iba1, CD11b, and CD68) but never markers of activation (Mac-2 and MHCII) and rarely the proliferation marker Ki67. Electrophysiological recordings in acute cortical slices showed that at P5 a proportion of layer 4 microglia transiently express voltage-dependant potassium currents of the delayed rectifier family, mostly mediated by Kv1.3 subunits, which are usually expressed by activated microglia under pathological conditions. This proportion of cells with rectifying properties doubles between P5 and P6, in concomitance with the beginning of microglia invasion of the barrel centers. Finally, analysis of the responses mediated by purinergic receptors indicated that a higher percentage of rectifying microglia expressed functional P2Y6 and P2Y12 receptors, as compared with nonrectifying cells, whereas all cells expressed functional P2X7 receptors. Our results indicate that during normal cortical development distinct microglia properties mature differentially, some of them being exquisitely influenced by the local environment of the maturing neuronal network.

Introduction:

Unlike macroglial cells and neurons, which are of neuroectoderm origin, microglial cells derive from myeloid progenitors born in the yolk sac that enter the brain during early embryonic life (Alliot et al., 1999; Chan et al., 2007; Cuadros et al., 1997; Ginhoux et al., 2010; Ling et al., 2001; Schulz et al., 2012). Description of the spatio-temporal distribution of microglia in the immature central nervous system (CNS) indicates that microglia colonization is not random and follows specific patterns reflecting the occurrence of interactions between microglial cells with different components of the CNS, such as other glial cells, blood vessels, neural progenitors, maturing axonal bundles, developing, and dying neurons (Ashwell, 1989; Caldero et al., 2009; Cuadros et al., 1997; Dalmau et al., 1998; Herbomel et al., 2001; Male et al., 2001; Monier et al., 2007; Rezaie et al., 1999; Rigato et al., 2011). This early colonization allows microglial cells to play an active role in the normal development of the

CNS through different mechanisms (reviewed in Mallat et al., 2005; Pont-Lezica et al., 2011; Schafer et al., 2013; Schlegelmilch et al., 2011). One well studied function of microglial cells during CNS development is the regulation of developmental cell death. Microglial cells can remove cellular debris and dead cell corpses through their phagocytosis activity, at least *in vitro* (Marin-Teva et al., 2004), but they can also directly instruct neuronal apoptosis by releasing superoxide ions or through nerve growth factor and tumor necrosis factor alpha signaling pathways (Frade and Barde 1998; Marin-Teva et al., 2004; Sedel et al., 2004; Wakselman et al., 2008). Recent evidence also indicates that microglial cells regulate synapse density during development. Indeed, microglial processes establish physical specific contacts with synapses and regulate the size of dendritic spines during critical period of the neocortex development (Tremblay et al., 2010). Eventually, these contacts between microglia processes and synapses can lead to the pruning of pre- and postsynaptic elements through the phagocytic activity of microglial cells. This process allows microglia to regulate synapse density in the developing hippocampus (Paolicelli et al., 2011) and to remove unwanted synapses through a complement-dependant mechanism during establishment of ocular dominance maps in the developing thalamus (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007).

In pathological conditions, specific functions of microglial cells are associated with dramatic changes of their phenotype. This so-called activation of microglia is a multifaceted and adaptive process, which includes changes in morphology, membrane properties, ability to migrate, to proliferate and to release of a variety of mediators, such as proinflammatory cytokines and neurotrophins (Hanisch et al., 2007; Kettenmann et al., 2011; Ransohoff and Perry, 2009). These properties are under the control of various “on” and “off” signaling molecules which are differently expressed in different stimulatory contexts and thus determine the activation profile of microglial cells (Biber et al., 2007; Hanisch et al., 2007). The functional state of microglial cells during the development is still poorly documented.

Yet, the amoeboid morphology of maturing microglial cells, the expression of activation markers when they interact with neurons engaged in developmental programmed cell death (Rigato et al., 2011), and the observation that minocycline, an inhibitor of microglia activation, inhibits the pruning of synapses during development (Schafer et al., 2012) suggest that maturing microglial cells can adopt a functional state close to that of activated microglia.

The so-called “barrels” in layer 4 of the rodent somatosensory cortex are the cortical representation of the whisker pad and provide a nice model to study cellular interactions during postnatal development. Indeed, the structural and functional development of the barrels follows a precise and well documented pattern (Catalano et al., 1996; Daw et al., 2007; Erzurumlu and Gaspar, 2012; Inan and Crair, 2007; Lopez-Bendito et al., 2003; Petersen, 2007; White et al., 1997). Briefly, the first barrel-like structures emerge at postnatal day (P) 4 from the convergence of thalamo-cortical axons (TCA) conveying information from a single whisker and terminating in cortical layer 4 (Erzurumlu and Jhaveri, 1990). This initial step is rapidly followed by the relocation of layer 4 neuronal cell bodies at the periphery of the TCA clusters, forming the barrel walls, by the reorientation of their dendrites toward the barrel centers and by the pruning of TCA terminals (Erzurumlu and Gaspar, 2012; Inan et al., 2006; Li and Crair, 2011). Several functional pre- and postsynaptic parameters of the thalamo-cortical synapses evolve dramatically between P4 and the end of the second postnatal week (Daw et al., 2007; Inan and Crair, 2007). We recently observed that microglial cells are recruited at sites of thalamo-cortical synapses (i.e., the barrel centers) after P5 and that a deficit in this recruitment is associated with an impairment of the functional maturation of these glutamatergic synapses (Hoshiko et al., 2012). Specifically, we observed that deficiency of the microglial fractalkine receptor CX3CR1 delays the invasion of microglial cells within the barrel centers and impairs the normal development of the AMPA and NMDA receptor-

mediated components of thalamo-cortical synaptic responses. This suggests that signaling molecules of microglial origin influence the functional expression of glutamate receptors at developing synapses. In the present study, we thus aimed at determining the functional state of microglial cells at this specific developmental stage of the somatosensory cortex. Our results indicate that during their colonization of the developing neocortex, microglial cells express properties, which are evolving rapidly and some, but not all, of them are influenced by the local environment of the maturing neuronal network.

Material and Methods:

Animals.

All experiments followed European Union and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (council directive 86/609EEC). The heterozygous CX3CR1^{+eGFP} mice used in this study were obtained by crossing CX3CR1^{eGFP/eGFP} (Jung et al., 2000) with C57BL/6 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) wild type mice. A subset of experiments was performed by crossing CX3CR1^{eGFP/eGFP} and CX3CR1^{+eGFP} mice to generate knockout and heterozygous animals in the same littermates.

Immunohistochemistry.

Mice from P0 to P70 were anesthetized with Uretane (2 g/kg) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Brains were postfixed overnight with the same fixative before preparing coronal 50 µm thick sections with a VT 1000 Leica vibratome. The serial coronal sections were collected in phosphate buffer saline (PBS). Sections were incubated for 1 h with PBS containing 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at room temperature. Slices were then incubated 48 h at 4°C with primary antibodies against the proliferation marker Ki67 (1:200; rabbit polyclonal; Abcam), microglia markers Iba1 (1:1000; rabbit polyclonal; Wako), Mac-2 (1:1000, rat monoclonal, kindly provided by M. Benhamou; Inserm U699, Paris, France; obtained from hybridomas (TIB-166) distributed by ATCC), MHC-II (1:500; rat

monoclonal; BD Pharmingen), CD11b (1:1000; rat monoclonal; Serotec), CD68 (1:1000; rat monoclonal; Serotec), F4/80 (1:1000; rat monoclonal, Abcam). Blood vessels were labeled with antibodies against laminin (1:500; rabbit polyclonal; Sigma). Thalamic fibers were labeled with antibodies against 5HTT (1:1000; rabbit polyclonal; Calbiochem) or VGluT 2 (1:1000; guinea pig polyclonal; Chemicon International). Slices were then incubated 2 h at room temperature with secondary antibody Alexa 546 (antirabbit IgG 1:300; Invitrogen), Alexa 555 (antirat IgG 1:300; Invitrogen), Alexa 633 (antimouse IgG 1:200; Invitrogen), Alexa 633 (antirabbit IgG 1:200; Invitrogen), or Alexa 633 (antiguinea pig IgG 1:200; Invitrogen). After staining, brain slices were mounted with Vectashield H1400 with DAPI (Vector lab). Mounted slices were observed with an epifluorescent (Olympus BX61) or with a confocal laser-scanning microscope (Zeiss 510).

Quantitative Analysis.

Confocal images spanning $30 \pm 6 \mu\text{m}$ in total thickness were imported in ImageJ and further processed for quantitative analysis. We used a homemade program (written in Matlab by Dr. J. Lecoq) to count the number of microglia in each layer of the barrel cortex at P5, P6, P7, and in adult (P50-70) coronal sections. The limits of each layer were determined with the help of the DAPI and 5HTT or VGluT2 staining. The same program was used to measure the weighted radius of microglial cells, which was determined after morphing the profile of each microglial cell into a circle. Primary processes extending from microglia soma were manually counted in optical slices of confocal stacks using ImageJ. The 3D image reconstructions of microglia were performed with Imaris (Bitplane). For the quantification of Ki-67 positive microglial cells, number of GFP positive microglial cells and that of Ki-67 positive microglial cells were counted manually in each optical slice of confocal stacks. Data were presented as mean $\pm$ s.e.m. Statistical evaluation was performed with the program GraphPad Instat. The tests used, either one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test or Mann–Whitney *U*-test, and the *P*-values are specified in the text or in the figure legends.

Electrophysiology.

Postnatal day 5 to 35 mice were used to prepare coronal cortical slices. Brain were dissected and 300 μm thick slices were cut with a vibratome (Leica VT 1000S) in an ice-cold solution containing (in

millimolar): 215 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 20 glucose, 5 pyruvate, 1 CaCl₂ and 2 MgCl₂, bubbled with carbogène (95% O₂, 5% CO₂), pH 7.4, osmolarity ~310 mOsm. The slices were then incubated for 30–45 min at 33°C, and subsequently maintained at room temperature, in a solution containing 126 mM NaCl instead of sucrose and 1 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂. Finally, individual slices were transferred to a recording chamber perfused with the same solution at 3 mL/min and at room temperature (21–24°C). The recording chamber was attached to the stage of an upright Olympus microscope (BX50WI) with a 40× water-immersion objective, equipped with cell-R imaging station including MT20 illumination system (Olympus) and a CCD camera (Hamamatsu ORCA2-AG). Visually identified GFP-expressing microglial cells were patched in whole-cell configuration in the barrel cortex. Micropipettes (6–8 MΩ) were usually filled with a solution containing the following composition (in millimolar): 132 K-gluconate, 11 HEPES, 0.1 EGTA, and 4 MgCl (pH 7.35 adjusted with KOH, osmolarity 300 mOsm). For the recordings of P2X7 receptor-mediated currents pipettes were filled with 125 Cs-gluconate, 10 HEPES, 0.2 EGTA, and 1 MgCl (pH 7.35 adjusted with CsOH, osmolarity 300 mOsm). All potential values given in the text were corrected for a junction potential of 10 mV. Voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 200B (Molecular Devices). Currents were low-pass filtered at 5 kHz, collected using Pclamp 9 (Molecular Devices) at a frequency 10 kHz and analyzed off-line using Clampfit (Molecular Devices). An electrophysiological characterization in voltage clamp was made at the beginning of the recording. Hyperpolarizing and depolarizing steps (from -150 to +30 mV for 50 ms) were used to determine I/V relationship of each recorded cell. Membrane input resistance and capacitance of the cells were determined from the current responses to voltage pulses ranging from -20 to +20 mV from a holding potential of -70 mV. Activation and inactivation curves of voltage activated outward potassium currents were obtained by measuring the peak of the current during the 1 s prepulse (-90 to +50 mV) and 250 ms pulse test (+50 mV), respectively, as in (Menteyne et al., 2009). After subtracting the leak current determined by fitting the linear part of the I/V curve (from -80 to -50 mV), the conductance was normalized to its maximal value and plotted against holding or prepulse potential. The curves were fitted with the Boltzman equation $G/G_{\max}=100/(1 + \exp^{((V_{1/2} - V)/k)})$, where $V_{1/2}$ is the voltage at which the current is half activated, and k is the slope factor of the activation curve. The I/V curves of the responses induced by

the activation of purinergic receptors were determined by subtracting the current responses to the same voltage steps applied in control conditions from those obtained in the presence of the agonists.

All tested drugs were applied through the general perfusion. Recombinant margatoxin (Alomone labs; Jerusalem, Israel) was applied in the presence of 0.1% bovine serum albumin added to the extracellular solution. The antagonist of P2X7 receptor A740003 (Honore et al., 2006) was obtained from @rtMolecule (Poitiers, France), tetra ethyl ammonium (TEA), purinergic receptor agonists ATP, UDP, 2-(Methylthio)adenosine-5'-(trihydrogen diphosphate) (2-MeSADP) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Values are presented as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance was tested with the program GraphPad InStat. The test used, either Mann–Whitney *U*-test or paired *t* test, and the *P*-values are specified in the text or in the figure legends.

Results:

Heterogeneous Distribution of Microglia in the Developing Barrel Cortex

We first examined the distribution of microglia in coronal fixed sections of the developing barrel cortex of CX3CR1^{+eGFP} mice in which only cells of the myeloid lineage, i.e. mostly microglial cells in the healthy brain, are fluorescent (Jung et al., 2000). In marked contrast with the homogenous distribution of microglial cells in the cortex of adult animals, the distribution of GFP positive cells during the first postnatal week appeared highly heterogeneous. High densities of fluorescent cells were found in the vicinity of the pial and ventricular surfaces while microglia distribution remained sparse within the cortical layers until P5 (Fig. 1A). At this stage, there was a gradient of microglia density with more GFP positive cells in the deep than in the superficial layers. In particular, the density of microglial cells in layer 4 at P5 was less than a fourth that observed in adults (Fig. 1C). At P7, microglia distribution looked denser and more homogenous in deep layers whereas the number of cells remained relatively low in superficial layers (Fig. 1A,B). In layer 4, the number of microglia almost tripled as compared with P5 (Fig. 1C) and this increase corresponds to the entry of microglia within

the barrels, which occurs only after P5 (Hoshiko et al., 2012). Thus, microglia density in the barrel cortex gradually increases from deep to more superficial layers during the first postnatal week and the period between P5 and P7 appears crucial in layer 4 with a massive arrival of microglial cells at a time of intense morphological and functional remodeling of the synaptic and neuronal networks (see Introduction section). Strikingly, at these ages microglial cells appeared aligned along vertical tracks spanning several cortical layers. Immunostaining of the blood vessels with antibodies against laminin indicates that a large proportion of microglial cells were in close apposition with vessels (Fig. 1D). This was most evident in superficial layers where the few present microglial cells were often attached to penetrating vessels (Fig. 1D1) but had also processes oriented toward the parenchyma (Fig. 1D2).

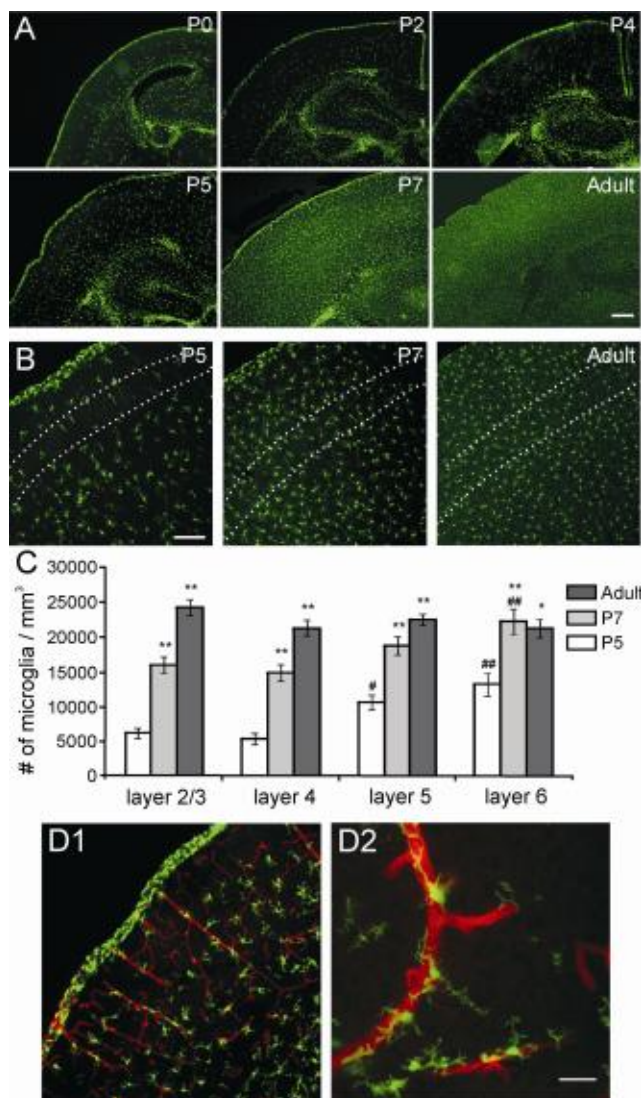


Figure 1. Postnatal development of microglia distribution in the somatosensory cortex.

(A) Epi-fluorescence images of coronal sections from P0, P2, P4, P5, P7, and adult CX3CR1^{+/eGFP} mice.

(B) Confocal images of coronal sections seen at higher magnification from P5, P7, and adult CX3CR1^{+/eGFP} mice. Pial surfaces are in the upper left corner and the dotted lines delineate layer 4.

(C) Density of microglial cells in different cortical layer at P5 (white; $N = 9$ animals), P7 (light gray; $N = 12$ animals) and in adult (dark gray; $N = 4$ animals). Statistical differences between developmental stages (compared with P5) for a given layer * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ and between layers (compared with layer 2/3) at a given developmental stage, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test).

(D) Coronal sections of the somatosensory barrel cortex of P5 CX3CR1^{+/eGFP} mice immuno-stained with an antibody against laminin and showing the close association of microglial cells with blood vessels in the developing barrel cortex.

Scale bar, 300 μm in (A), 150 μm in (B), 100 μm in (D1), and 30 μm in (D2).

Phenotypic Characteristics of Microglia in the Developing Barrel Cortex

We then analyzed whether changes in microglial density during postnatal development of the cortex were accompanied by changes in the phenotype of these cells. From a morphological point of view, there was a reduction of the soma size of microglial cells during postnatal development. The weighted radius of the soma of layer 4 microglia decreased from $6.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ at P5 ($n = 54$ cells, 5 animals) to $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ at P7 ($n = 36$ cells, 3 animals, $P < 0.001$) and further decreased in adult animals ($4.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$; $n = 46$ cells, 3 animals) (Fig. 2A–C). Thick processes characterizing microglial cells between P3 and P5 tended to regress already at P7 while at the same time more thin processes became visible (Fig. 2A,B). Moreover, the total number of primary processes extending from the soma was significantly higher at P7 (5.1 ± 0.3 ; $n = 17$ cells, 3 animals) than at P5 (3.6 ± 0.2 ; $n = 23$ cells, 3 animals; Fig. 2B,D). However, even at P7, the ramification of the processes appeared less important than in adult “surveying” microglia (9.2 ± 0.3 primary processes, $n = 29$ cells, 2 animals; Fig. 2A,B,D).

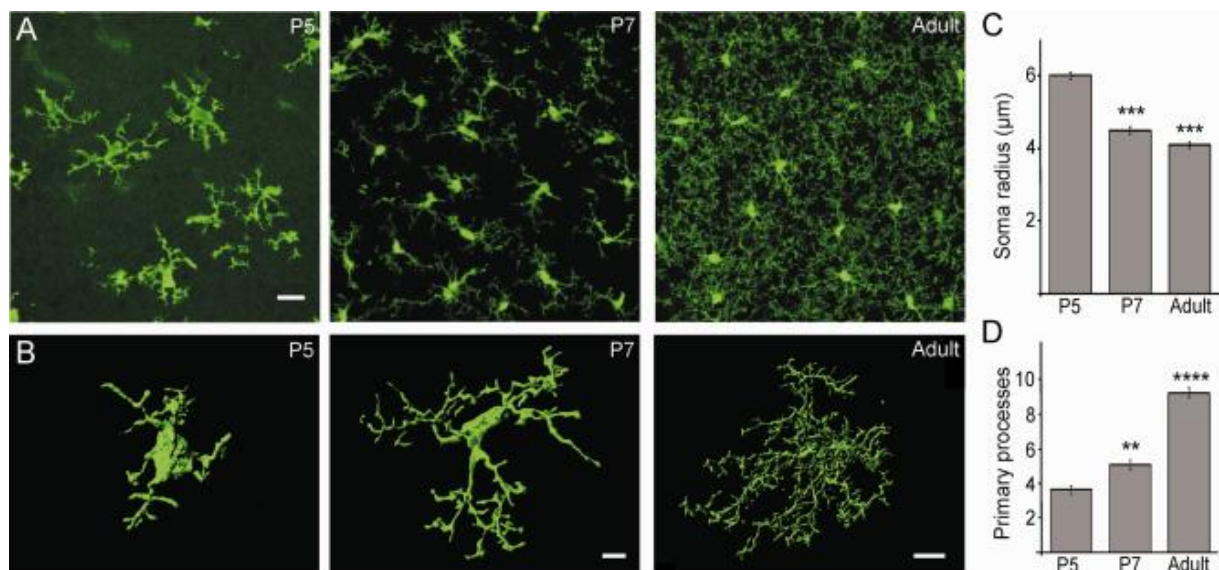


Figure 2. Morphological development of microglial cells in the barrel field.

(A) Confocal images of fluorescent microglial cells in layer 4 of the barrel field in P5, P7, and adult mice. Scale bar, 20 μm .

(B) Three-dimensional image reconstructions of single microglial cells from P5, P7, and adult mice. Scale bars, 5 μm at P5 and P7 and 10 μm for the adult.

(C) Changes in the soma radius of microglial cells of layer 4 during postnatal development measured at P5 ($n = 54$ cells and $N = 5$ animals), P7 ($n = 36$; $N = 3$) and in adult mice ($n = 46$; $N = 3$). *** $P < 0.001$ compared with P5; $P = 0.06$ for the difference between P7 and adult (Mann–Whitney U test).

(D) Changes in the number of primary processes extending from the soma of microglia at P5 ($n = 17$ cells and $N = 3$ animals), P7 ($n = 23$; $N = 3$) and in adult mice ($n = 29$; $N = 2$).
 ** $P = 0.002$, *** $P < 0.001$ compared with P5; $P < 0.001$ for the difference between P7 and adult (Mann–Whitney U test).

We then examined the expression profile of classical microglial markers during the early postnatal development of the barrel field. All GFP positive cells at P5 and P7 were immunostained with antibodies against Iba1 (not shown), CD11b and CD68 (Fig. 3A,B). A faint labeling of microglia with antibodies against the macrophage marker F4/80 was also observed at all developmental stages (not shown). However, none of the developing microglial cells were immunostained with markers of microglia activation such as Mac-2 or MHC-II (Fig. 3D,E). Interestingly, despite the doubling of microglia cell number between P5 and P7, only a low proportion of GFP positive cells were immunopositive for the proliferation marker Ki67 (Fig. 3C). In layer 4, this proportion was $16.21 \pm 8.9\%$ at P5 and $8.4 \pm 3.9\%$ at P7 ($P = 0.7$ Mann–Whitney, $N = 3$ animals for each case), indicating that migration, rather than local proliferation, is largely responsible for the expansion of microglia population in layer 4 between P5 and P7.

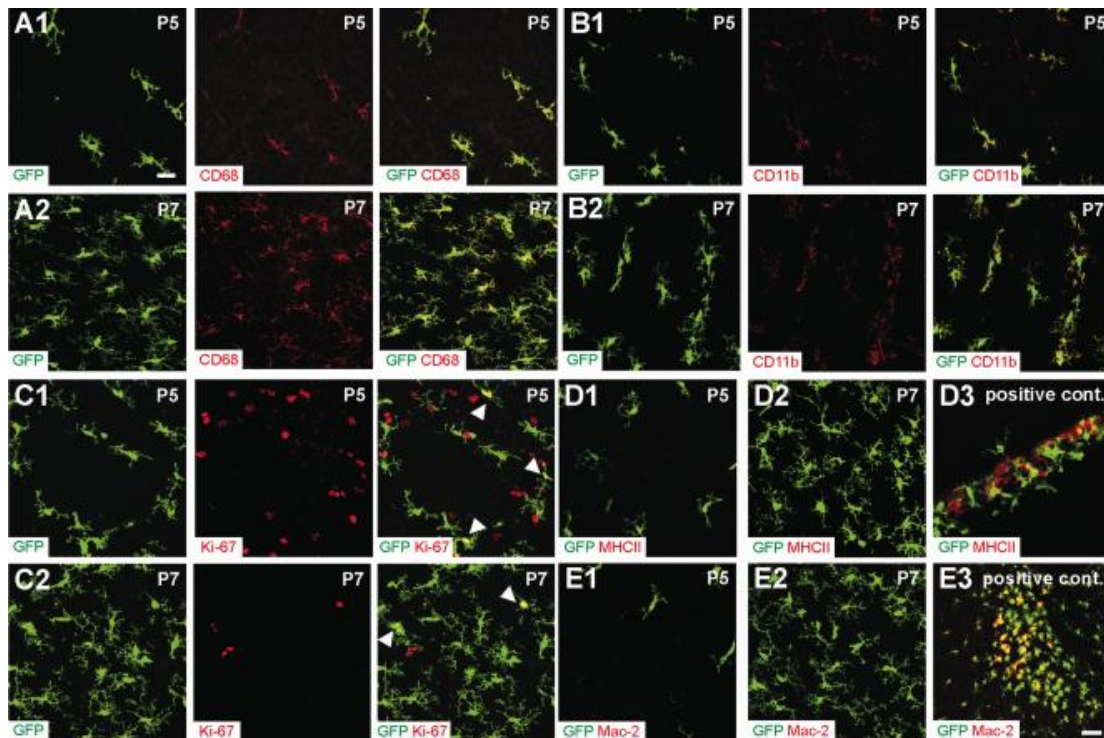


Figure 3. Expression of specific markers by microglial cells in layer 4 of the developing barrel cortex. **(A)** Coronal section of $CX3CR1^{+/eGFP}$ mice showing eGFP positive microglial cells immuno-stained for CD68 at P5 (**A1**) and P7 (**A2**). **(B)** Coronal section of $CX3CR1^{+/eGFP}$ mice showing eGFP positive microglial cells immuno-stained for CD11b at P5 (**B1**) and P7 (**B2**).

(C) Coronal section of a P5 (C1) and P7 (C2) CX3CR1^{+eGFP} mice showing microglial cells and an immuno-staining against Ki-67.

(D) Coronal section of CX3CR1^{+eGFP} mice showing the absence of immuno-reactivity against MHCII in microglial cells of cortical layers at P5 (D1) and P7 (D2). (D3) Positive control for MHCII immuno-staining in the meninges.

(E) Coronal section of a CX3CR1^{+eGFP} mice showing the absence of immuno-reactivity against Mac-2 in microglial cells of cortical layers at P5 (E1) and P7 (E2). (E3) Positive control for Mac-2 immunostaining in a region close to the ventricle.

Scale bars, 25 μ m in all pictures except in E3, 50 μ m.

These observations therefore indicate that microglia morphology rapidly evolves between P5 and P7 without expression of activation markers (Mac-2 and MHC-II).

Transient Expression of Delayed Rectifier Potassium Channels in Microglia of the Developing Barrel Cortex

Microglia functional states have been associated with the expression of a variety of membrane voltage-activated ion channels and particularly potassium channels (Kettenmann et al., 2011). Whole cell recordings were thus obtained from fluorescent microglial cells in layer 4 of the barrel cortex in acute slices of P5 to P9 CX3CR1^{+eGFP} mice and I/V relationships were obtained by applying hyperpolarizing and depolarizing voltage steps. At these postnatal ages, two types of behaviors were observed (Fig. 4A,B). Some cells showed an I/V relationship resembling that of nonactivated microglial cells in adult tissue: a small rectification below -100 mV and an almost linear relation at depolarized potentials. The second type of cells, called rectifying cells thereafter, had an I/V relationship resembling that of activated microglia, with an outward rectification above -30 mV and a linear relation at more hyperpolarized potentials.

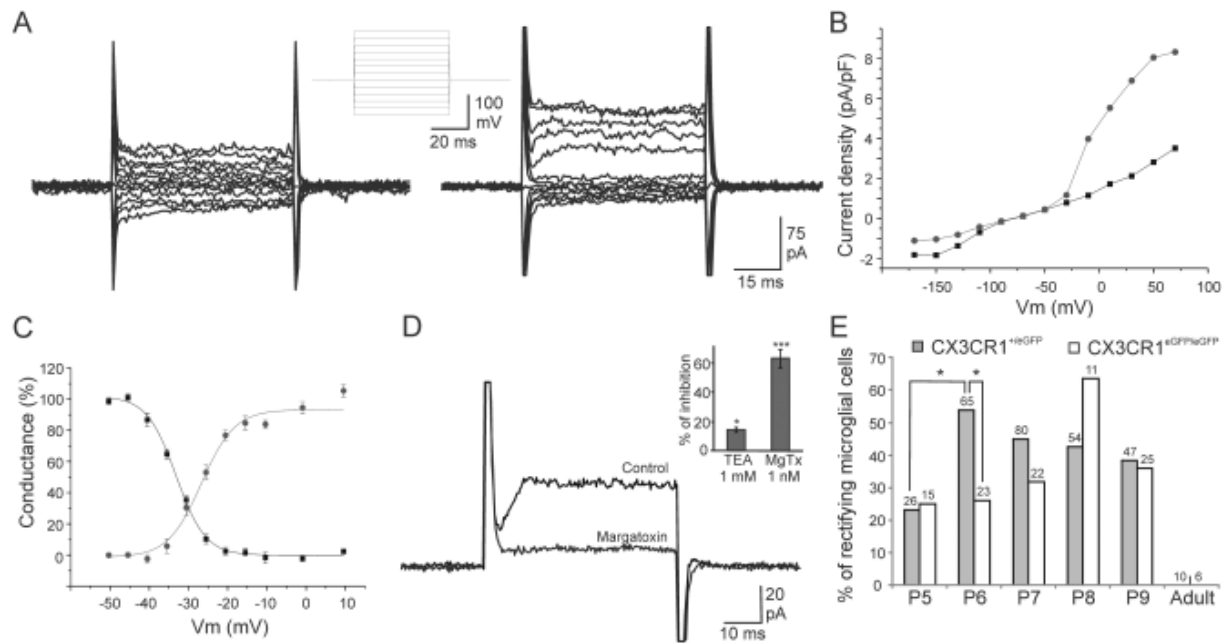


Figure 4. Transient upregulation of voltage activated outward current in layer 4 microglial cells of the developing barrel cortex.

(A) Current traces of two microglial cells in responses to voltage steps shown in inset and illustrating the two types of behaviors observed in layer 4 between P5 and P9. Holding potential of -70 mV.

(B) Current/voltage relationships of the two cells shown in (A). Note the marked rectification due to the activation of outward currents at depolarized potentials in the I/V curve (circles) of the right hand cell in (A).

(C) Mean activation and inactivation curves normalized to maximal conductance obtained from 10 microglial cells expressing voltage-activated outward currents.

(D) Currents induced by a voltage step from -70 to +30 mV before (red trace) and after application of margatoxin (1 nM, black trace). The inset shows the summary of the effects of TEA (1 mM; $n = 10$) and margatoxin (1 nM; $n = 7$) on leak-subtracted outward currents induced using these voltage steps.

* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, respectively (paired t test).

(E) Proportion of microglial cells displaying outward rectifying currents in heterozygous (CX3CR1^{+/eGFP}; gray bars) and knockout (CX3CR1^{eGFP/eGFP}; white bars) mice for the microglial fractalkine receptor CX3CR1. Note that the increase in the proportion of rectifying microglia, which normally occurs after P5 in heterozygous mice is delayed in knockout mice. No rectifying cells were recorded in layer 4 of the barrel cortex of adult mice of either genotype.

The number of recorded microglial cells is displayed above each bar of the histogram.

* $P < 0.05$ (Fisher's exact test).

Several voltage-activated potassium channels can mediate the outward rectification in the I/V curve of activated microglia, including Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv3.1 homomers and Kv1.3/1.5 heteromers (Eder, 2010; Kettenmann et al., 2011). To identify which subunit is responsible of the outward current observed in rectifying microglia during early developmental stages, we first characterized the biophysical properties of this current. The half-maximal activation and steady-state half inactivation potentials were -26.7 ± 1.1 mV (slope factor = 4.2 ± 0.9 mV; $n = 10$ cells) and -33.1 ± 0.4 mV (slope factor = 3.7 ± 0.4 mV; $n = 10$ cells), respectively (Fig. 4C). Similar values have been

observed for the potassium current recorded in hippocampal microglia activated after a status epilepticus and which was mediated by Kv1.3 subunits (Menteyne et al., 2009). The pharmacological profile of the outward current recorded in maturing microglial cells is also in keeping with a predominant contribution of Kv1.3 subunits [see Table 1 and discussion in Menteyne et al. (2009) for a comparison of microglia channel properties]. Indeed, the outward currents induced by voltage steps at + 30 mV were slightly reduced by 1 mM TEA (Fig. 4D; $14.4 \pm 1.7\%$ inhibition; $n = 10$ cells; $P = 0.03$, paired t test) but sensitive to margatoxin (MgTx) in a dose dependent manner. The currents were greatly reduced by MgTx at 1 nM (Fig. 4D; $63.1 \pm 6.37\%$ inhibition; $n = 7$ cells; $P < 0.001$, paired t test) and almost fully inhibited by 10 nM MgTx ($90.6 \pm 13.3\%$ inhibition; $n = 7$ cells; $P < 0.001$, paired t -test). Altogether, these results suggest that delayed rectifying currents observed in a subpopulation of developing microglia are mainly mediated by Kv1.3 homomeric channels.

We also observed that the two types of developing microglial cells differed by their membrane capacitance (C_m): rectifying microglial cells had a significantly higher C_m (14.9 ± 0.45 pF, $n = 109$ cells) than nonrectifying ones (11.9 ± 0.32 pF, $n = 139$ cells; $P < 0.0001$). These C_m values are smaller than those observed for adult microglia (Avignone et al., 2008) and probably reflect the lower membrane surface area of immature microglial cells characterized by fewer and shorter processes than adult microglial cells, suggesting that rectifying microglial cells are morphologically more mature than nonrectifying ones.

We recently published that microglial cells remain outside the clusters of TCA forming the center of the barrels until P5 and start to invade these clusters at P6 (Hoshiko et al., 2012). Interestingly, the number of rectifying microglial cells increased sharply at P6 ($P = 0.01$, Fischer's exact test) and then slightly decreased until P9, whereas in the adult barrel cortex none of the recorded microglial cells expressed this type of currents (Fig. 4E). Microglia invasion of the barrel centers is regulated by the fractalkine/CX3CR1 neuron-to-microglia signaling pathway and is delayed by 2 days in CX3CR1 knockout mice (Hoshiko et al., 2012). We thus tested whether changes in the proportion of rectifying microglial cells follow the same temporal pattern in CX3CR1 hetero- and homozygous mice. The sharp increase in the proportion of rectifying microglial cells at P6 was not observed in CX3CR1

knockout mice (Fig. 4E; $P = 0.02$ between knockout and heterozygous mice at P6; Fischer's exact test) but it was delayed by two days, matching the recruitment of microglial cells in the barrel centers (Hoshiko et al., 2012). These results show that there is a transient increase in the number of microglial cells expressing Kv1.3 channels when these cells colonize the barrel centers, suggesting that this transient change in phenotype could be necessary for microglial cells to migrate or to accomplish specific functions when reaching the site of maturing synapses.

P2Y₆ and P2Y₁₂ but not P2X₇ Purinergic Receptors are Differentially Expressed in Rectifying and Nonrectifying Microglia

Purinergic receptors play fundamental functions in adult microglia but their expression during the development of these cells is not well documented. We therefore characterized responses to purinergic receptor activation in layer 4 microglia of the developing barrel cortex.

Functional expression of P2Y₆ and P2Y₁₂ receptor was tested by studying the responses to bath applications of the selective agonists UDP (1 mM) and 2MeSADP (100 μ M), respectively, in microglia held at a potential of -10 mV and using a K-gluconate-based intracellular solution (see Materials and Methods section and Avignone et al., 2008). With the two agonists, both responsive and nonresponsive microglial cells were observed (Fig. 5A,B). Indeed, UDP and 2MeSADP induced outward currents in only 66% and 54% of the cells, respectively (Fig. 5D). The I/V relationships of the responses induced by UDP and 2MeSADP in developing microglial cells had the characteristics of a potassium conductance activation (Fig. 5C) and were comparable to those observed in adult hippocampus microglia (Avignone et al., 2008). We did not observe significant changes between P5 and P9 in the proportion of responsive cells or in the amplitude of UDP- or 2MeSADP-mediated currents but this may be due to the relative low number of cells tested at each postnatal day. However, the occurrence of P2Y responses was correlated with the expression of the Kv1.3-mediated voltage-dependant potassium current. We observed that 85.7% of the rectifying microglial cells responded to UDP application whereas only 48% of non-rectifying microglial cells developed a UDP response (Fig. 5D; $n = 46$ cells, $P = 0.012$ Fischer's exact test). A similar tendency was observed with responses to

2MeSADP but the difference did not reach statistical significance: 65.8% of rectifying microglial cells and 43.7% of non-rectifying microglial cells responded to MeSADP (Fig. 5D; $n = 86$ cells, $P = 0.052$ Fischer's exact test). These results indicate that the two types of developing microglial cells defined by the functional expression of Kv1.3 subunits also differed by their expression pattern of P2Y receptors.

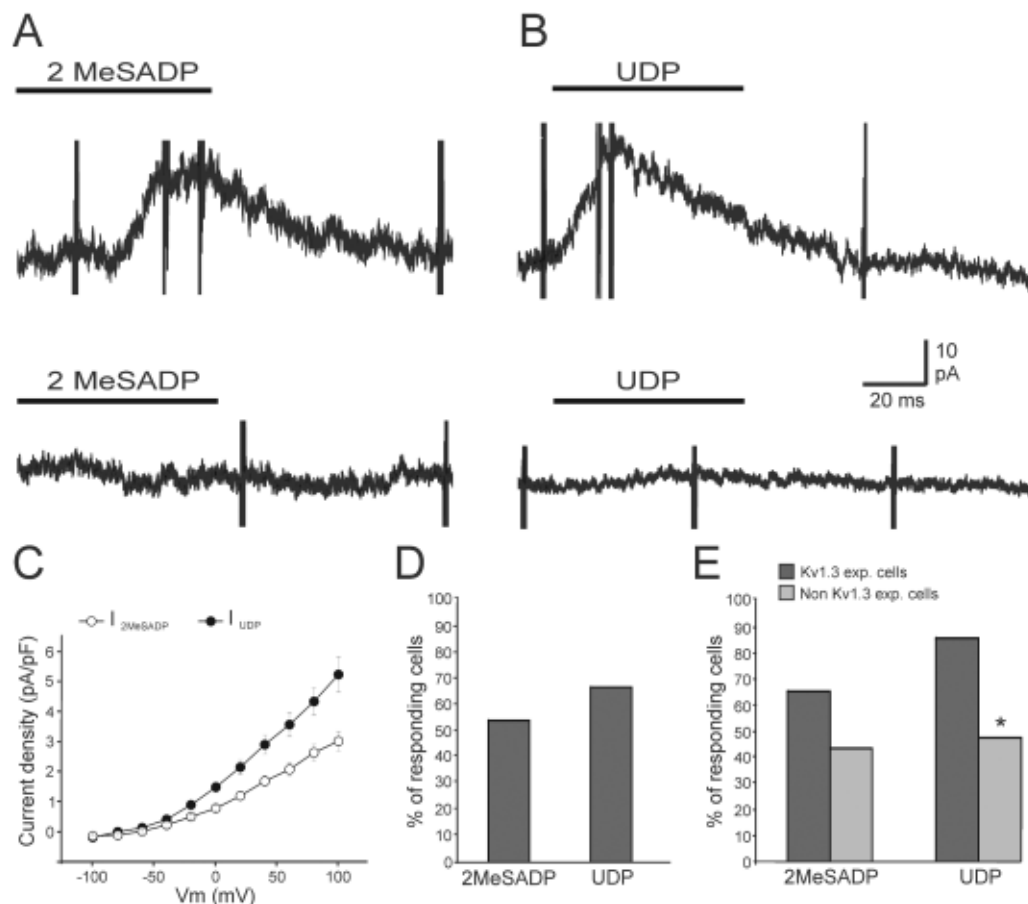


Figure 5. P2Y12 and P2Y6 receptor-mediated responses in developing layer 4 microglia.

(A) The upper trace shows an example of a current response induced by bath application of the P2Y12 receptor agonist 2MeSADP (100 μ M). The lower trace shows the absence of response in another microglial cells.

(B) Same as in (A) for the P2Y6 receptor agonist UDP (1 mM). Cells were patched with K-gluconate based solution and responses were tested at (10 mV. Vertical deflections correspond to current responses to voltage steps used to extract I/V relationships.

(C) Mean I/V curves of the 2MeSADP- and UDP-induced responses in P5-9 mice. The number of responsive cells used for this graph was 33 for 2MeSADP and 24 for UDP.

(D) Percentage of P5-9 microglial cells that responded to the agonists ($n = 86$ for 2MeSADP; $n = 46$ for UDP).

(E) Percentage of microglial cells expressing or not Kv1.3-mediated outward currents that were responsive to 2MeSADP or to UDP. $P = 0.052$ for 2MeSADP and $P = 0.012$ for UDP (Fisher's exact test).

Finally, we tested whether maturing microglial cells expressed functional P2X receptors. Recorded cells were held at -70 mV using a cesium-containing intracellular solution containing to block potassium conductances induced following the activation of P2Y receptors (see earlier). Bath application of ATP (1 mM, 1 min) induced an inward current in all microglial cells of layer 4 tested between P5 and P9. The current density had an average amplitude of 0.24 pA/pF ($n = 10$ cells; Fig. 6A). The I/V curve of these responses presented an inward rectification and a reversal potential near 0 mV characteristic of a nonselective cation-permeable channels (Fig. 6C). We then tested the effect of removing divalent cations from the extracellular solution, a condition known to increase the amplitude of the P2X-mediated currents (Khakh and North, 2012). The ATP-induced currents were amplified by 20-fold by removing of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions (Fig. 6B,C). As previously described for P2X₇ receptors (Rigato et al., 2012), the responses were biphasic: a first level of current amplitude (13.4 ± 3.8 pA, $n = 9$ cells) persisted several seconds before the development of a secondary response of higher amplitude (101.5 ± 25.7 pA, $n = 9$ cells). The antagonist of P2X₇ receptors A740003 (20 μM) inhibited a large part of the ATP currents recorded in divalent-free solutions ($n = 6$ cells, $P = 0.0015$; Fig. 6D). The presence of cesium, a blocker of potassium currents, in the internal solution did not allow us to test for the expression of Kv1.3-mediated potassium currents in the P2X₇ expressing cells. These results indicate that all developing microglial cells expressed P2X receptors, which were predominantly of the P2X₇ receptors.

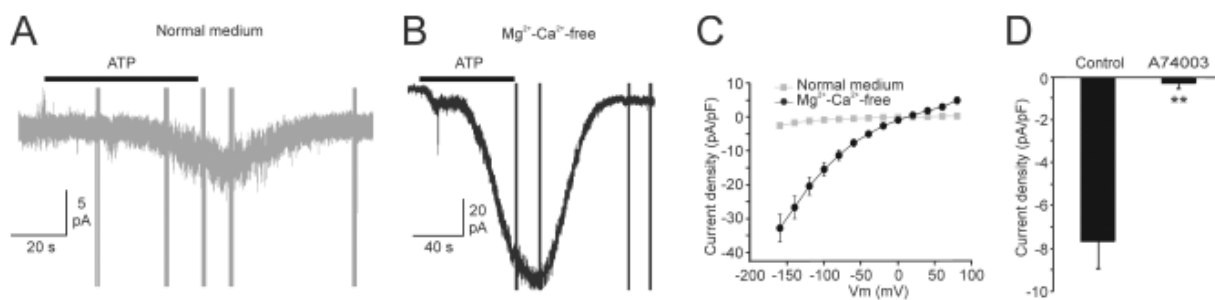


Figure 6. P2X₇ receptor-mediated responses in developing layer 4 microglia.

(A) Example of a current response induced by bath application of ATP (1 mM) for a microglial cell maintained in a standard extracellular solution.

(B) Same as in (A) but in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the extracellular solution. Cells were patched with a Cs-gluconate based intracellular solution and responses were tested at a holding potential of -70 mV.

(C) Mean I/V curves of the ATP-induced responses in the presence ($n = 10$) or in the absence ($n = 9$) of extracellular divalent cations for P5-9 mice.

(D) Effect of the P2X7 receptor antagonist A74003 (20 μ M) on ATP responses induced in the absence of extracellular divalent cations ($n = 6$, $P < 0.01$, paired t test).

Discussion:

Microglia population rapidly expands within cortical layers after P5 and we recently showed that reciprocal interactions between microglia and neurons influence both microglia distribution and synapse functional maturation in layer 4 of the barrel cortex (Hoshiko et al., 2012). The purpose of the present study was therefore to determine whether microglial cells express specific phenotypes during this period of colonization and of interactions with maturing neurons. Our data indicate that during the time course of microglial cell recruitment within the barrels, microglia properties rapidly evolve and are differentially regulated. On the one hand, the immuno-histochemical profile of cortical microglial cells around the end of the first postnatal week remains rather constant. In particular, we did not observe any expression of classical markers of microglia activation, such as Mac-2 and MHCII. In contrast, important changes in microglia morphology (i.e., reduction of the soma size, thinning of the processes, and increased number of processes) occur after P5 but these changes occur in a rather monotone manner and without showing obvious signs of heterogeneity among microglial cells. In marked contrast, analysis of microglia electrophysiological and pharmacological properties reveals heterogeneity in the population of microglial cells at any given postnatal day between P5 and P9.

Up-Regulation of Kv1.3 Subunits

We observed that some microglial cells have almost linear I/V relationships whereas some others showed delayed rectifying potassium currents predominantly determined by the expression of Kv1.3 subunits. Importantly, the proportion of microglial cells expressing these potassium currents increases transiently after P5, when microglial cells start to invade the barrel centers (Hoshiko et al., 2012). Upregulation of Kv1.3 subunits is observed during the activation process of microglial cells under pathological conditions (Farber et al., 2005; Menteyne et al., 2009) and this modulation, at least when induced by exposure to pneumococcal cell walls, is developmentally regulated (Draheim et al., 1999). Kv1.3 subunits contribute to the regulation of microglial cell proliferation (Kotecha et al., 1999; Pannasch et al., 2006) and to their ability to produce superoxide and free radicals to kill neurons (Fordyce et al., 2005). Although we observed some Ki67 positive microglial cells within cortical

layers, their proportion tends to decrease between P5 and P7 while the number of microglial cells expressing Kv1.3 doubles over the same time interval, making it very unlikely that Kv1.3 expression is related to the proliferation of microglial cells at this stage of development. Alternatively, the increased number of microglial cells expressing Kv1.3 could be linked to developmental neuronal death, which peaks around P5 in the rodent cortex (Ferrer et al., 1990; Spreafico et al., 1995; Verney et al., 2000). Yet, the number of TUNEL positive cortical cells in the barrel cortex decreases rapidly after P5 (i.e., between P5 and P8) (Verney et al., 2000) while, again, the number of Kv1.3-expressing microglial cells doubles. These observations therefore suggest that the transient expression of Kv1.3 during the normal development of microglial cells serves other functions than those reported in pathological conditions (i.e., proliferation and production of toxic oxygen species). Interestingly, an upregulation of Kv1.3-mediated currents with no change in inwardly rectifying potassium currents has been also observed in cultured microglia treated with anti-inflammatory cytokine transforming growth factor beta, indicating that Kv1.3 expression could also be induced during a deactivation process of microglia (Schilling et al., 2000). One appealing hypothesis to explain the upregulation of Kv1.3 in microglia during cortical development would be that this potassium channel subunit is related to the integrin-mediated adhesion and migration of microglia within the barrels, as this is the case for cultured microglial cells (Nutile-McMenemy et al., 2007) and T cells (Levite et al., 2000). The observation that CX3CR1 deficiency impairs both microglia recruitment within the barrel centers (Hoshiko et al., 2012) and the upregulation of Kv1.3 further links the expression of this potassium channel and microglia migration. Yet, whether the transient expression of Kv1.3 is indeed necessary for the recruitment of microglial cells within the barrel centers or for their action on maturing synapses remains to be tested specifically.

Maturation of Microglia Purinergic Signaling

Interestingly, the transient expression of Kv1.3 is correlated with the expression of specific purinergic receptors. Whereas all developing microglial cells expressed functional P2X₇ receptors, only a proportion of them expressed functional P2Y₆ and P2Y₁₂ receptors and this proportion is significantly higher, at least for P2Y₆, in microglial cells expressing Kv1.3-mediated currents. P2Y₆ and P2Y₁₂ are involved in microglia phagocytosis and chemotaxis, respectively (Haynes et al., 2006; Koizumi et

al., 2007). The upregulation of these receptors in microglial cells expressing Kv1.3 could thus be directly linked to the recruitment and role of these cells within the synaptic sites constituting the barrel centers (Hoshiko et al., 2012). Indeed, P2Y₁₂ receptors could contribute to the chemo-attraction of microglial cells toward maturing synapses in the barrel centers whereas P2Y₆ receptor-dependent phagocytosis could be involved in various aspects of morphological maturation of the barrels, such as the rearrangement of dendrites of layer 4 neurons (Erzurumlu and Gaspar, 2012; Wu et al., 2011) or the removal of subplate neurites (Hoerder-Suabedissen et al., 2012), which occur at this stage of development. Alternatively, the induction of P2Y₆ and P2Y₁₂ receptor expression at this early postnatal stage may not be linked to a specific function of these receptors during normal development but could simply represent a normal step in microglia development (like the thinning of the process for instance) toward the acquisition of their mature phenotype of surveying cells (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Indeed, unlike Kv1.3, which is down-regulated later on during development, P2Y₆ and P2Y₁₂ receptors remain constitutively expressed in adult microglia under physiological conditions (Kettenmann et al., 2011). Our results on P2Y₁₂ receptors also show that many of the microglial cells within layer 4 do not express these receptors before P7. This suggests that microglia migration to layer 4 occurs independently of P2Y₁₂ receptors and relies on other signaling pathways, among which those allowing interactions between microglial cells and blood vessels (see Fig. 2 and Monier et al., 2006) clearly deserve further investigations. Finally, it is somehow surprising that the regulation of P2X₇ receptor expression differs from that of P2Y receptors, with all microglial cells between P5 and P9 expressed functional P2X₇-receptors. In pathological conditions, P2X₇ receptors are involved in microglia activation and in various effector functions of these cells, such as the release of cytokines (Kettenmann et al., 2011). Yet, P2X₇ receptors also control microglia proliferation (Monif et al., 2009; Zou et al., 2012) and recent evidence indicates that this is also the case during early stages of normal SNC development (Rigato et al., 2012). The induction of P2X₇ receptor expression seems therefore to be an early event of microglia maturation, which contributes to the expansion of microglia population in physiological conditions.

Multiple Microglia Phenotypes During Normal CNS Development

All together, our results indicate that after P5 most of microglial cells colonizing the barrels acquire a specific phenotype, which differs from that of adult surveying or of activated microglia but also from that of layer 4 microglial cells until P5. Indeed, after P5, Kv1.3 expression in microglia is not associated with other classical markers of activation and occurs when microglial cells acquire a ramified morphology. These observations indicate that Kv1.3 should not be considered as a landmark of microglia activation and also support the view that different functional properties of microglial cells usually associated with microglia activation can be independently regulated in physiological conditions. Another example of such independent regulation has been observed in the adult hippocampal dentate gyrus where microglial cells phagocyte neuroprogenitors without showing any other sign of activation (Sierra et al., 2010). Our results though do not exclude the possibility that phenotypes closer to pathologically activated states may be acquired by microglia during normal CNS development. For instance, nearly half of the microglial cells express Mac-2 at the onset of developmental motoneuron death in lateral motor columns of the embryonic spinal cord (Rigato et al., 2011). Moreover, minocycline, an inhibitor of microglia activation, impairs the pruning of synapses by microglia, which normally occurs in the early postnatal visual thalamus, suggesting that pruning microglial cells are in a functional state resembling that of pathological activation (Schafer et al., 2012). Yet, it is worth mentioning that minocycline also inhibits the expression of Kv1.3 (Nutile-McMenemy et al., 2007) and it would be interesting to test whether this potassium channel subunit is also expressed by pruning microglia in the developing thalamus.

Finally, our data indicate that specific maturation steps of neuronal and synaptic networks influence the distribution (Hoshiko et al., 2012) and functional properties (present study) of microglia colonizing barrels of the somatosensory cortex. The specific anatomical organization and precise developmental pattern of the barrel field have clearly helped us to relate microglia development with that of thalamo-cortical synapses. Yet, similar neuron-to-microglia interactions, based on fractalkine/CX3CR1 signaling or on other pathways, could also influence microglia phenotype of other brain areas and hence determine their role on synapse maturation. Another favorable case where this hypothesis could be further tested is the olfactory bulb in which specific synapses are spatially confined in glomeruli.

Remarkably, the initial distribution of microglia during development around these glomeruli resembles that microglia around cortical barrels at P5 (Fiske et al., 2000). However, microglial cells are extremely sensitive to their environment and their functional properties are under the control of many signaling pathways (Biber et al., 2007). Hence, the same neuronal signal may not have the same influence on microglia phenotype during the functional maturation of the barrels in the somatosensory cortex and during that of the columns of ocular dominance in the visual cortex, which occur at different postnatal ages (i.e., by the end of the first and of the third postnatal weeks, respectively). These differences during postnatal development probably control the influence of microglia on the neighboring cells but may also explain heterogeneities of microglia during development and also in the adult brain (de Haas et al., 2008; Scheffel et al., 2012).

Acknowledgements:

The authors thank Nicole Ropert and Alexis Evrard for advices and helpful discussions throughout this study, Serge Charpak and Céline Bidoret for critical reading of an earlier version of the manuscript, Patricia Gaspar for advices on initial experiments, Jérôme Lecoq for computer programs and Françoise Levavasseur for her help with some experiments and with the breeding of mouse colonies. Confocal pictures were acquired at the microscopy platform of the Saints Pères University Center. The 3D image reconstructions were done in the Bordeaux Imaging Center of the University of Bordeaux Segalen and the help of Sébastien Marais is acknowledged. The Audinat lab is affiliated to Paris School of Neuroscience (ENP).

References:

- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* **117**:145–152.
- Ashwell K. 1989. Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol* **287**:286–301.
- Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, Rassendren F, Audinat E. 2008. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J Neurosci* **28**:9133–9144.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. 2007. Neuronal ‘On’ and ‘Off’ signals control microglia. *Trends Neurosci* **30**:596–602.
- Caldero J, Brunet N, Ciutat D, Hereu M, Esquerda JE. 2009. Development of microglia in the chick embryo spinal cord: Implications in the regulation of motoneuronal survival and death. *J Neurosci Res* **87**:2447–2466.

- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP. 1996. Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* **367**:36–53.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: New concepts. *Brain Res Rev* **53**:344–354.
- Cuadros MA, Navascues J. 2001. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res* **132**:51–59.
- Cuadros MA, Rodriguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL, Navascues J. 1997. Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* **389**:390–401.
- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* **8**:458–474.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**:752–758.
- Daw MI, Scott HL, Isaac JT. 2007. Developmental synaptic plasticity at the thalamocortical input to barrel cortex: Mechanisms and roles. *Mol Cell Neurosci* **34**:493–502.
- de Haas AH, Boddeke HW, Biber K. 2008. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* **56**:888–894.
- Draheim HJ, Prinz M, Weber JR, Weiser T, Kettenmann H, Hanisch UK. 1999. Induction of potassium channels in mouse brain microglia: Cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* **89**:1379–1390.
- Eder C. 2010. Ion channels in monocytes and microglia/brain macrophages: Promising therapeutic targets for neurological diseases. *J Neuroimmunol* **224**:51–55.
- Erzurumlu RS, Gaspar P. 2012. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci* **35**:1540–1553.
- Erzurumlu RS, Jhaveri S. 1990. Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery onto the developing rat somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **56**:229–234.
- Farber K, Kettenmann H. 2005. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* **48**:133–143.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, 1990. del RT, Fonseca M. *Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. Neuroscience* **39**:451–458.
- Fiske BK, Brunjes PC. 2000. Microglial activation in the developing rat olfactory bulb. *Neuroscience* **96**:807–815.
- Fordyce CB, Jagasia R, Zhu X, Schlichter LC. 2005. Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J Neurosci* **25**:7139–7149.
- Frade JM, Barde YA. 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* **20**:35–41.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**:841–845.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**:1387–1394.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* **9**:1512–1519.

Herbomel P, Thisse B, Thisse C. 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* **238**:274–288.

Hoerder-Suabedissen A, Molnar Z. 2012. Morphology of mouse subplate cells with identified projection targets changes with age. *J Comp Neurol* **520**:174–185.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. 2006. A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1376–1385.

Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E. 2012. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* **32**:15106–15111.

Inan M, Crair MC. 2007. Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *Neuroscientist* **13**:49–61.

Inan M, Lu HC, Albright MJ, She WC, Crair MC. 2006. Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. *J Neurosci* **26**:4338–4349.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* **20**:4106–4114.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* **91**:461–553.

Khakh BS, North RA. 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* **76**:51–69.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K. 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**:1091–1095.

Kotecha SA, Schlichter LC. 1999. A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J Neurosci* **19**:10680–10693.

Levite M, Cahalon L, Peretz A, HersHKoviz R, Sobko A, Ariel A, Desai R, Attali B, Lider O. 2000. Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: Physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J Exp Med* **191**:1167–1176.

Li H, Crair MC. 2011. How do barrels form in somatosensory cortex? *Ann N Y Acad Sci* **1225**:119–129.

Ling EA, Ng YK, Wu CH, Kaur C. 2001. Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res* **132**:61–79.

Lopez-Bendito G, Molnar Z. 2003. Thalamocortical development: How are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* **4**:276–289.

Male D, Rezaie P. 2001. Colonisation of the human central nervous system by microglia: The roles of chemokines and vascular adhesion molecules. *Prog Brain Res* **132**:81–93.

Mallat M, Marin-Teva JL, Cheret C. 2005. Phagocytosis in the developing CNS: More than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* **15**:101–107.

Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van RN, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* **41**:535–547.

Menteyne A, Levavasseur F, Audinat E, Avignone E. 2009. Predominant functional expression of Kv1.3 by activated microglia of the hippocampus after Status epilepticus. *PLoS ONE* **4**:e6770.

- Monier A, dle-Biasette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2007. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**:372–382.
- Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2006. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol* **499**:565–582.
- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. 2009. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci* **29**:3781–3791.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**:1314–1318.
- Nutile-McMenemy N, Elfenbein A, Deleo JA. 2007. Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *J Neurochem* **103**:2035–2046.
- Pannasch U, Farber K, Nolte C, Blonski M, Yan CS, Messing A, Kettenmann H. 2006. The potassium channels Kv1.5 and Kv1.3 modulate distinct functions of microglia. *Mol Cell Neurosci* **33**:401–411.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**:1456–1458.
- Petersen CC. 2007. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* **56**:339–355.
- Pont-Lezica L, Bechade C, Belarief-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. 2011. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* **119**:901–908.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* **27**:119–145.
- Rezaie P, Patel K, Male DK. 1999. Microglia in the human fetal spinal cord—Patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res* **115**:71–81.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P. 2011. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* **59**:675–695.
- Rigato C, Swinnen N, Buckinx R, Couillin I, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P, Le CH. 2012. Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci* **32**:11559–11573.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **74**:691–705.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. 2013. The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* **61**:24–36.
- Scheffel J, Regen T, Van RD, Seifert S, Ribes S, Nau R, Parsa R, Harris RA, Boddeke HW, Chuang HN, Pukrop T, Wessels JT, Jurgens T, Merkler D, Bruck W, Schnaars M, Simons M, Kettenmann H, Hanisch UK. 2012. Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia* **60**:1930–1943.
- Schilling T, Quandt FN, Cherny VV, Zhou W, Heinemann U, DeCoursey TE, Eder C. 2000. Upregulation of Kv1.3 K(+) channels in microglia deactivated by TGF-beta. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**:C1123–C1134.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. 2011. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* **21**:5–10.
- Schulz C, Gomez PE, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**:86–90.

- Sedel F, Bechade C, Vyas S, Triller A. 2004. Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* **24**:2236–2246.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* **7**:483–495.
- Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De BS. 1995. In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J Comp Neurol* **363**:281–295.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**:1164–1178.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* **8**:e1000527.
- Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS, Caviness VS Jr. 2000. Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev Neurosci* **22**:125–138.
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* **28**:8138–8143.
- White EL, Weinfeld L, Lev DL. 1997. A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse SmI cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosens Mot Res* **14**:34–55.
- Wu CS, Ballester Rosado CJ, Lu HC. 2011. What can we get from ‘barrels’: The rodent barrel cortex as a model for studying the establishment of neural circuits. *Eur J Neurosci* **34**:1663–1676.
- Zou J, Vetreano RP, Crews FT. 2012. ATP-P2X7 receptor signaling controls basal and TNFalpha-stimulated glial cell proliferation. *Glia* **60**:661–673.

III. Troisième publication: “Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex”

Isabelle Arnoux, Maki Hoshiko, Alvaro Sanz Diez & Etienne Audinat

Glia 2014;62:399–410

1. Présentation de l'article

Lors de notre étude précédente, nous avons démontré que les cellules microgliales dans le cortex somatosensoriel en développement acquièrent un phénotype particulier qui diffère de ceux exprimés par la microglie adulte en conditions physiologiques et pathologiques (Arnoux et al, 2013). En effet, au moment où ces cellules sont recrutées au voisinage des synapses thalamocorticales en maturation (Hoshiko et al., 2012), elles acquièrent une morphologie de plus en plus ramifiée, ce qui est plutôt le signe d'une dé-activation, alors qu'en parallèle l'expression de la sous-unité des canaux potassiques voltage-dépendant Kv1.3 est augmentée, ce qui est généralement pris comme un signe d'activation. Dans ces conditions, nous avons voulu tester les effets de la minocycline, une tétracycline connue pour inhiber l'activation microgliale et l'expression de Kv1.3.

Dans cette troisième étude, nous avons analysé les effets induits par un traitement *in vivo* de la minocycline sur les propriétés microgliales à la fin de la première semaine post-natale quand ces cellules modulent le développement synaptique dans le cortex somatosensoriel. Nous montrons que la minocycline administrée de P6 à P8 perturbe la distribution des cellules microgliales et induit leur activation. De plus, la minocycline induit une importante mort cellulaire dans les couches corticales. La comparaison du décours temporel de ces différents effets indique que la mort cellulaire précède les modifications du phénotype microglial. Ces effets sur les propriétés microgliales et la survie cellulaire ne sont pas observés lorsque la minocycline est administrée après la fin de la première semaine post-natale (P8-P10). Par conséquent, la minocycline exerce des effets néfastes au cours d'une période critique du développement cortical. Ces résultats indiquent que la présence de minocycline n'empêche pas toujours l'activation de la microglie et soulignent les effets néfastes de ce genre de composé au cours du développement du SNC.

2. Article

Abstract:

Minocycline, a tetracycline derivative, is known to exert neuroprotective effects unrelated to its anti-microbial action. In particular, minocycline prevents microglia activation in pathological conditions and consequently reduces the production of pro-inflammatory factors contributing to the propagation of diseases. Accumulative evidence indicates that microglial cells contribute to the maturation of neuronal and synaptic networks during the normal development of the central nervous system (CNS) and perinatal inflammation is a known risk factor for brain lesions. Although minocycline has been used to infer microglia functions during development, mechanisms by which this tetracycline derivative affect the immature CNS have not been analyzed in detail. In this study, we demonstrate that minocycline administration during the first post-natal week of development has paradoxical effects on microglia phenotype and on neuronal survival in the mouse somatosensory cortex. Using a combination of immunohistochemistry and electrophysiology, we show that intra-peritoneal injections of minocycline between postnatal days 6 and 8 affect distribution, morphology and functional properties of microglia cells of the whisker-related barrel cortex, leading to the development of a phenotype resembling that of microglia activated in pathological conditions. Minocycline also induced a massive cell death which developed faster than changes in microglia phenotype, suggesting that the latter is a consequence of the former. Finally, cell death and microglia activation were not observed when minocycline treatment was postponed by only two days (*i.e.* between postnatal days 8 and 10). These observations call into question the use of tetracycline derivatives during CNS development to study microglia or to reduce perinatal inflammation.

Introduction:

Minocycline is a tetracycline possessing anti-inflammatory properties independent of its antimicrobial action (Stirling et al., 2005). Adult animal models indicate that minocycline is beneficial and protective in several pathological conditions (Chen et al., 2000; Choi et al., 2007; Du et al., 2001; Nikodemova et al., 2010; Yrjanheikki et al., 1998) partly by inhibiting activation of microglial cells

(MGs), the resident macrophages of the central nervous system (CNS). MGs play critical roles in brain pathologies (Dheen et al., 2007) and their activation in pathological conditions often leads to exacerbation and facilitation of disease progression, although beneficial effects have been also reported (Hanisch et al., 2007; Kerschensteiner et al., 2003; Kreutzberg, 1996; Napoli et al., 2009b; Ransohoff et al., 2009). The complex process of MG activation includes changes in morphology, functional properties, proliferation, migration to lesion sites, increase in phagocytic activity and release of inflammatory mediators (Hanisch et al., 2007; Kreutzberg, 1996; Napoli et al., 2009a; Ransohoff et al., 2009). Minocycline inhibits MG activation by reducing motility, cytokine responses and markers expression (Ledeboer et al., 2005; Natile-McMenemy et al., 2007; Tikka et al., 2001) and attenuates cell death induced by pathological conditions (Ryu et al., 2004). However, mechanism of action and functional outcomes of minocycline are still ill-defined.

Minocycline has no obvious effects on the adult brain in physiological conditions and has been recently used to analyze the role of MGs during the normal development of the CNS (Cunningham et al., 2013; Lenz et al., 2013; Schafer et al., 2012; Ueno et al., 2013). MGs play an active role in normal brain development through different mechanisms (Mallat et al., 2005; Pont-Lezica et al., 2011; Schafer et al., 2013). In particular, they regulate the developmental cell death (Frade et al., 1998; Marin-Teva et al., 2004; Wakselman et al., 2008) and control synapse density (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). Previously, we showed that MG influence synapse maturation at a specific stage of cortical development. In the primary somatosensory cortex (S1) between postnatal day (P) 6 and P9, a neuron microglia signaling (fractalkine/CX3CR1 signaling) allows MG to reach their synaptic targets on time and to influence their functional maturation (Hoshiko et al., 2012). This action of MG occurs concomitantly with the acquisition of a specific phenotype which differs from those expressed by adult MGs in physiological or in pathological conditions (Arnoux et al., 2013).

Because MGs influence the normal development of neuronal networks (see above), pathological conditions leading to modifications of their phenotype during this critical period most likely impact the maturation of the CNS. For instance, MGs activation has been proposed as a mechanism linking *in utero* viral exposure with increased risk of schizophrenia (Blank et al., 2013) and the implication of MGs has been also postulated in other developmental associated psychiatric disorders (Pont-Lezica et

al., 2011). It is thus of importance to understand better the effects of inhibitors of MG activation, in particular at stages where MGs influence neuronal development.

Here, we investigated whether minocycline affects MG properties by the end of the first postnatal week when these cells influence the development of synapses in the somatosensory cortex (Hoshiko et al., 2012). We show that minocycline treatment between P6 and P8 affects MG distribution and phenotype and induces an important cellular apoptosis. These effects in the somatosensory cortex are not observed when minocycline is given after the end of the first postnatal week (P8-P10). Thus, minocycline has paradoxical effects during a critical period of the cortical development.

Material and Methods:

Animals.

All experiments followed European Union and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. The heterozygous CX3CR1^{+eGFP} and wild type mice used in this study were obtained by crossing CX3CR1^{+eGFP} (Jung et al., 2000).

Injection.

Intra-peritoneal injections of 30 mg/kg minocycline hydrochloride (Sigma) were performed at 12h intervals from P6 to P8 or from P8 to P10. The same volume of vehicle was injected to littermate pups for control. Animals were sacrificed after 24 or 48h of injections. The amount of injected minocycline and the treatment duration were determined according to previous studies which have used minocycline to study MGs during post-natal development (Schafer et al., 2012; Ueno et al., 2013).

Immunohistochemistry.

Mice were sacrificed and brains were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Brains were post-fixed overnight before preparing coronal 50 µm thick sections with a VT 1000 Leica vibratome. Coronal sections were collected in phosphate buffered saline (PBS). Floating sections were incubated for 1h with PBS containing 4% natural goat serum (Invitrogen) and 1% Triton X-100 (Sigma- Aldrich) at room temperature. Slices were then incubated 48h at 4°C with primary

antibodies against the proliferation marker Ki67 (1:200; rabbit polyclonal; Abcam), the apoptotic marker cleaved caspase-3 (1:500; rabbit polyclonal; Cell signaling), microglia markers Iba1 (1:1000; rabbit polyclonal; Wako), Mac-2 (1:1000; rat monoclonal; kindly provided by M. Benhamou; Inserm U699, Paris, France; obtained from hybridomas (TIB-166) distributed by ATCC), CD11b (1:1000; rat monoclonal; Serotec), CD68 (1:1000; rat monoclonal; Serotec). Thalamic fibers were labeled with antibodies against VGluT 2 (1:1000; guinea pig polyclonal; Chemicon International). Slices were then incubated 2 hours at room temperature with secondary antibody Alexa 488 (anti-rabbit IgG 1:200; Invitrogen), Alexa 546 (anti-rabbit IgG 1:300; Invitrogen), Alexa 546 (anti-rat IgG 1:300; Invitrogen), or Alexa 633 (anti-guinea pig IgG 1:200; Invitrogen). Primary and secondary antibodies were diluted in PBS containing 2% natural goat serum and 0.2% Triton X-100. After staining, brain slices were mounted with Vectashield H1400 with DAPI (Vector lab). Mounted slices were observed with a confocal laser-scanning microscope (Zeiss 510) equipped with 10X, 20X and 40X objectives (N.A. 0.3, 0.5, 1.3, respectively).

Quantitative analysis.

Stacks of confocal optical sections, usually spanning a total thickness of 15 to 35 μm , were imported in ImageJ and further processed for quantitative analysis. We used a homemade program (written in Matlab by Dr. J. Lecoq) to count the number of microglia in each layer of the barrel cortex as previously described in Arnoux et al (2013). The limits of each layer were determined with the help of the VGluT2 and DAPI stainings. The same program was used to measure the weighted radius of microglial cells which was determined after morphing the profile of each microglial cell into a circle. The cleaved caspase-3 positive cell density was obtained by counting manually the number of positive cells divided by the appropriated volume determined with ImageJ. For the quantification of Ki-67 and Mac-2 positive microglia, we counted manually the number of microglia and the number of Ki-67 or Mac-2 positive microglia in each optical slice of confocal stacks.

Electrophysiology.

Coronal slices were prepared from P8 CX3CR1^{+eGFP} mice and MG were patched in whole-cell configuration in the layer V of S1 as previously described (Arnoux et al., 2013). Briefly, brain were dissected and 300 μ m thick slices were cut with a vibratome (Leica VT 1000S) in an ice-cold solution containing (in mM) : 215 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 20 glucose, 5 pyruvate, 1 CaCl₂ and 7 MgCl₂, bubbled with carbogene (95% O₂, 5% CO₂), pH 7.4 osmolarity ~310 mOsm. The slices were then incubated for 30-45 min at 33°C, and subsequently maintained at room temperature (22-24°C), in a solution containing 126 mM NaCl instead of sucrose and 1 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂. Finally, individual slices were transferred to a recording chamber perfused with the same solution at 4 mL/min and at room temperature. The recording chamber was attached to the stage of an upright Olympus microscope (BX50WI) with a 40x water-immersion objective, equipped with cell-R imaging station including MT20 illumination system (Olympus) and a CCD camera (Hamamatsu ORCA2-AG). Visually identified GFP-microglia were patched in whole-cell configuration in the layer V of the barrel cortex. Micropipettes (6-8 MP) were filled with a solution containing the following composition (in mM): 132 K-gluconate, 11 HEPES, 0.1 EGTA and 4 MgCl₂ (pH 7.35 adjusted with KOH, osmolarity 300 mOsm). Voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 200B (Molecular Devices). Currents were filtered at 5 kHz, collected using Pclamp 9 (Molecular Devices) at a 10 kHz frequency and analyzed off-line using Clampfit (Molecular Devices). Voltage steps (from -170 to +70 mV for 50 ms) from a holding potential of -70 mV were used to determine I/V relationship of recorded cell. Membrane input resistance and capacitance of the cells were determined from the current responses to voltage pulses ranging from -20 to +20 mV. The % of outwardly and inwardly rectifying microglia were determined by measuring the ratio between the slopes of the linear part of the I/V curve and of the beginning of the rectification, i.e. -50/-30 mV and -130/-110 mV for outward and inward rectification, respectively. The distribution of these ratios was used to determine a criterion aiming at selecting rectifying and non-rectifying cells. The ratio was equal to 2 and to 1.4 for outward and inward rectifications, respectively. All potential were corrected for a junction potential of -10 mV.

Statistics.

Values are presented as mean $\pm$ s.e.m. Statistical significance was tested by using Mann-Whitney U-test, unpaired-t test or Fisher's exact test (GraphPad Instat).

Results:

Minocycline disrupts microglia distribution in the developing somatosensory cortex

We first examined MG distribution in the barrel field of S1 of P8 mice after 48h of minocycline treatment (see Material and Methods). MGs were identified according to the expression of GFP in CX3CR1^{+eGFP} mice (Jung et al., 2000) or by immunolabelling of the microglial marker Iba1 (Imai et al., 1996) in wild type mice. The distribution of MG in vehicle-injected (VEH) animals was homogenous across all cortical layers (Fig. 1A and 1B) whereas their distribution was strongly heterogeneous in minocycline-injected (MIN) animals. Minocycline induced a deficit of MGs in layer IV whereas an excess of MGs was observed in layer V (Fig. 1A and 1B), disrupting the normal pattern of colonization of cortical layers by MGs.

Minocycline modifies the phenotype of microglia in layer V of the somatosensory cortex

We then asked whether the accumulation of MGs in layer V of S1 is associated with a change in their phenotype. Qualitative inspections of their morphology in layer V of S1 showed that MGs from P8 MIN animals exhibited thicker and shorter processes and a larger soma than MGs from VEH mice (Fig. 1C). The soma radius of MGs from MIN animals was significantly larger than that of MGs from VEH animals at P8 (Fig 1D).

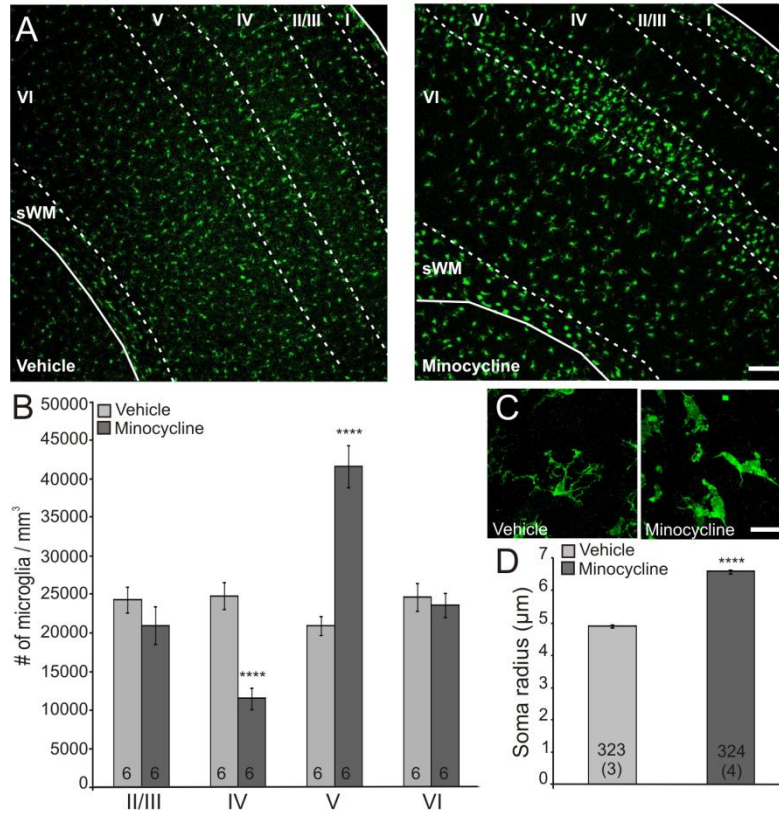


Figure 1: Microglia distribution and morphology in the barrel cortex of P8 mice injected with vehicle or minocycline from P6 to P8.

(A) Stacks of confocal optical slices showing coronal sections from vehicle- (left) and minocycline-injected CX3CR1^{+/eGFP} mice (right). Pial surfaces are in the upper right corner and cortical layers are delineated by dashed lines. sWM: subcortical white matter

(B) Density of microglial cells in different cortical layer in vehicle- (light grey; N=6 animals) and minocycline-treated mice (dark grey; N=6 animals) from P6 to P8. Statistical differences between different conditions for a given layer *** p < 0.001 and **** p < 0.0001 (Mann Whitney U-test).

(C) Stacks of confocal optical slices showing fluorescent microglial cells at higher magnification in layer V of the barrel cortex in P8 vehicle- (left) and minocyclinetreated mice (right). Total thickness of the stacks is 23 μm.

(D) Changes in the soma radius of microglial cells of layer V between vehicle- (light grey; n=324 cells from 4 animals) and minocycline-treated mice (dark grey; n=323 cells from 3 animals) from P6 to P8. **** p < 0.0001 (unpaired t test with Welch correction).

Scale bars, 100 μm in A and 20 μm in C.

To characterize further the microglial phenotype in layer V, we analyzed the expression of MG classical markers. At P8, all MGs expressed CD68 (Fig. 2A) and CD11b (Fig. 2B) and for all tested MIN animals (N=3) the immunostaining against both markers appeared stronger than in VEH animals (N=4). This possible up-regulation of CD68 and CD11b suggests a MG activation (Lund et al., 2006; Roy et al., 2008). We thus assessed the expression of Mac-2, a classical marker of activation. Almost no MG were immunostained with antibodies against Mac-2 in layer V of P8 VEH animals (1.41%,

n=640 cells, N=4 animals; Fig. 2C1) whereas a strong expression of Mac-2 was found in P8 MIN animals (57.89%, n=1273, N=5 animals; Fisher's exact test $p<0.0001$; Fig 2C2).

These observations are consistent with minocycline inducing an activation of MGs in layer V of S1. Because microglial activation is associated with MG proliferation, we also tested whether minocycline changes the expression of the proliferation marker Ki-67 in layer V. As already observed in layer IV (Arnoux et al., 2013), we found that a small proportion of layer V MGs in VEH animals were immunostained with antibodies against Ki-67 (17.06% n=674 N=4 animals). Remarkably, this proportion doubles in MIN animals (34.78% n=713 N=3 animals; Fisher's exact test $p<0.0001$; Fig 2D), indicating that minocycline treatment between P6 and P8 increases MG proliferation. Altogether, these results show that layer V MGs during early postnatal stages of cortical development respond to minocycline by changes in morphology and up regulation of immuno-marker expression similar to those classically observed upon MG activation in pathological conditions.

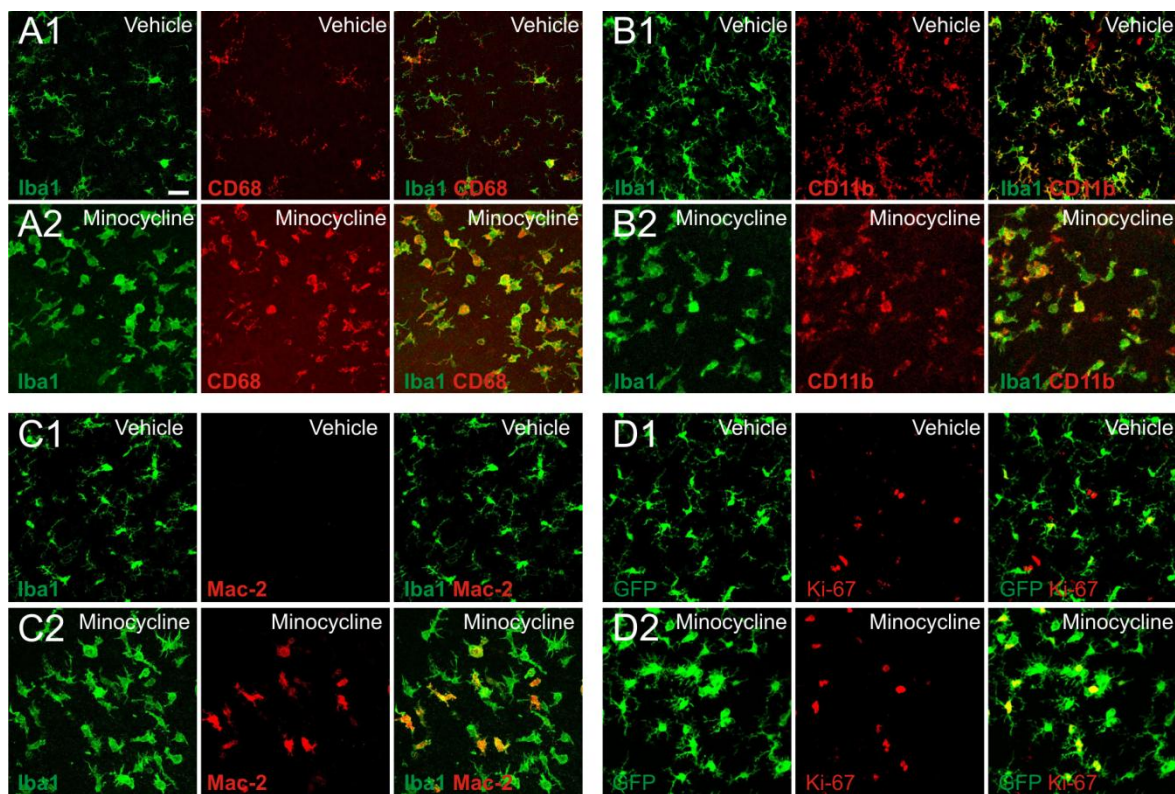


Figure 2: Expression of immunomarkers by microglial cells in layer V of the barrel cortex of P8 mice injected with vehicle or minocycline between P6 and P8.

(A) Coronal sections of vehicle- (A1) and minocycline injected mice (A2) showing microglial cells immunostained for Iba1 and for CD68.

(B) Coronal sections of vehicle- (B1) and minocycline-injected mice (B2) showing microglial cells immunostained for Iba1 and for CD11b.

(C) Coronal sections of vehicle- (C1) and minocycline-injected mice (C2) showing microglial cells

immunostained for Iba1 and for Mac-2.

(D) Coronal sections of vehicle- **(D1)** and minocycline-injected mice **(D2)** showing eGFP positive microglial cells (left panel) immunostained for Ki-67 (middle panel). Scale bar, 25 μ m.

Minocycline modifies electrophysiological properties of layer V microglia

MGs in different states of activation express different sets of voltage-dependent ion channels (Kettenmann et al., 2011). We thus performed whole-cell recordings of layer V MGs in acute slices of P8 VEH and MIN CX3CR1^{+eGFP} mice. Most of MGs from P8 VEH animals showed small inward currents when their membrane potential was hyperpolarized (Fig. 3A, 3B and 3C). As previously shown for layer IV MGs of the developing S1 (Arnoux et al., 2013), we found that $45.71 \pm 5.33\%$ of layer V MGs of VEH animals expressed an outward current at depolarized potentials, probably mediated by Kv1.3 (Arnoux et al., 2013; Menteyne et al., 2009) (Fig 3A, 3B and 3D). Accordingly, their mean I/V relationship was characterized by a small rectification below -100 mV and an outward rectification above -30 mV (Fig 3B). The majority of layer V MGs of P8 MIN animals exhibited a large inward current at hyperpolarized values (Fig 3A, B and C) and no voltage-activated current at depolarized values (Fig 3A, B and 3D). The mean I/V relationship of MGs from MIN animals displayed a large rectification below -100 mV and an almost linear relationship at depolarized values (Fig 3B). In addition, less MGs of P8 MIN mice expressed delayed rectifying outward currents compared to P8 VEH mice (Fig 3D). These results are consistent with a previous report describing that minocycline decreases channel expression responsible for the delayed rectifying outward current (Natile-McMenemy et al., 2007).

We also observed that MGs of VEH and MIN mice differed by their membrane capacitance (Cm). MGs of MIN animals had a higher Cm compared to MGs from VEH animals (Fig 3E), in accordance with the increased soma size of MGs in MIN animals (Fig 1C and 1D). However, we did not observe a difference in the membrane resistance (Rm) between MGs from VEH and MIN animals (Fig 3F), which is somehow surprising when considering that Rm varies inversely to Cm in most models of MG activation.

These data indicate that minocycline induces a profound change of MG phenotype which, surprisingly, resembles by several aspects that of MGs activated in pathological conditions.

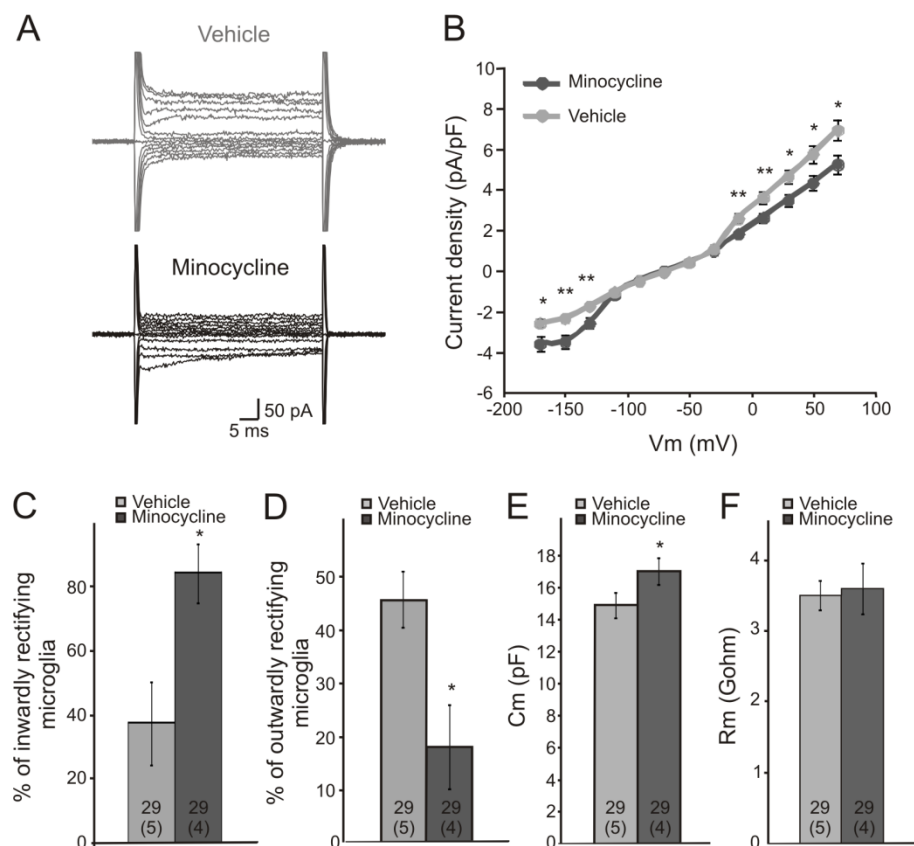


Figure 3: Electrophysiological profile of microglia recorded in layer V of the barrel cortex of P8 mice injected with vehicle or minocycline from P6 to P8.

(A) Current traces obtained in response to voltage steps from a holding potential of -70 mV in vehicle- (upper trace, light grey) and minocycline-treated mice (bottom trace, dark grey).

(B) Mean current/voltage relationship of microglia from vehicle- (light grey; n=29 cells from 5 animals) and minocycline-treated mice (dark grey; n=29 cells from 4 animals). Proportion of microglial cells expressing inward currents induced by hyperpolarisation (C) and expressing outward currents induced by depolarisation (D).

(E) Microglia membrane capacitance and (F) membrane resistance in layer V of the barrel cortex of vehicle- (light grey; n=29 cells from 5 animals) and minocycline-injected mice (dark grey; n=29 cells from 4 animals).

*p<0.05 and **p<0.01 (Mann-Whitney U-test).

Minocycline induces cellular apoptosis in the developing somatosensory cortex

Pathological MG activation is often associated with apoptosis and during normal development MGs regulate naturally occurring neuronal death (Pont-Lezica et al., 2011). We therefore examined whether minocycline treatment induces cellular death in the cortex by assessing the expression of the cleaved caspase-3, an apoptosis marker. Whereas very few immunostaining against caspase-3 was found in

layer V of VEH mice (Fig 4A1), we observed numerous caspase-3 positive elements in MIN mice (Fig 4A2). At higher magnification and using orthogonal views, we noted that MGs engulfed apoptotic elements (Fig 4B).

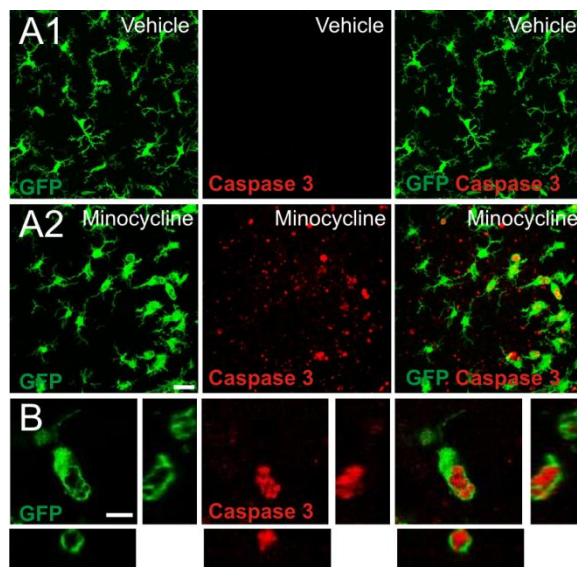


Figure 4: Minocycline induces cellular apoptosis in layer V of the barrel cortex.

(A1) Stacks of confocal images (total thickness is 25 μ m) showing coronal sections of P8 vehicle-injected mice showing eGFP positive microglial cells (left panel) and the absence of staining for cleaved caspase-3 (middle panel). Merge pictures are in the right panel. (A2) Stacks of confocal images (total thickness is 18 μ m) showing coronal sections of P8 minocycline-injected mice showing microglial cells eGFP positive (left panel) and the immunostaining for cleaved caspase-3 (middle panel). Merge pictures are in the right panel.

(B) Orthogonal views of a confocal optical slice showing eGFP positive microglia engulfing caspase-3 positive elements.

Scale bars, 25 μ m in A; 10 μ m in B.

We next asked whether cellular apoptosis and MG activation proceed simultaneously or sequentially by examining the expression of caspase-3 and the microglial phenotype after a minocycline treatment of 24h. In P7 MIN mice, we observed an important cellular labeling with antibodies against cleaved caspase-3 but almost no Mac-2 staining (Fig 5). The density of caspase-3 positive cells in layer V after 24h of minocycline was comparable to that found after 48h of treatment (Fig 5D and E) whereas the number of MGs expressing Mac-2 was significantly lower at 24h than at 48h of treatment (Fig 5D and F). In addition, the percentage of proliferating Ki-67 positive MGs did not change after 24h of MIN treatment compared to VEH animals (Fig 5C). These observations indicate that minocycline induces apoptosis before leading to full activation of MG. Yet, some MG properties were already impacted after 24h of minocycline treatment. Although we did not observe changes in MG density in layer V and VI in P7 MIN animals, there was a deficit of MG density in layers II/III and IV (Fig 5A). Moreover, the soma size of layer V MGs was slightly but significantly increased by 24h of minocycline (Fig 5B). Thus, apoptosis proceeds faster than modifications of MG phenotype in layer V of the cortex and this may suggest that MG activation is a consequence rather than a cause of apoptosis.

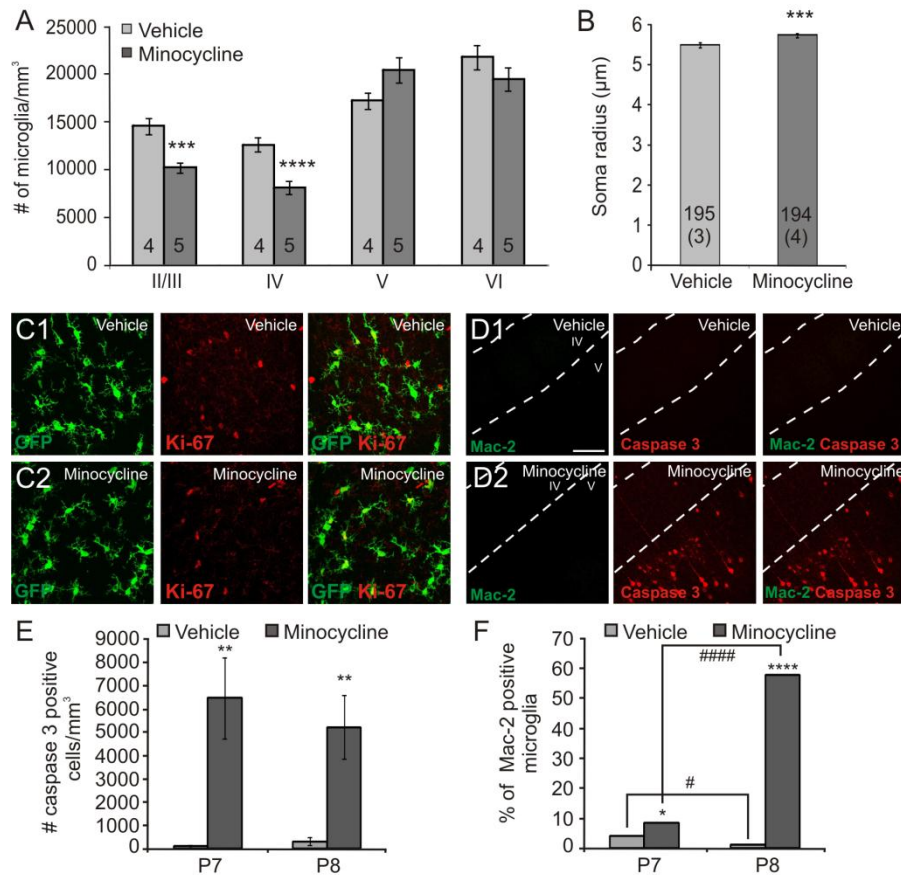


Figure 5: Characterization of microglia distribution and phenotype and assessment of cellular death after 24h of minocycline treatment.

(A) Density of microglial cells in different cortical layers of P7 mice injected with vehicle (light grey; N= 4 mice) or minocycline (dark grey; N=5 mice) from P6 and for 24h. Statistical difference between conditions for a given layer *** p < 0.001 and **** p < 0.0001 (Mann Whitney U-test).

(B) Changes in the soma radius of microglial cells of layer V between vehicle- (light grey; n=195 cells from 3 animals) and minocycline-treated mice (dark grey; n=194 cells from 4 animals). p > 0.001 (Mann Whitney U-test).

(C) Coronal sections of vehicle- (C1) and minocycline-injected mice (C2) showing eGFP positive microglial cells and Ki-67 immunostaining. Merge pictures are in the right panel.

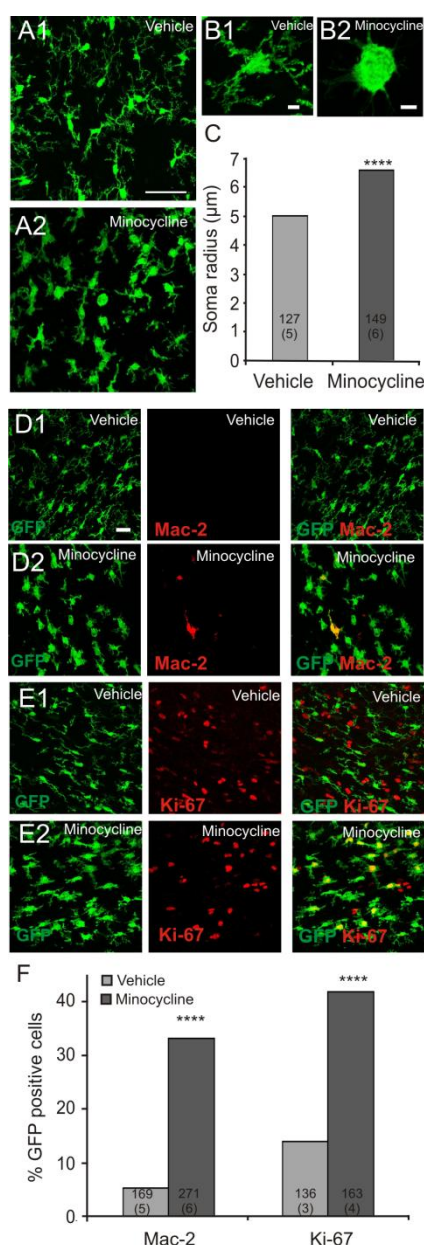
(D1) Coronal sections of P7 vehicle-injected mice showing the absence of staining for Mac-2 (left panel) and for cleaved caspase-3 (middle panel). (D2) Coronal sections of P7 minocycline-injected mice showing cleaved caspase-3 positive elements (middle panel) and, in the same slice, the absence of staining for Mac-2 (left panel). Merge pictures are in the right panel.

(E) Comparison of caspase-3 positive cell density in layer V of S1 after 24 and 48h of treatment with vehicle (light grey) or with minocycline (dark grey). Statistical differences between different conditions for a given treatment duration ** p < 0.01 (Mann-Whitney U-test) P7 vehicle N=4; P7 minocycline N=5; P8 vehicle N=4; P8 minocycline N=3.

(F) Comparison of the percent of microglia immunostained for Mac-2 in layer V of the S1 after 24 and 48h of treatment with vehicle (light grey) or with minocycline (dark grey). P7 vehicle n=256 cells from 3 animals; P7 minocycline n=470 cells from 3 animals; P8 vehicle n=631 from 4 animals; P8 minocycline n=536 cells from 5 animals. Statistical differences between different conditions for a given treatment duration * p < 0.05 and **** p < 0.0001 and statistical differences between different treatment duration for a given condition # p < 0.05 and #### p < 0.0001 (Fisher's exact test).

Scale bars, 20 μm in C and 100 μm in D.

Minocycline alters microglia phenotype in subcortical white matter



Recently, Ueno et al., reported that MGs in the subcortical white matter (sWM) support survival of layer V cortical neurons during the first postnatal week through the release of the insulin-like growth factor-1 (IGF1) (Ueno et al., 2013). In particular, they showed that minocycline treatment between P3 and P5 induces the apoptosis of layer V pyramidal cells and proposed that minocycline would block IGF1 release onto axons of layer V pyramidal cells by inhibiting the activation of MGs located in the sWM. In contrast to this previous study, we observed that minocycline administration between P6 and P8 promoted phenotypic changes of sWM MGs resembling activation in pathological conditions (Fig 6). First, as this is the case for layer V MG, we did not observe any sign of activation in VEH animals (Fig 6). Second, upon minocycline treatment, we noted an increase in MG soma size (Fig 6A, B and C) and a higher expression of Mac-2 and of Ki-67 in MGs (Fig 6D-F). Consequently, the apoptosis induced in cortical layer V of P8 MIN mice cannot result from inhibition of MG activation in sWM.

Figure 6: Minocycline treatment from P6 to P8 affects microglia phenotype in the subcortical white matter.

(A) Stacks of confocal images (total thickness is 15 μm) showing microglia in subcortical white matter (see Fig 1 for localization) from vehicle- (A1) and minocycline-injected CX3CR1+/eGFP mice (A2).

(B) Stacks of confocal images (total thickness is 10 μm) showing fluorescent microglial cells at higher magnification in the subcortical white matter of P7 vehicle- (B1) and minocycline-treated mice (B2).

(C) Changes in the soma radius of subcortical microglial cells of vehicle- (light grey; n=127 cells from 5 mice) and minocycline treated mice (dark grey; n=149 cells from 6 mice). *** p > 0.001 (Mann Whitney U-test).

(D) Stacks of confocal images (total thickness 22 μm) showing coronal sections of vehicle- (D1) and minocycline-injected mice (D2) showing eGFP positive microglial cells (left panel) and the Mac-2 immunostaining (middle panel). Merge pictures are in the right panel.

(E) Stacks of confocal images (total thickness 17 μm) showing coronal sections of vehicle- (E1) and minocycline-injected mice (E2) showing eGFP positive microglial cells (left panel) and Ki-67 immunostaining (middle panel).

(F) Quantification of microglia expressing Mac-2 and Ki-67 in vehicle- and minocycline-injected mice. **** p < 0.0001 (Fisher's exact test).

Scale bars, 50 μm in A, 5 μm in B and 20 μm in D1-E2.

Minocycline-induced effects are dependent on a developmental time window

Minocycline has no reported effects on the adult CNS in physiological conditions and, in our hands, minocycline treatment of adult mice did not modify MG distribution and phenotype in S1 (data not shown). We thus explored whether minocycline treatment begun at P8 had similar effects than those begun at P6. Minocycline had only a minor effect on MG distribution at P10 after 2 days of minocycline treatment (Fig 7A). We did not find a difference in MG density in layers II/III and VI between P10 VEH and MIN mice (Fig 7B) but there were a slight deficit in layer IV and a slight increase in the S1 layer V of MIN mice (Fig 7B). Thus, P8 to P10 minocycline treatment had a smaller impact on MG distribution than P6 to P8 treatment.

In addition, MG exhibited thin and ramified processes with a small soma in both VEH and MIN mice (Fig 7C). The measure of the soma radius showed no difference between MGs from VEH and MIN mice (Fig 7D). We also examined the expression of markers of MG activation and, in contrast with early treatments, we did not observe a labeling of MGs with Mac-2 antibody in P10 MIN mice (2.47%, n=486, N=2 MIN mice and 1.23%, n=405, N=3 VEH mice; $p=0.22$ with Fisher's exact test, Fig 7E). In addition, the percentage of Ki-67 positive MG was the same in VEH (7.68%, n=625, N=3 animals) and in MIN mice (10.7%, n=355, N=2 animals; $p=0.12$ Fisher's exact test, Fig 7F). We did not observe either any sign of apoptosis using caspase-3 immune-staining (Fig 7G). Thus, induction of apoptosis and of MG activation by minocycline in S1 is critically dependent upon the developmental stage at which the treatment is applied.

Discussion:

We showed that minocycline has unusual effects during a critical period of the cortical development. In mice that received minocycline between P6 and P8, the distribution and phenotype of MGs were altered while a marked cortical apoptosis developed. These effects were virtually absent when treatment was delayed by only two days (P8-P10).

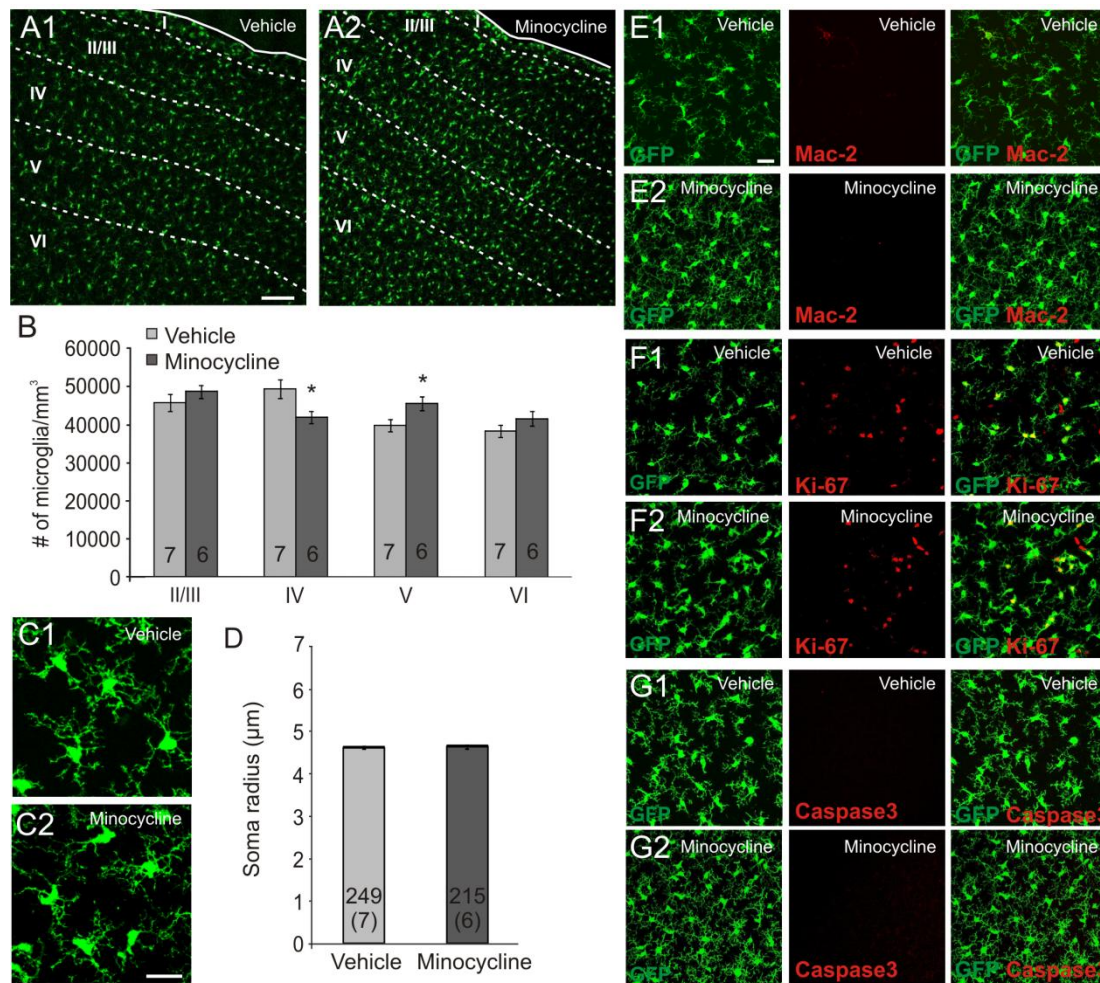


Figure 7: Minor effects of minocycline in mice treated from P8 to P10.

(A) Confocal images of coronal sections from vehicle- (A1) and minocycline-injected CX3CR1^{+/eGFP} mice (A2). Pial surfaces are in the upper right corner and cortical layers are delineated by dashed lines. (B) Density of microglial cells in different cortical layers in vehicle- (light grey; N= 7 animals) and minocycline-treated mice (dark grey; N= 6 animals) from P8 to P10. Statistical difference * $p < 0.05$ (Mann Whitney U-test).

(C) Stacks of confocal images (total thickness is 22 μm) showing fluorescent microglial cells at higher magnification in layer V of the barrel cortex of P10 vehicle- (C1) and minocycline-treated mice (C2).

(D) No changes in the soma radius of microglial cells of layer V between vehicle- (light grey; n=249 cells from 7 mice) and minocycline-treated mice (dark grey; n=215 cells from 6 mice). NS $p > 0.05$ (Unpaired t test with Welch correction).

(E) Stacks of confocal images (total thickness is 20 μm) showing coronal sections of vehicle- (E1) and minocycline-injected mice (E2) showing eGFP positive microglial cells (left panel) and the absence of Mac-2 immunostaining (middle panel). Merge pictures are in the right panel.

(F) Stacks of confocal images (total thickness is 17 μm) showing coronal sections of vehicle- (F1) and minocycline-injected mice (F2) showing eGFP positive microglial cells (left panel) and Ki-67 immunostaining (middle panel). Merge pictures are in the right panel.

(G) Stacks of confocal images (total thickness is 20 μm) showing coronal sections of vehicle- (G1) and minocycline-injected mice (G2) showing eGFP positive microglial cells (left panel) and the absence of cleaved caspase-3 immunostaining (middle panel). Merge pictures are in the right panel. Scale bars, 100 μm in A and 20 μm in C1-G2.

Alteration of microglia distribution and phenotype by minocycline

Minocycline treatment at the end of the first post natal week modifies the normal evolution of MG density in cortical layers of S1. We previously reported that increase of MG density at this developmental stage proceeds following the inside-out gradient of cortical development, with deep layers being populated before superficial due to the recruitment and migration of MG from subcortical regions (Arnoux et al., 2013). The first minocycline effect after 24h of treatment is a deficit of MG in layers II/III and IV. It is thus possible that minocycline inhibits this process by altering microglial migration as it has been previously shown (Natile-McMenemy et al., 2007). In keeping with this hypothesis, the functional expression of Kv1.3 channels mediating the outward current is down-regulated in P8 MIN mice. Although the role of Kv1.3 during MG development is not fully elucidated, there is evidence that Kv1.3 channel expression is not a landmark of MG activation (Arnoux et al., 2013) but rather related to cell adhesion and migration (Natile-McMenemy et al., 2007). In addition, the changes in MG distribution are probably also affected by neuronal apoptosis. The accumulation of numerous apoptotic elements in the cortical layer V could favor the recruitment and retention of MGs to accomplish their phagocytic functions.

We also observed a transformation of MG phenotype in P8 MIN mice. The soma size of MGs increased and there was an up-regulation of markers related to MG phagocytic and proliferative activities. The current density of inward channels was also enhanced and, according to its electrophysiological features, this conductance is probably mediated by Kir2.1 (Eder, 1998; Kettenmann et al., 2011). Thus, 48h of minocycline treatment induces phenotypic changes in P8 cortical MGs that resemble those observed in pathological conditions; this paradoxical activation of MGs may therefore be a consequence of the induction of apoptosis by minocycline.

Cell death induced by minocycline

Surprisingly, a significant number of cells were positive for the cleaved caspase-3 staining in S1 of P8 MIN mice. The apoptosis marker expression was already maximal after 24h of treatment but was not observed when treatment was postponed by 2 days (P8-10). Thus, a critical period for minocycline-

induced apoptosis exists and ends around P8. Moreover, cellular apoptosis develops before full activation of MGs, suggesting that the latter is rather a consequence than a cause of the former.

Deleterious minocycline effects are surprising with regard to the plethora of studies showing minocycline-induced neuroprotection in cerebral disorders (Domercq et al., 2004). However, few studies reported detrimental effects of minocycline (Diguët et al., 2004; Tsuji et al., 2004; Yang et al., 2003). Recently, Ueno et al., reported that activated MGs in sWM support survival of layer V cortical neurons during the first postnatal week through the release of IGF1 on their axons and that blocking MG activation with minocycline between P3 and P5 promotes apoptosis of layer V pyramidal cells by blocking IGF1 release in sWM (Ueno et al., 2013). Analysis of morphology and marker expression of MGs (Figure 6) indicates that minocycline does not prevent MG phenotype changes resembling pathological activation but rather promotes them between P6 and P8 in sWM, as this is the case in cortical layers. Thus, minocycline induced cortical cell death even at later stages than those tested by Ueno et al. (2013) but this effect does not seem to be mediated by inhibition of MG activation in sWM. However, we cannot exclude that, in our experiments (*i.e.* at P6-8), minocycline also downregulates IGF1 signaling in sWM despite the fact that we observed changes in MG phenotype opposite to those reported by Ueno et al. (2013) at early stages (*i.e.* at P3-5).

Could minocycline trigger apoptosis through another mechanism than by inhibiting the release of trophic factors by activated MG? It has been reported that minocycline also affects cellular and signaling pathways independently of its action on MG (Domercq et al., 2004). In particular, minocycline can inhibit matrix metalloproteinases (MMPs) (Siller et al., 2012) which play critical roles in cell survival by regulating the production of growth factors (Bruno et al., 2006; Lee et al., 2001). MMP-2 and -9 which are largely expressed by cortical cells in the developing neocortex are progressively down-regulated between birth and P10 (Bednarek et al., 2009). Thus, by inhibiting MMPs, minocycline could directly compromise neuronal survival and the transient and paradoxical effect of minocycline would be explained by the down-regulation of MMP expression by the end of the first postnatal week.

In conclusion, our results show that minocycline treatment during a critical period of the postnatal development induces a massive cellular death in the somatosensory cortex and leads to alterations of MG distribution and phenotype, calling into question the use of this tetracycline derivative during CNS development. Although the mechanisms responsible for these effects remain to be established, our study clearly indicates that the presence of the classical inhibitor of MG activation minocycline does not preclude the development of a MG phenotype similar to that of activated MG in pathological conditions.

Acknowledgments:

We thank Céline Bidoret for advices and helpful discussions throughout this study, Jérôme Lecoq and Yannick Goulam Houssen for computer programs. We thank Pierre Gressens for his comments on a previous version of this article. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2010 BLAN 1419 01), the Région Ile-de-France (NeRF), the Collège Doctoral Franco-Japonais, Kakenhi 20021018. Isabelle Arnoux is a recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (FDT20130928365). Confocal pictures were acquired at the microscopy platform of the Saints Pères University Center. The Audinat lab is affiliated to Paris School of Neuroscience (ENP).

Author contributions:

IA, MH and ASD performed the experiments and analyzed the data. IA, MH and EA conceived the project and designed the experiments. IA and EA wrote the paper.

References:

Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E. 2013. Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "Barrel" cortex. *Glia* 61:1582-1594.

- Bednarek N, Clement Y, Lelievre V, Olivier P, Loron G, Garnotel R, Gressens P. 2009. Ontogeny of MMPs and TIMPs in the murine neocortex. *Pediatr Res* 65:296-300.
- Blank T, Prinz M. 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61:62-70.
- Bruno MA, Cuello AC. 2006. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6735-6740.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Choi Y, Kim HS, Shin KY, Kim EM, Kim M, Kim HS, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee JP, Chang KA, Kim S, Suh YH. 2007. Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology* 32:2393-2404.
- Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 33:4216-4233.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA. 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14:1189-1197.
- Diguet E, Fernagut PO, Wei X, Du Y, Rouland R, Gross C, Bezard E, Tison F. 2004. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 19:3266-3276.
- Domercq M, Matute C. 2004. Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci* 25:609-612.
- Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14669-14674.
- Eder C. 1998. Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 275:C327-C342.
- Frade JM, Barde YA. 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20:35-41.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E. 2012. Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J Neurosci* 32:15106-15111.
- Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. 1996. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855-862.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.
- Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfield R. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53:292-304.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. 2005. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115:71-83.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM. 2013. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci* 33:2761-2772.
- Lund S, Christensen KV, Hedtjarn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J, Hasseldam H, Schrattenholz A, Porzgen P, Leist M. 2006. The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol* 180:71-87.
- Mallat M, Marin-Teva JL, Cheret C. 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101-107.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van RN, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Menteyne A, Levavasseur F, Audinat E, Avignone E. 2009. Predominant functional expression of Kv1.3 by activated microglia of the hippocampus after Status epilepticus. *PLoS ONE* 4:e6770.
- Napoli I, Neumann H. 2009a. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158:1030-1038.
- Napoli I, Neumann H. 2009b. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol*.
- Nikodemova M, Lee J, Fabry Z, Duncan ID. 2010. Minocycline attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats by reducing T cell infiltration into the spinal cord. *J Neuroimmunol* 219:33-37.
- Nutile-McMenemy N, Elfenbein A, Deleo JA. 2007. Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *J Neurochem* 103:2035- 2046.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Pont-Lezica L, Bechade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. 2011. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 119:901-908.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Roy A, Jana A, Yatish K, Freidt MB, Fung YK, Martinson JA, Pahan K. 2008. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 45:686-699.
- Ryu JK, Franciosi S, Sattayaprasert P, Kim SU, McLarnon JG. 2004. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia* 48:85-90.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. 2013. The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61:24-36.
- Siller SS, Broadie K. 2012. Matrix metalloproteinases and minocycline: therapeutic avenues for fragile X syndrome. *Neural Plast* 2012:124548.

Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. 2005. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist* 11:308-322.

Tikka TM, Koistinaho JE. 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166:7527-7533.

Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV. 2004. Minocycline worsens hypoxicischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp Neurol* 189:58-65.

Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T. 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16:543-551.

Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138-8143.

Yang L, Sugama S, Chirichigno JW, Gregorio J, Lorenzl S, Shin DH, Browne SE, Shimizu Y, Joh TH, Beal MF, Albers DS. 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 74:278-285.

Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15769-15774.

Chapitre 3: Discussion

Le travail mené au cours de cette thèse avait pour but de mieux comprendre les caractéristiques des cellules microgliales au cours du développement post-natal du système nerveux central et d'examiner l'influence des interactions neurone/microglie sur la maturation des réseaux neuronaux. Dans cette ultime partie du manuscrit, je discuterai les résultats obtenus et le choix du modèle d'étude au regard de la littérature existante, de plus en plus nombreuse dans ce domaine.

1. Le cortex en champ de tonneaux : un excellent modèle d'étude des interactions neurone/microglie

Nous avons choisi d'étudier les propriétés des cellules microgliales ainsi que leurs influences sur le développement synaptique dans le cortex somatosensoriel primaire car le développement de cette structure cérébrale est bien documenté. Le principal avantage de ce modèle repose sur sa remarquable cytoarchitecture. Les fibres thalamiques innervant le cortex se concentrent au centre d'une structure corticale facilement identifiable en microscopie, les tonneaux, alors que les corps cellulaires des neurones de la couche 4 du cortex somatosensoriel se situent à la périphérie de ces tonneaux (aussi appelés « murs »). Cette ségrégation entre les différents composants du réseau synaptique facilite l'étude de la relation entre la microglie et le réseau neuronal. En effet, il est plus facile d'étudier ces relations au cours du développement lorsque les synapses ont une localisation précise plutôt que lorsqu'elles sont réparties aléatoirement dans le parenchyme comme c'est le cas dans les autres couches corticales ou dans l'hippocampe par exemple.

Cependant, étant donné que la mise en place des réseaux neuronaux des aires fonctionnelles comme les cortex moteur (M1), somatosensoriel (S1) et visuel (V1) repose sur des processus similaires, il est hautement probable que les interactions neurone/microglie caractérisées dans notre étude soient également observables dans ces autres aires. De façon plus générale, la mise en place et la maturation des synapses dans les différentes régions du cerveau suivent un décours spatio-temporel spécifique au cours du développement et on peut supposer que la maturation de ces réseaux neuronaux

nécessite l'intervention des cellules microgliales. Plusieurs études ont d'ores et déjà démontré une implication des cellules microgliales dans la maturation synaptique au sein de différentes structures cérébrales comme l'hippocampe (Paolicelli et al., 2011; Roumier et al., 2004) et le noyau géniculé dorso-latéral (Schafer et al., 2012). Etant donné que la maturation des synapses a lieu à des temps différents dans les différentes structures cérébrales, on peut supposer que l'action de la microglie peut être différente. En effet, une modulation des propriétés fonctionnelles des cellules microgliales (phagocytose, libération de facteurs trophiques,...) pourrait être observée dans différentes structures au cours du développement, mettant en lumière une gamme d'actions spécifiques. Cependant, on peut également supposer que la maturation de certaines synapses pourrait se dérouler indépendamment de l'action des cellules microgliales. Ainsi, la proportion de synapses dans le cerveau global impliquant une action des cellules microgliales dans leur développement reste à déterminer.

2. Distribution et recrutement des cellules microgliales

Dans le cortex somatosensoriel primaire, nous avons montré que les cellules microgliales adoptent une distribution particulière au cours du développement post-natal (Hoshiko et al., 2012). Jusqu'à P5, les cellules microgliales se situent à la périphérie du centre des tonneaux contenant les synapses thalamocorticales. A partir de P6, les cellules microgliales commencent à envahir les tonneaux et cette invasion se poursuit au cours du développement afin d'atteindre une distribution cellulaire homogène au niveau de la couche 4 du cortex somatosensoriel. Au cours de notre étude, nous avons montré que la voie de signalisation neurone/microglie, fractalkine/CX3CR1, permet le recrutement précoce des microglies aux synapses thalamocorticales (avant P7).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le recrutement tardif des cellules microgliales chez les animaux présentant un défaut d'expression de CX3CR1.

La première est qu'il est possible qu'au cours du développement post-natal, plusieurs signaux guident les cellules microgliales à leurs cibles. Ainsi, il y aurait une régulation de l'expression des signaux au cours du développement qui permettrait une action consécutive ou synergique de ces signaux sur le recrutement et l'activité des cellules microgliales. L'activation de la voie de

signalisation fractalkine/CX3CR1 serait la première voie de signalisation impliquée dans le recrutement précoce des cellules microgliales aux synapses thalamocorticales, puis une ou plusieurs autres voies de signalisation s'activeraient prenant ainsi le relai dans le guidage des cellules microgliales. Au cours de ma thèse, j'ai émis l'hypothèse que la voie de signalisation Ténascine-C/TLR4 pouvait être responsable de ce recrutement tardif. La Ténascine-C est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire exprimée au sein des tonneaux entre P2 et P9 (Steindler et al., 1995) et son récepteur TLR4 est exprimé par les cellules microgliales (Midwood et al., 2009). Ainsi, des interactions entre la Ténascine-C et TLR4 pourraient être responsable de la distribution des cellules microgliales dans le cortex au cours du développement. Afin de tester cette hypothèse, j'ai également analysé la distribution des cellules microgliales chez des double-mutants des voies de signalisation CX3CR1 et TLR4. Cette étude a été réalisée chez des P10 soit à un stade où les cellules microgliales ont déjà envahi les tonneaux (N=4 animaux). Sur les coupes tangentielles présentées dans la figure 22, on constate que les cellules microgliales ont envahi les tonneaux et que leur distribution apparaît homogène dans la couche 4. La distribution des cellules microgliales chez les CX3CR1^{eGFP/eGFP} et les CX3CR1^{eGFP/eGFP}; TLR4^{-/-} semble identique. Cette analyse exclue donc une contribution de la voie de signalisation impliquant TLR4 dans le recrutement retardé des cellules microgliales chez les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP}. Par conséquent, d'autres études portant sur l'identification des facteurs impliqués dans le recrutement tardif de ces cellules restent à réaliser afin de prouver cette hypothèse.

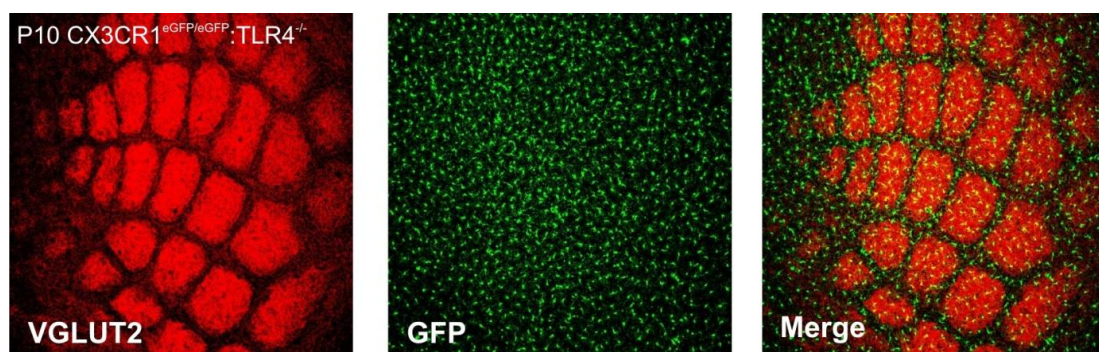


Figure 22: Distribution des cellules microgliales au cours de la deuxième semaine post-natale chez les CX3CR1^{eGFP/eGFP};TLR4^{-/-}

Coupes tangentielles des cerveaux de doubles mutants CX3CR1^{eGFP/eGFP};TLR4^{-/-} âgés de 10 jours postnataux. Les tonneaux de la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire sont visualisés à l'aide d'anticorps anti-VGluT2 (rouge, à gauche) et les cellules microgliales expriment la GFP (vert, au milieu). La superposition des images des tonneaux et des microglies est présentée à droite.

La seconde hypothèse pouvant expliquer le recrutement retardé des cellules microgliales chez les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} est que des mécanismes compensatoires se développent chez ces souris transgéniques. Il est possible que pour compenser la perte de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1, une autre voie de signalisation soit exprimée et remplace celle-ci dans le recrutement des cellules microgliales. Il pourrait s'agir de l'expression d'une voie de signalisation qui n'est pas exprimée habituellement à ce stade du développement ou de la surexpression d'une voie de signalisation existante. Par conséquent, une autre voie de signalisation impliquée la régulation des activités microgliales modulerait le recrutement retardé des cellules et il pourrait s'agir d'une voie de signalisation impliquant les cytokines, les purines, etc.

La troisième hypothèse expliquant le recrutement retardé des cellules microgliales chez les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} repose sur un changement des propriétés des cellules microgliales dans ces souris transgéniques. En effet, l'absence de CX3CR1 altère les propriétés microgliales chez l'adulte en conditions pathologiques (Cardona et al., 2006) mais aussi physiologiques (Rogers et al., 2011). Ainsi, la capacité de migration de la microglie n'exprimant pas CX3CR1 pourrait être modifiée lors du développement. Un défaut de migration de ces cellules a déjà été observé dans des explants de rétines provenant des animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} (Liang et al., 2009). Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié la motilité des cellules microgliales déclenchée par un agoniste purinergique. Une pipette contenant 100 μ M de 2MeSADP, un agoniste des récepteurs P2Y₁₂ connus pour être impliqués dans la motilité des cellules microgliales, est positionnée dans la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire dans des tranches aiguës et nous avons observé le comportement des cellules microgliales au cours du développement (P5-P9) chez les animaux CX3CR1^{+eGFP} (N = 6 animaux) et CX3CR1^{eGFP/eGFP} (N = 3 animaux). Comme il a été montré dans des études précédentes (Avignone et al., 2008; Davalos et al., 2005), nous avons observé une attraction des prolongements cellulaires vers la source d'agoniste (100 μ M 2MeSADP). De plus, nous avons constaté que certaines cellules microgliales présentent un mouvement dirigé de leur soma vers la pipette (figure 23 A). Ce résultat est propre aux cellules microgliales en développement car chez l'adulte en conditions physiologiques et pathologiques, ce même protocole ne déclenche pas de mouvement des somas, au moins dans une fenêtre temporelle

équivalente, mais uniquement une motilité dirigée des prolongements. Ainsi, au cours de ces études de vidéo-microscopies menées au cours du développement post-natal, nous avons observé deux types de comportements : soit le soma des cellules se déplace vers la pipette soit il reste fixe. Nous avons comparé la vitesse de migration des cellules microgliales et le pourcentage de cellules se déplaçant chez les animaux $CX3CR1^{+/eGFP}$ et $CX3CR1^{eGFP/eGFP}$. Nous avons constaté que la proportion des cellules microgliales chez les animaux $CX3CR1$ déficients présentant un mouvement du soma était significativement plus faible que chez les $CX3CR1^{+/eGFP}$ (Figure 23 C) et que ces cellules se déplaçaient moins rapidement (Figure 23 B). Ces données suggèrent que les cellules microgliales n'exprimant pas le récepteur $CX3CR1$ ont certaines propriétés altérées. Par conséquent, le recrutement retardé des cellules microgliales pourrait être une conséquence de la réduction du nombre de cellules se déplaçant et d'une plus faible vitesse de migration cellulaire. Néanmoins, le signal permettant la motilité des cellules microgliales aux synapses thalamocorticales est peut être d'une autre nature que purinergique.

La fractalkine pourrait réguler positivement la migration des cellules microgliales. *In vitro*, il a été montré que les cellules microgliales présentent une forte activité migratrice en réponse à 3 nM de fractalkine (Maciejewski-Lenoir et al., 1999). L'activation de la voie de signalisation fractalkine/ $CX3CR1$ induit une mobilisation du calcium intracellulaire conduisant à l'activation de voie de signalisations intracellulaires impliquées dans les changements de conformation du cytosquelette et les réarrangements d'actine, ce qui en fin de compte aboutit à une réponse de migration cellulaire. L'incubation des cellules microgliales avec des anticorps anti- $CX3CR1$ bloque la migration des cellules microgliales vers la fractalkine. Ainsi, dans notre étude, l'activation de la voie de signalisation fractalkine/ $CX3CR1$ pourrait directement médier la migration des cellules microgliales vers le centre des tonneaux où se concentrent les cellules fractalkine-positives au cours de la première semaine post-natale et qu'un défaut d'expression de $CX3CR1$ retarde la migration des cellules. La migration microgliale dans le cortex des mutants résulterait de l'activation d'une ou plusieurs autres voies de signalisations mises en jeu en parallèle de celle de la fractalkine/ $CX3CR1$ ou développées par compensation de la perte de cette dernière.

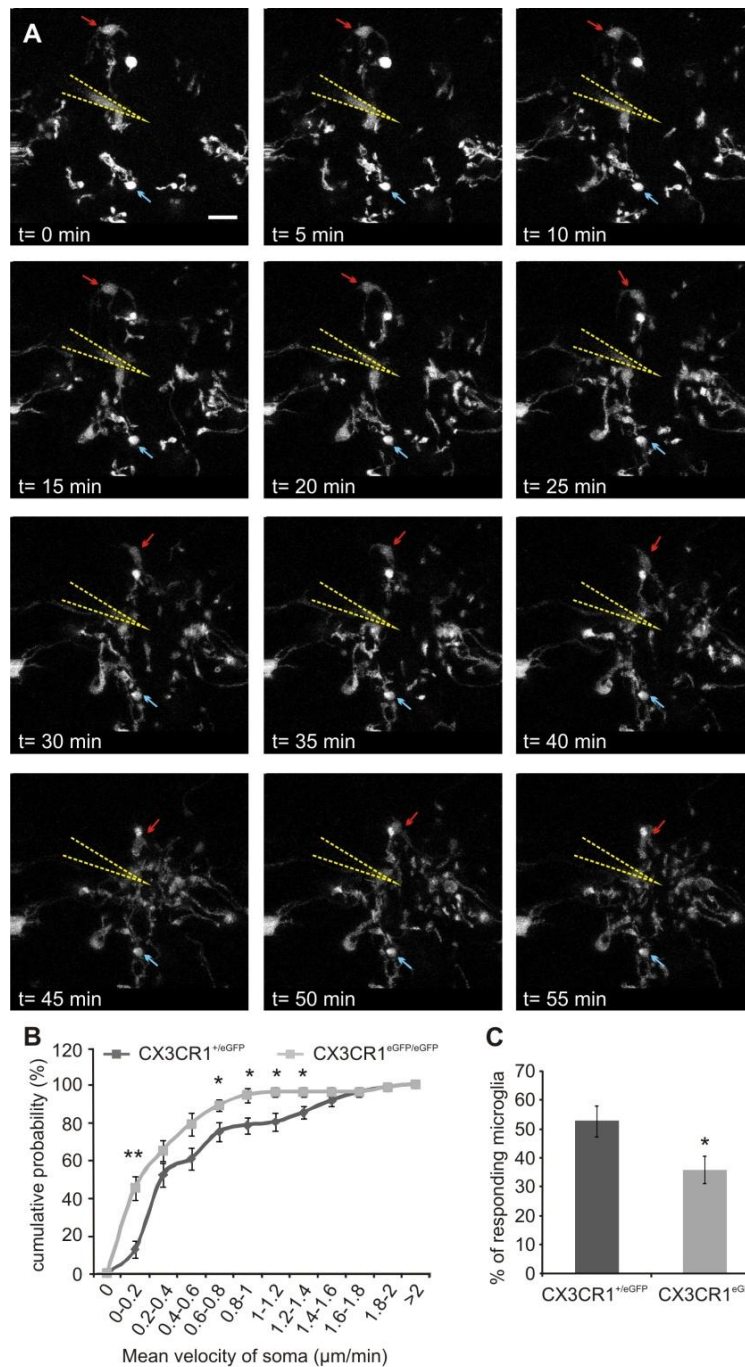


Figure 23: Comparaison de la motilité des cellules microgliales entre les animaux CX3CR1^{+/eGFP} et CX3CR1^{eGFP/eGFP} au cours du développement

A : Images bi-photoniques représentant la motilité des cellules microgliales exprimant la GFP vers une pipette (pointillé jaune) contenant 100 μM de 2MeSADP, un agoniste des récepteurs P2Y12. La flèche rouge indique une cellule microgliale dont le corps cellulaire effectue un mouvement alors que la flèche bleue indique une cellule dont le soma reste fixe. Les images sont des projections de tranches optiques dont l'épaisseur totale représente 50 μm. Echelle : 20 μm.

B : Histogramme cumulatif représentant la distribution des cellules microgliales selon la vitesse moyenne de déplacement de leur soma chez les animaux CX3CR1^{+/eGFP} et CX3CR1^{eGFP/eGFP}.

C : Pourcentage de cellules microgliales dont le corps cellulaire se déplace chez les animaux CX3CR1^{+/eGFP} et CX3CR1^{eGFP/eGFP}.

* $p < 0.05$ at ** $p < 0.01$ Unpaired t-test with Welch correction.

Nos résultats mettent en évidence un rôle important de la signalisation fractalkine/CX3CR1 dans le recrutement des cellules microgliales aux synapses thalamocorticales en cours de maturation. Par extrapolation, on peut supposer que cette voie de signalisation est également impliquée dans le recrutement de la microglie à d'autres synapses au cours du développement. Dans l'hippocampe en développement post-natal, il a été montré que les souris déficientes pour CX3CR1 présentent un défaut transitoire de recrutement de cellules microgliales engendrant des défauts de maturation synaptique à la synapse collatérales de Schafer/neurones pyramidaux de CA1 (Paolicelli et al., 2011). Ainsi, dans deux structures cérébrales distinctes : l'hippocampe et le cortex en champ de tonneaux, le recrutement des cellules microgliales implique la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1.

Néanmoins, on ne peut pas exclure l'implication d'autres voies de signalisation dans le recrutement de la microglie aux synapses. Il est possible que selon les aires cérébrales, un ou plusieurs signaux spécifiques à cette région permettent le recrutement des cellules microgliales aux sites synaptiques. Il a déjà été montré que les cellules microgliales peuvent se déplacer vers des sources d'ATP et autres dérivés purinergiques (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007; Wu et al., 2007), de glutamate (Liu et al., 2009), de NGF (De Simone et al., 2007), de chimiokines comme MCP-1 (Deng et al., 2009) et CCL21 (Rappert et al., 2002), etc. Mais la participation de ces signaux au recrutement des cellules microgliales au cours du développement n'est pas encore connue et des études sont nécessaires pour démontrer le rôle de ces voies de signalisation dans cette étape du développement.

3. Evolution du phénotype microglial au cours du développement

Les cellules microgliales sont des cellules extrêmement sensibles aux changements survenant dans leur environnement. Au cours du développement postnatal, de nombreux changements s'opèrent dans le SNC tels que la formation et l'élimination de dendrites, la mort neuronale, la maturation des

synapses... Ces événements se déroulent à une période du développement pendant laquelle les cellules microgliales sont encore immatures et on peut supposer que ces changements dans l'environnement vont entraîner des modifications de leur phénotype et de leurs activités. Dans la seconde publication présentée dans cette thèse (Arnoux et al., 2013), nous avons analysé le phénotype des cellules microgliales dans la couche 4 du cortex somatosensoriel entre P5 et P9. Nos résultats montrent que pendant cette période de maturation synaptique intense le phénotype acquis ne ressemble ni à celui des cellules microgliales quiescentes en conditions physiologiques ni à celui des cellules microgliales activées en conditions pathologiques chez l'adulte. Ce phénotype est donc particulier aux cellules microgliales en développement et pourrait indiquer une adaptation aux changements de l'environnement survenant spécifiquement à cette période.

Cependant, on peut également envisager que ces changements phénotypiques soient liés au processus de maturation des cellules microgliales et qu'ils soient indépendants des remaniements des réseaux neuronaux. Ainsi, les cellules microgliales évolueraient indépendamment de leur environnement afin d'acquérir des propriétés des cellules microgliales matures caractérisées entre autre par une morphologie ramifiée, une expression de base des récepteurs purinergiques et aucune expression de marqueurs immunohistochimiques de cellules microgliales activées. Il serait sans doute intéressant d'étudier si le décours temporel d'expression de phénotype particulier, notamment l'expression de Kv1.3, est le même dans d'autres structures cérébrales, et notamment dans d'autres aires corticales, ayant un développement plus tardif, comme le cortex visuel primaire.

Par ailleurs, on peut supposer que cette transformation du phénotype microglial permet aux cellules de jouer un rôle dans les événements se déroulant au cours du développement postnatal. En effet, l'augmentation de l'expression des récepteurs purinergiques au cours du développement permettraient aux cellules microgliales d'être plus sensibles aux signaux purinergiques et elles répondraient à ces signaux par une libération de facteurs influençant la maturation ou l'efficacité synaptique. De plus, l'expression transitoire de Kv1.3 pourrait être une condition nécessaire à une action microgliale à cette période restreinte du développement.

Notre étude des effets de la minocycline ne nous permet malheureusement pas de conclure sur le rôle de l'expression transitoire de Kv1.3 par la microglie au cours du développement. En effet, si cette tétracycline est connue pour inhiber l'expression de Kv1.3 (Natile-McMenemy et al., 2007), elle inhibe aussi d'autres aspects de l'activation microgliale et interagit avec des mécanismes indépendants de la microglie (Domercq and Matute, 2004). Nos résultats montrent bien une diminution de l'expression de Kv1.3 dans la microglie après traitement avec la minocycline mais cet effet s'accompagne d'une activation microgliale qui est précédée par une mort neuronale accrue, rendant difficile l'interprétation de ces expériences quand au rôle de Kv1.3 microglial au cours du développement (Arnoux et al., 2014). Cependant, ces résultats montrent clairement que la microglie peut s'activer en présence de minocycline, que l'utilisation de cette drogue pour étudier la microglie au cours du développement est fortement sujette à caution et enfin qu'elle peut avoir des effets néfastes sévères sur la survie neuronale.

4. Les fonctions microgliales modulant la maturation synaptique

Au cours de cette étude, nous avons montré que les cellules microgliales sont recrutées aux synapses thalamocorticales en maturation (Hoshiko et al., 2012) et que lors de ce recrutement les cellules microgliales adoptent des propriétés particulières qui pourraient leur permettre d'agir sur le changement de force synaptique (Arnoux et al., 2013). Notre étude du mutant CX3CR1 indique qu'un défaut de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 induit un retard de recrutement des cellules microgliales et un défaut maturation synaptique au cours du développement (Hoshiko et al., 2012).

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le défaut de maturation observé chez ces souris. Ces hypothèses sont détaillées dans les deux prochaines sous-parties.

Hypothèse 1 : Altération des propriétés fonctionnelles de la microglie chez les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP}

Les interactions via des contacts physiques ou via des messagers solubles entre les neurones et les cellules microgliales seraient nécessaires à la maturation des synapses. En effet, on peut supposer que

la microglie agit directement sur la synthèse et la localisation des récepteurs post-synaptiques via l'activation de la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1. Il a été montré que l'activation de cette voie de signalisation promeut la libération de facteurs tels que le BDNF, $\text{TNF}\alpha$, IL6 et IL1 β (Ji and Suter, 2007) qui sont connus pour influencer la force synaptique. Ainsi, l'absence de cette voie de signalisation entraînerait une perte de fonction des cellules microgliales pour la libération de facteurs modulant la maturation synaptique lors du développement post-natal. C'est l'altération du phénotype microglial qui serait responsable du retard de maturation observé chez les mutants CX3CR1. De plus, il a été montré que la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 contrôle l'expression d'IL1beta et qu'une mutation perte-de-fonction de CX3CR1 entraîne une augmentation de l'expression de cette cytokine dans l'hippocampe (Rogers et al., 2011). Ce changement d'expression d'IL1beta entraîne des défauts au niveau des fonctions cognitives et de la plasticité synaptique. Ces défauts synaptiques pourraient résulter de l'influence d'IL1beta sur l'expression à la membrane et la phosphorylation des récepteurs post-synaptiques glutamatergiques. En effet, il a été observé qu'IL1beta diminue la phosphorylation et l'expression à la membrane des AMPA-R contenant GluA1 (Lai et al., 2006). Ainsi, la surexpression d'IL1beta chez les CX3CR1^{-/-} induit un défaut d'expression à la membrane des AMPA-R ce qui expliquerait les défauts observés au niveau des fonctions cognitives et de plasticité synaptique. Dans notre étude de l'influence des cellules microgliales sur la maturation fonctionnelles des synapses thalamocorticales au cours du développement post-natal, nous avons observé un défaut de l'évolution du ratio des courants AMPA/NMDA traduisant un retard de maturation synaptique chez les animaux déficients pour CX3CR1 (Hoshiko et al., 2012). On peut émettre l'hypothèse que les cellules microgliales des CX3CR1^{eGFP/eGFP} libèrent plus d'IL1beta que les microglies des souris contrôles comme observé dans l'étude de Rogers et al, 2011 qui bloque l'expression à la membrane des AMPA-R. La régulation de la production d'IL1beta microglial par la voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 serait un élément clé de la maturation synaptique. Afin de prouver cette hypothèse, nous pourrions déterminer par ELISA la quantité d'IL1beta présent dans la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire et nous pourrions envisager l'utilisation d'IL1Ra afin de compenser les retards de maturation dus à IL1beta.

Hypothèse 2 : Les interactions retardées entre les synapses et la microglie retarde la maturation synaptique chez les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP}

Chez les souris mutantes pour CX3CR1, nous avons observé un retard de recrutement des cellules microgliales aux synapses thalamocorticales en maturation. On peut donc supposer que le phénotype des cellules microgliales est normal mais que comme les cellules ne sont pas dans les tonneaux elles ne peuvent pas remplir leur(s) rôle(s) dans la modulation de la maturation synaptique. Quelles actions menées par la microglie permettent la maturation synaptique ? Actuellement, deux mécanismes principaux facilitant la maturation des synapses sont mis en avant : l'élimination sélective des synapses inappropriées grâce aux capacités phagocytiques des cellules microgliales et la libération de facteurs solubles promouvant la maturation fonctionnelle des récepteurs synaptiques.

Plusieurs études récentes mettent en évidence l'implication des cellules microgliales dans l'élimination des synapses surnuméraires mises en place au cours du développement. Paolicelli et collaborateurs ont montré par immunohistochimie et microscopie électronique que des éléments post-synaptiques peuvent être retrouvés à l'intérieur des cellules microgliales présentes dans l'hippocampe en développement (Paolicelli et al., 2011). Ces données indiquent que les cellules microgliales sont capables de phagocyter du matériel synaptique. Les auteurs de cette étude ont également montré que les animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} présentent un défaut d'élimination synaptique qui entraîne un défaut de maturation fonctionnelle synaptique. Par ailleurs, dans l'hippocampe des animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} la densité microgliale est réduite de façon transitoire au cours du développement, ce qui expliquerait cette réduction d'élimination synaptique et l'immaturité des réseaux synaptiques. On peut supposer que dans notre étude, le défaut de maturation des synapses thalamocorticales des animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} résulte d'un défaut ou d'un retard de phagocytose des synapses incorrectes par les cellules microgliales ce qui maintiendrait l'immaturité du réseau synaptique. On peut émettre deux hypothèses concernant un défaut d'élégage des synapses : 1) les cellules microgliales n'exprimant pas CX3CR1 ont un phénotype particulier associé à un défaut de fonctions permettant la phagocytose, 2) le recrutement retardé des cellules microgliales aux sites synaptiques retarde la phagocytose des synapses affaiblies. Par ailleurs, la voie classique du complément permettrait à la microglie d'interagir

avec les synapses en développement (Schafer et al., 2012) et un défaut de la voie de signalisation C3/CR3 perturbe la reconnaissance et l'élimination sélective des synapses incorrectes par la microglie entraînant des défauts d'activité des réseaux neuronaux. Ainsi, l'élimination des synapses incorrectes au cours du développement post-natal pourrait reposer sur une base moléculaire établie par C3 et CR3.

Les cellules microgliales pourraient également moduler la maturation fonctionnelle de synapses via une libération de facteurs solubles promouvant cette action. Des études ont montré que la microglie produit un vaste répertoire de facteurs tels que les neurotrophines ainsi que des cytokines ayant des activités neurotrophiques (pour revue (Deverman and Patterson, 2009)). Dans la suite de cette partie, je vais présenter quelques hypothèses pouvant être formulées concernant l'activité sécrétoire des cellules microgliales sur la maturation synaptique.

Il a récemment été montré que le BDNF libéré spécifique par les cellules microgliales facilite la formation des synapses induite par des processus d'apprentissage chez l'adulte (Parkhurst et al., 2013). Le BDNF est une neurotrophine impliquée dans la survie neuronale, la différenciation et la plasticité. Parkhurst et collaborateurs suggèrent que le BDNF pourrait être libéré par les prolongements microgliaux de façon localisée et dépendante de l'activité synaptique. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que de l'ATP pourrait être libéré par les synapses actives et cet ATP recruterait localement les prolongements microgliaux (Davalos et al., 2005) et activerait les récepteurs purinergiques microgliaux P2X₄. La mise en jeu des P2X₄ déclencherait la libération du BDNF comme cela a déjà été observé au niveau de la moelle épinière dans un contexte de douleurs hypersensibles après une lésion (Trang et al., 2009; Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008). Ainsi, le BDNF microglial modulerait un groupe de connections synaptiques impliqué dans l'apprentissage. Le BDNF microglial est donc une molécule candidate pertinente dans la consolidation et la maturation fonctionnelle des synapses au cours du développement. De plus, il a été montré que le BDNF pourrait jouer un rôle dans la régulation des sous-unités des NMDA-R exprimés par des neurones en culture (Glazner and Mattson, 2000). Dans ce modèle de culture cellulaire, le BDNF faciliterait le switch des NMDA-R contenant la sous-unité GluN2B vers des NMDA-R contenant GluN2A. On peut donc supposer que le BDNF pourrait jouer un rôle équivalent lors de la maturation des synapses

thalamocorticales dans les champs de tonneaux où un tel switch des sous unités NMDA a été observé au cours du développement (Lu et al., 2001). Si l'on accepte cette hypothèse, nos travaux suggèrent fortement que le BDNF aurait une origine microgliale puisque ce switch des sous-unités NMDA est retardé chez les souris $CX3CR1^{eGFP/eGFP}$ dont le recrutement microglial est retardé (Hoshiko et al., 2012). L'étude de la maturation des propriétés de la synapse thalamocorticale chez des souris issues d'un croisement entre des souris $CX3CR1^{Cre/+}$ et des souris $BDNF^{flox/flox}$ permettrait d'évaluer l'implication du BDNF microglial dans la maturation synaptique.

Une autre molécule qui pourrait être impliquée dans la maturation fonctionnelle des synapses est le TNFalpha. En effet, les cellules microgliales influencent également la concentration de TNFalpha présente dans le milieu soit directement via une libération de TNFalpha soit indirectement via une stimulation des astrocytes (Bezzi et al., 2001). Il a été montré que le TNFalpha est impliqué dans différentes fonctions neuronales telles que la transmission et la plasticité synaptique (pour revue (Poon et al., 2013)). Le TNFalpha en agissant sur les TNFR1 neuronaux augmente la transmission synaptique excitatrice via une régulation de l'expression à la membrane des récepteurs post-synaptiques AMPA-R (Beattie et al., 2002; Stellwagen and Malenka, 2006)(Figure 24). Cet effet du TNFalpha affecte préférentiellement les AMPA-R sans GluA2 (Stellwagen et al., 2005). De plus, il a été observé TNFalpha régule négativement la transmission inhibitrice en favorisant l'endocytose des récepteurs GABA_A et diminuant ainsi l'expression à la membrane de ces récepteurs (Stellwagen et al., 2005) (Figure 24). Par conséquent, le TNFalpha influence les neurotransmissions excitatrice et inhibitrice via une régulation des récepteurs adressés à la membrane post-synaptique.

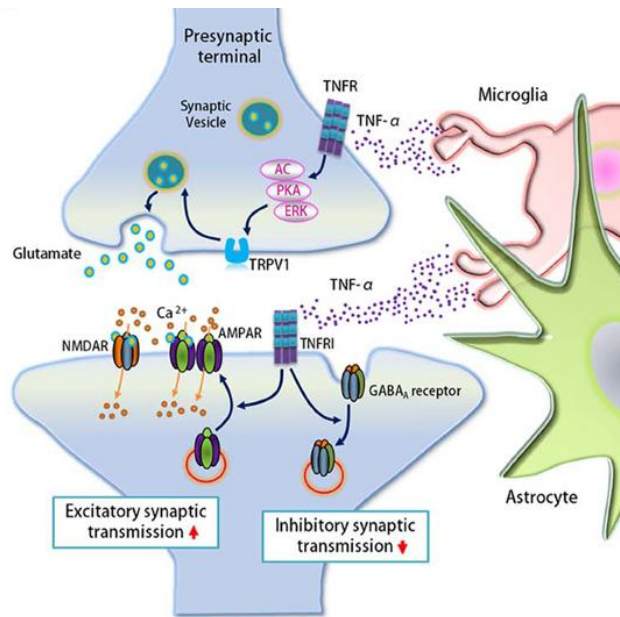


Figure 24: Le TNF α glial régulant la neurotransmission

(Poon et al., 2013)

Les signaux TNF α dérivant des cellules gliales (microglies et astrocytes) via les TNFR1 pré- et post-synaptique régule la libération pré-synaptique des neurotransmetteurs et l'expression à la membrane post-synaptique des AMPA-R et GABA $_A$ -R.

L'interleukine IL1 β pourrait également moduler l'efficacité synaptique. L'IL1 β est exprimée de façon constitutive en conditions physiologiques par les cellules microgliales et son expression augmente lors de conditions pathologiques. Néanmoins, cette libération modérée d'IL1 β en conditions physiologiques module des fonctions neuronales importantes telles que des fonctions cognitives et la plasticité synaptique à long terme (Rogers et al., 2011). De plus, il a été montré qu'IL1 β régule sélectivement la phosphorylation et l'expression à la membrane des AMPA-R au niveau des neurones hippocampiques (Lai et al., 2006). En conditions pathologiques, il a également été observé que l'augmentation de l'expression d'IL1 β inhibe l'expression de transporteur du glutamate, GLAST/EAAT1, ce qui réduit la transmission excitatrice au niveau du cervelet (Mandolesi et al., 2013). En revanche, au cours du développement prénatal, l'activation des cellules microgliales par LPS ou un défaut d'expression microgliale de la protéine de signalisation DAP12 augmente la contribution des AMPA-R chez les adultes (Roumier et al., 2008). Dans cette étude, il a été montré que les cellules microgliales sur-exprimaient IL1 β , IL6 et NOS2. Ainsi, suivant le contexte, l'augmentation de la concentration d'IL1 β dans le parenchyme pourrait favoriser ou empêcher l'adressage à la membrane des AMPA-R. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation du

ratio AMPA/NMDA de la synapse thalamocorticale lorsque les cellules microgliales sont recrutées aux synapses. On peut donc émettre l'hypothèse que dans nos conditions d'étude, les cellules microgliales libèrent de l'IL1 β favorisant l'expression fonctionnelle des AMPA-R à la membrane.

Une autre famille de cytokine pourrait jouer un rôle dans la régulation fonctionnelle des synapses au cours du développement : les TGF β es. Bien que l'expression et la libération de TGF β es par les cellules microgliales soient connues lors de conditions pathologiques (Lehrmann et al., 1998; Morgan et al., 1993), l'expression de cette cytokine par la microglie et les fonctions de celle-ci au cours du développement reste à démontrer. Cependant, il a récemment été montré que des cellules microgliales mises en culture à partir de souris P2 expriment et libèrent 10 fois plus de TGF β 1 que les cultures astrocytaires pures (Welser-Alves and Milner, 2013). Ainsi, les cellules microgliales pourraient libérer du TGF β 1 au cours du développement. De plus, il a été mis en évidence que cette cytokine était exprimée au cours du développement embryonnaire et postnatal par hybridation *in situ* (Deverman and Patterson, 2009) et les TGF β es régulent plusieurs fonctions neuronales. En effet, il a été montré que le TGF β 1 facilite la communication synaptique entre les neurones sensoriels et les neurones motoneurones chez un mollusque marin, l'aplysie, (Zhang et al., 1997). Le TGF β 1 induit une augmentation à long terme de l'excitabilité neuronale en activant la signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui joue un rôle important dans la plasticité neuronale telle que la LTP chez l'aplysie (Chin et al., 2006). Par ailleurs, TGF β 1 augmenterait l'expression des sous-unités des AMPA-R (GluA2) et des NMDA-R (GluN1 et GluN2A/B) de neurones hippocampiques en culture (Bae et al., 2011). Des effets analogues ont été observés avec un traitement de 24 heures de neurones hippocampiques en culture par le TGF β 2. Dans ces conditions, TGF β 2 augmente l'amplitude des courants évoqués post synaptiques, diminue la dépression synaptique à court terme des courants évoqués et augmente l'amplitude et la fréquence des courants post-synaptiques miniatures (Fukushima et al., 2007). De plus, le mutant TGF β 2 KO présente des défauts de transmission synaptique et d'activité de réseau dans le complexe de pré-Bötzinger, une région du tronc cérébral importante dans la génération du rythme respiratoire (Heupel et al., 2008). Des enregistrements électrophysiologiques mettent en évidence des défauts de la neurotransmission excitatrice et inhibitrice qui résulteraient d'un

défaut de l'organisation du compartiment présynaptique. Ainsi, TGFbeta1 et 2 jouent un rôle dans plusieurs fonctions synaptiques (pour revue (Krieglstein et al., 2011; Poon et al., 2013)). Par ailleurs, il a récemment été montré que les astrocytes libèrent du TGFbeta au cours du développement ce qui induit l'expression de C1q au niveau des RGCs (retinal ganglion cells), C1q étant par la suite identifié par les cellules microgliales comme un marqueur de synapses incorrectes à éliminer (Bialas and Stevens, 2013). Par conséquent, le TGFbeta est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions neuronales et son expression pourrait moduler la force synaptique.

En conclusion, les cellules microgliales modulent la maturation des synapses via des mécanismes de phagocytoses et une libération de facteurs favorisant l'expression à la membrane des récepteurs post-synaptiques. Dans notre étude, le défaut de maturation des synapses thalamocorticales observées chez les mutants CX3CR1 pourrait résulter soit d'un défaut des fonctions microgliales soit du recrutement retardé de ces cellules aux synapses. Afin de tester ces hypothèses, des expériences de déplétion microgliale via l'utilisation de liposome clodronate ou d'anticorps anti-Mac1-saporine sont en cours pour déterminer si les défauts de maturation observés chez les mutants CX3CR1 résultent uniquement de l'absence transitoire des cellules microgliales.

5. Les astrocytes : des intermédiaires dans la communication neurone-microglie ?

Les astrocytes constituent un autre type de cellules gliales et il a été montré que ces cellules interagissent aussi avec les synapses et influencent leurs activités. Nous pouvons donc suggérer que les effets microgliaux que nous avons observé sur la maturation de la synapse thalamocorticale au cours du développement post-natal nécessitent une intervention des astrocytes comme intermédiaires dans la communication neurone-microglie.

Lors de leur première description par C. Weigert en 1985, les astrocytes sont décrits comme des structures d'échafaudage supportant les neurones dans le cerveau et remplissant les espaces entre les neurones (pour revue (Sheridan and Murphy, 2013)). Puis, Golgi leur attribue des fonctions nutritives

en captant les nutriments via les pieds astrocytaires apposés aux vaisseaux sanguins et approvisionnant ainsi les neurones en nutriments. Cependant, des études récentes placent les astrocytes comme étant des cellules ayant des rôles encore plus importants que ceux de soutien et de nutrition. En effet, les astrocytes jouent un rôle important dans la régulation de la connectivité synaptique. Dans le SNC, les astrocytes contactent physiquement les synapses et le terme de « synapse tripartite » a été proposé (Figure 25). Une telle association entre les astrocytes et les synapses assure une régulation de l'homéostasie des ions K^+ , des concentrations de neurotransmetteurs ainsi que du pH extracellulaire (pour revue (Eroglu and Barres, 2010)). De plus, les astrocytes modulent les propriétés synaptiques en libérant des neuromodulateurs tels que l'ATP, le glutamate, la D-sérine,... Cette libération de molécules neuro-actives dépend de l'activité synaptique et est corrélée à une augmentation de l'activité calcique astrocytaire (pour revue (Perea et al., 2009)).

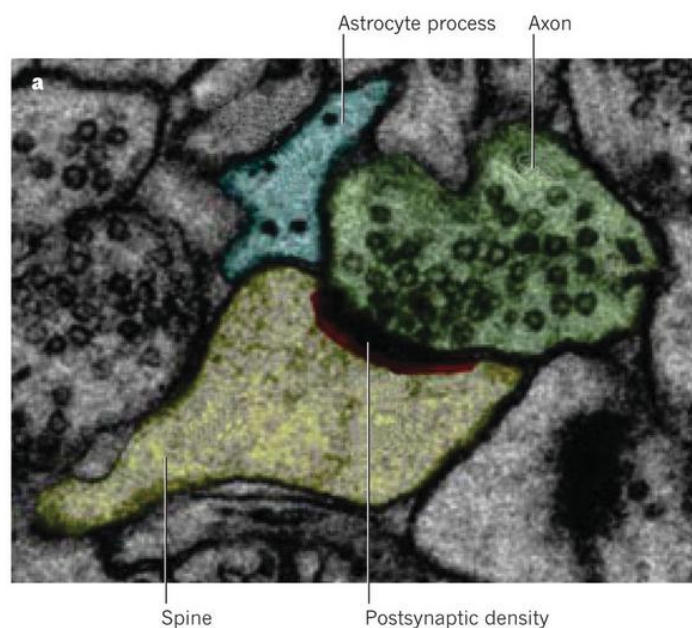


Figure 25: La synapse tripartite

(d'après (Witcher et al., 2007))

Image de microscopie électronique montrant la synapse tripartite dans l'hippocampe. Un prolongement astrocytaire (en bleu) entoure une région synaptique. L'axone d'un neurone (en vert) et l'épine dendritique (en jaune) constitue respectivement les éléments post- et pré-synaptique et on note que la densité post-synaptique est marquée en rouge sur l'image.

Dans le cortex somatosensoriel, la distribution des astrocytes change au cours du développement post-natal suggérant des fonctions particulières et spécifiques à cette période du développement. En effet, l'analyse de la souris *Aldh1L1-GFP*, dans laquelle les astrocytes expriment

la GFP, met en évidence cette distribution spécifique. A P2, les astrocytes sont distribués de façon homogène dans la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire (Figure 26). Puis, lors de la ségrégation des axones thalamocorticaux vers P3-4, les astrocytes s'accumulent dans les tonneaux de la couche 4. Ainsi, la distribution des astrocytes suit celle des fibres thalamiques lors des premières semaines de développement post-natal. Cependant, chez l'adulte, les astrocytes se répartissent de façon homogène dans la couche 4 du cortex somatosensoriel. Cette localisation transitoire des astrocytes au sein des tonneaux a également été observée par immunohistochimie (Cooper and Steindler, 1986; Mangin et al., 2012).

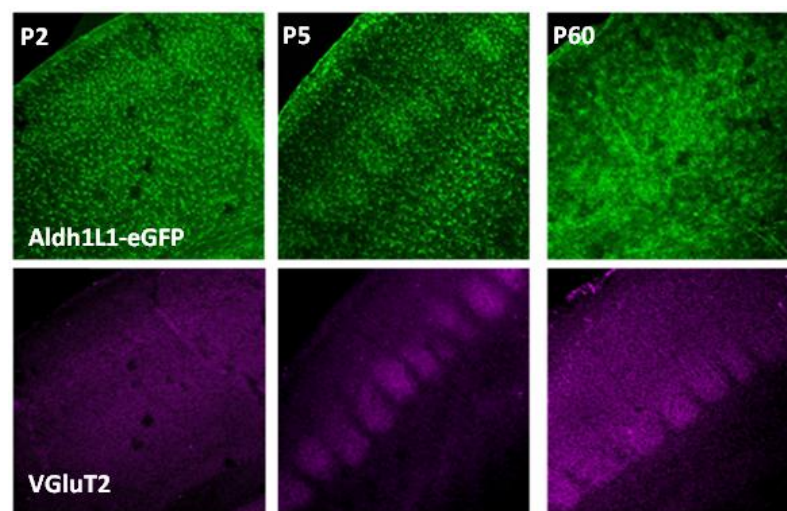


Figure 26: Distribution des astrocytes dans la couche 4 du cortex somatosensoriel au cours du développement post-natal et chez l'adulte

L'analyse de souris Aldh1L1-eGFP âgées de 2, 5 et 60 jours post-nataux permet de suivre par fluorescence la localisation des astrocytes. Un immuno-marquage des fibres thalamocorticales par un anticorps anti-VGluT2 révèle les tonneaux de la couche 4.

On peut donc supposer que les effets de la microglie que nous avons observés sur la maturation de la synapse thalamocorticale font intervenir aussi les astrocytes. Tout d'abord, il est possible que les astrocytes, modulés par l'activité synaptique, influencent les fonctions microgliales. En effet, il est admis que les astrocytes sont des senseurs de l'activité synaptique et qu'ils libèrent des facteurs solubles appelés gliotransmetteurs pouvant influencer l'activité synaptique mais aussi microgliale (Perea et al., 2009). Étant donné que les astrocytes sont présents au sein des tonneaux avant les cellules microgliales lors du développement post-natal, on peut émettre l'hypothèse que les

astrocytes participent au recrutement de la microglie à l'intérieur des tonneaux via une libération d'ATP ou de glutamate.

Mais, les astrocytes peuvent aussi contrôler le phénotype des cellules microgliales et certaines de leurs fonctions. En culture, il a été montré que des cytokines (M-CSF, GM-CSF et TGFβ) libérées par les astrocytes promeuvent la ramification des cellules microgliales ainsi que l'expression de canaux potassiques voltage-dépendants (Liu et al., 1994; Schilling et al., 2001). Nos résultats montrent une expression de canaux potassiques voltage-dépendants et une ramification de la microglie lorsqu'elle envahit les tonneaux où se concentrent les fibres thalamiques et les astrocytes (Arnoux et al., 2013). Ces deux phénomènes pourraient être liés à une libération de facteurs astrocytaires. De plus, il a été montré *in vitro* que les astrocytes modulent négativement la phagocytose des plaques séniles médiée par la microglie via une libération de facteurs solubles (DeWitt et al., 1998). On peut émettre l'hypothèse que les astrocytes régulent également cette activité de phagocytose *in vivo* et participent éventuellement à l'élimination des synapses au cours du développement. Par ailleurs, les astrocytes régulent l'état d'activation des cellules microgliales lors de conditions inflammatoires en diminuant la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Min et al., 2006). Par conséquent, on peut supposer que l'état d'activation et les fonctions associées à l'activation microgliale sont régulés par des facteurs astrocytaires. Ainsi, plusieurs fonctions microgliales seraient régulées par des facteurs astrocytaires et l'implication de ces échanges au cours du développement reste à déterminer.

D'autre part, des facteurs microgliaux peuvent réguler l'activité des astrocytes. Il a notamment été observé que les cellules microgliales modulent la gliotransmission assurée par les astrocytes. En effet, Pascual et collaborateurs ont montré que les cellules microgliales influencent l'activité synaptique via une interaction avec les astrocytes (Pascual et al., 2012) (Figure 27). Dans cette étude, la microglie, activée par LPS, libère de l'ATP activant les récepteurs purinergiques astrocytaires P2Y₁ et déclenchant une libération de glutamate par les astrocytes qui module la fréquence des courants synaptiques via l'activation des mGluR5 pré-synaptiques.

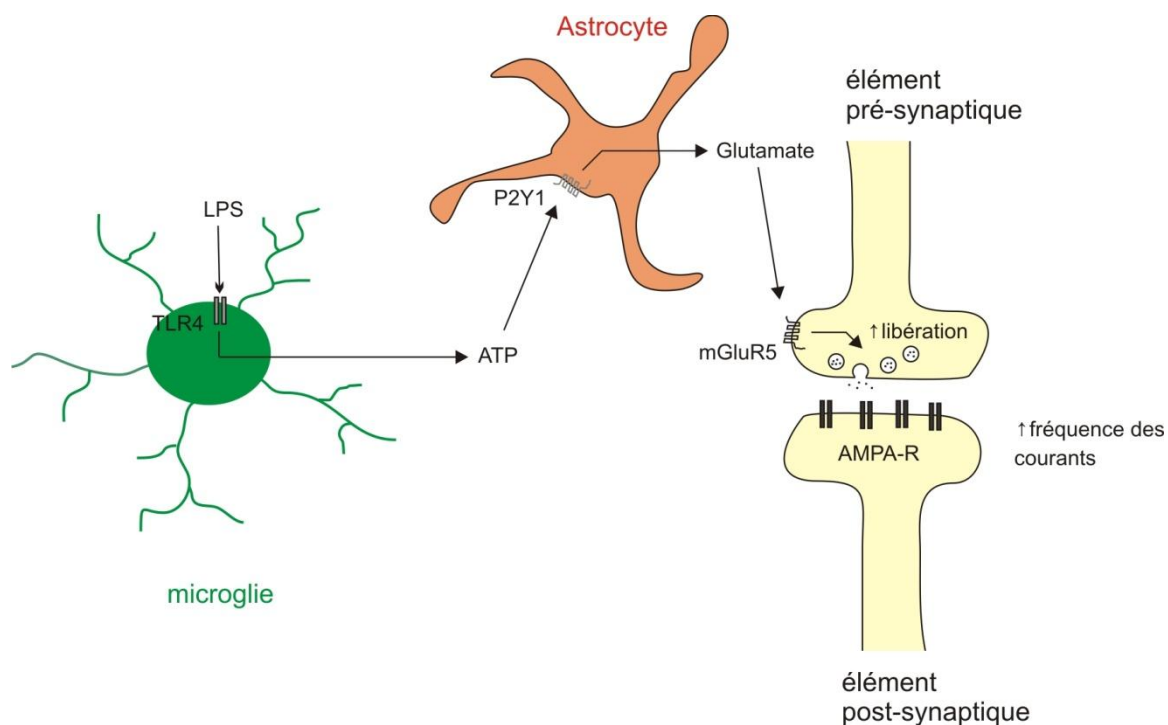


Figure 27: Schéma de la modulation des fréquences des EPSCs lors d'application de LPS
(adapté de (Pascual et al., 2012))

Par ailleurs, une étude menée sur des cellules en culture indique que les facteurs TNFalpha et IL1beta microgliaux inhibent l'expression de la connexine-43, une protéine des jonctions communicantes (Même et al., 2006). La diminution de l'expression de connexine-43 par les astrocytes entraîne un découplage du réseau astrocytaire soit une rupture de la communication intercellulaire entre les astrocytes ce qui induit une perturbation de leurs fonctions. Un défaut d'expression de cette connexine entraîne des défauts des fonctions sensorielles et de plasticité synaptique dans le cortex somatosensoriel (Han et al., 2014). De plus, TNFalpha contrôle l'activation des récepteurs P2Y₁ et par conséquent module l'exocytose de glutamate par les astrocytes responsable de la gliotransmission (Domercq et al., 2006). Ce TNFalpha pourrait provenir des cellules microgliales. Par conséquent, les cellules microgliales contrôlent certaines fonctions astrocytaires dont les interactions neurone-astrocyte.

L'existence de communications entre les différents types cellulaires présents dans le SNC soit les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales a permis de proposer le terme de « synapse quadripartite » (Schafer et al., 2013) où ces cellules sont des partenaires non-exclusifs. De plus, les

cellules microgliales et les astrocytes produisent des facteurs trophiques et des cytokines identiques ce qui suggère des actions synergiques et/ou compensatoires afin de ré-établir une certaine balance entre les facteurs. Ces actions visent à assurer l'homéostasie cérébrale nécessaire aux activités neuronales.

6. Perspectives

Les cellules microgliales participent à la maturation du réseau synaptique au cours du développement mais leurs modes d'actions ne sont toujours pas clairement déterminés : élimination synaptique et/ou libération de facteurs ? De plus, les mécanismes mis en jeu pourraient être différents en fonction de la structure étudiée, de l'état de maturation du réseau,...

Par ailleurs, des changements de propriétés des cellules microgliales pourraient être associés à troubles neurodéveloppementaux.

En particulier, il a été montré qu'un défaut des fonctions microgliales au cours du développement contribue à des défauts de circuiterie associés à l'autisme. Le défaut d'élimination synaptique lors du développement post-natal observé dans l'hippocampe des animaux CX3CR1^{eGFP/eGFP} induit un défaut de maturation synaptique (Paolicelli et al., 2011) qui conduirait à des anomalies de structures et de fonctions des réseaux synaptiques chez l'adulte (Zhan et al., 2014). Ces défauts synaptiques se traduisent par une connectivité fonctionnelle réduite entre différentes aires cérébrales et des défauts d'interactions sociales chez ces souris rappelant les troubles de l'autisme chez l'homme. Par ailleurs, les enfants souffrant d'autisme présentent une forte neuro-inflammation dans différentes aires cérébrales qui serait due à une activation anormale des cellules microgliales et des astrocytes (pour revue (Rodriguez and Kern, 2011)). Cette neuro-inflammation présente chez les enfants autistes se caractérise par une activation de l'iNOS et une augmentation de l'expression de cytokines telles que TNFalpha, IL1beta, IL8 et IFNgamma libérées par les cellules microgliales et/ou les astrocytes activés. Cette inflammation chronique contribuerait à la perte des connections synaptiques et la mort des neurones conduisant à la faible connectivité cérébrale présente chez les patients autistiques.

Les cellules microgliales seraient également en cause dans le syndrome de Rett, un trouble neurodéveloppemental lié au chromosome X (pour revue (Derecki et al., 2013)). Le syndrome de Rett est associé à une mutation du gène *MECP2* (methyl-CpG binding protein) qui régule la transcription de nombreux gènes. Les patients atteints de cette maladie ont des troubles psychomoteurs, des comportements altérés, un développement du langage défectueux. Il a été proposé que le défaut de *Mecp2* microglial soit une des principales causes de ce syndrome développemental. En effet, une transplantation de moelle osseuse de type sauvage (source de microglies sauvages) chez souris n'exprimant pas *Mecp2* bloque la progression de la maladie et améliore les symptômes (Derecki et al., 2012). L'observation *in vitro* des cellules microgliales n'exprimant pas *Mecp2* indique que ces cellules ont une capacité diminuée de phagocyter. Il a été suggéré que l'élimination incomplète des débris apoptotiques par la microglie soit responsable de la mise en place et de la progression du syndrome de Rett.

De plus, un dysfonctionnement des cellules microgliales pourrait également être associé à des maladies neuropsychiatriques telles que des troubles comportementaux obsessionnels et compulsifs. Les souris mutantes homozygotes pour la perte de fonction de *Hoxb8*, un gène exclusivement exprimé par la microglie dans le cerveau, présente un toilettage excessif et pathologique conduisant à la perte des poils et induisant des lésions de la peau (Chen et al., 2010). Les gènes *Hox* sont des éléments clés dans l'établissement de l'identité axiale du corps chez l'embryon. Cependant, ces gènes ont aussi des rôles dans la formation du système hématopoïétique et *Hoxb8* jouerait un rôle dans la maintenance et la différenciation des précurseurs des cellules myéloïdes, source de microglies. Ainsi, une mutation de *Hoxb8* affecte les fonctions des cellules microgliales et est à l'origine de troubles comportementaux.

Les cellules microgliales semblent être impliquées dans le développement de plusieurs pathologies survenant au cours du développement telles que l'autisme, le syndrome de Rett, les troubles comportementaux... L'étude des propriétés des cellules microgliales dans ces pathologies indique que des mutations des cellules microgliales ont des conséquences neurologiques. De plus, des dérégulations ou des activations du système immunitaire pourraient, en activant les cellules microgliales, avoir également des conséquences neurologiques. Par exemple, l'activation des cellules

microgliales par injections de LPS dans l'hippocampe de rats âgées de 7 jours cause des défauts comportementaux chez les rats adultes caractéristiques de la schizophrénie (Zhu et al., 2014). Ces résultats indiquent que la manipulation des cellules microgliales modulerait le développement de la schizophrénie. Par conséquent, la manipulation des cellules microgliales et le contrôle de leurs propriétés au cours du développement pourraient permettre de proposer des solutions thérapeutiques visant à réduire les symptômes associés à ces pathologies.

Annexe

Revue Médecine/Science : La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales

Etienne Audinat & Isabelle Arnoux

Médecine/Science février 2014;30:153-9

Résumé

Le développement de nouveaux modèles animaux et de nouvelles méthodes d'investigation fonctionnelle a radicalement changé notre vision de la physiologie des cellules de la microglie. Ces cellules qui sont les macrophages résidents du système nerveux central apparaissent ainsi comme très dynamiques et capables de réagir rapidement aux modifications de leur environnement. Les recherches actuelles indiquent en particulier que ces cellules établissent des contacts physiques avec les synapses neuronales qu'elles peuvent éliminer ou dont elles peuvent influencer l'activité en libérant des médiateurs spécifiques. Nous présentons ici les évidences expérimentales qui ont permis de mettre à jour ces interactions non seulement en conditions pathologiques mais aussi en conditions physiologiques et notamment au cours du développement normal du cerveau. L'existence d'une communication bi-directionnelle entre synapses et microglie éclaire d'un jour nouveau notre compréhension du fonctionnement cérébral et devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre systèmes immunitaires et nerveux.

Summary

Microglia: Immune cells sculpting and controlling neuronal synapses

The development of new animal models and functional analysis methods has dramatically changed our understanding of the physiology of microglial cells. These cells which are the resident macrophages of central nervous system have the ability to adapt rapidly to subtle changes of their environment. Recent findings indicate in particular that they can establish contacts with neuronal synapses that they can eliminate and modulate by releasing specific mediators. Here we review the experimental observations that have revealed the occurrence of these interactions not only in pathological conditions but also in

the healthy brain and in particular during normal brain development. The discovery of bi-directional communications between synapses and microglia sheds a new light on our understanding of brain functioning and should allow a better understanding of brain functioning and of interactions between immune and nervous systems.

Texte principal

Les cellules gliales représentent une population qualitativement hétérogène et quantitativement importante dans le système nerveux central (SNC). Elles comprennent les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules NG2 et les cellules microgliales. Ces cellules jouent un rôle important dans l'homéostasie cérébrale en maintenant les gradients ioniques qui permettent la propagation des potentiels d'actions, en pompant les excès de neurotransmetteurs libérés ou encore en assurant une fonction réparatrice lors de lésions ou d'infections (1). Mais les 20 dernières années ont vu naître l'idée que la glie pouvait prendre une part plus active au traitement de l'information dans le SNC. En effet, les cellules gliales expriment des récepteurs et des transporteurs membranaires leur permettant de suivre l'activité neuronale, elles peuvent réaliser une forme d'intégration de cette activité et enfin elles peuvent libérer des médiateurs capables de moduler l'activité neuronale (1). Dans le cas des astrocytes, le terme de synapse tripartite a été proposé pour rendre compte de cette étroite association fonctionnelle entre les éléments neuronaux pré- et post-synaptiques et les prolongements astrocytaires bordant les synapses (2).

La microglie représente un cas un peu particulier parmi les cellules gliales dans la mesure où elle n'a pas la même origine embryologique (37) (Voir l'article de Legendre & Le Corronc dans ce numéro). De fait, ces macrophages résidents du SNC orchestrent les réactions inflammatoires consécutives à des lésions du SNC ou à certaines maladies neurodégénératives et elles influencent l'issue de ces pathologies (3;4). Mais des études de plus en plus nombreuses indiquent que la microglie pourrait aussi être impliquée dans des troubles psychiatriques comme certains comportements compulsifs, syndromes autistiques, démences préséniles et dans la schizophrénie (5;6). Ces observations suggèrent que ces cellules auraient des fonctions autres que celles attribuées classiquement à des cellules

immunitaires, notamment en régulant le développement et l'activité des réseaux neuronaux et synaptiques. Le développement de nouveaux modèles animaux et de nouvelles méthodes d'investigation fonctionnelle indiquent clairement que la microglie est loin d'être inactive dans les conditions physiologiques. De façon analogue aux astrocytes, les cellules microgliales sont sensibles à l'activité neuronale et elles peuvent influencer le réseau neuronal par différentes formes d'interactions et de voies de signalisations (7). Nous présentons dans cette revue les données de la littérature récente qui ont amené certains auteurs à proposer la notion de synapse quadri-partite (8), dans laquelle la microglie serait le quatrième partenaire.

Activation des cellules microgliales et modifications synaptiques en conditions pathologiques

En tant que macrophages résidents du SNC, les cellules microgliales ont surtout été étudiées pour leurs rôles en conditions pathologiques. Elles sont très probablement impliquées dans toutes les pathologies cérébrales et sont souvent les premières à être mobilisées dès l'apparition des premiers signes de la maladie. On sait depuis longtemps que leur morphologie caractérisée par un petit corps cellulaire et de fins prolongements en conditions physiologiques, évolue vers des formes moins ramifiées avec un corps cellulaire plus grand ou des formes typiquement amiboïdes, lorsqu'elles sont mobilisées dans une pathologie (*Figure 1*) (37). Mais ces changements morphologiques ne représentent que la partie visible de l'iceberg. En effet, le recrutement des cellules microgliales en réponse à un message d'alerte s'accompagne d'une modification importante de leur phénotype, appelée activation microgliale, incluant des modifications d'expression de nombreuses protéines, la capacité à libérer de nombreux facteurs pro- et anti-inflammatoires, la capacité à se mouvoir, à phagocyter les débris cellulaires et à proliférer. Cette activation microgliale n'est pas un mécanisme en tout ou rien : elle est progressive et dépend du type de pathologie et du contexte dans lequel elle apparaît. Cette fine détection du changement de l'environnement permet à la microglie d'adopter de nombreux phénotypes dont dépendent les différentes fonctions de ces cellules (3;4).

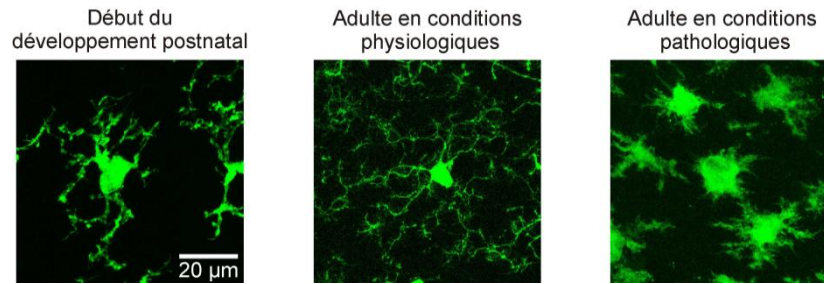


Figure 1 : Les différents visages de la microglie. L'utilisation de souris transgéniques dans lesquelles seule la microglie exprime une protéine fluorescente permet de révéler facilement les changements morphologiques de ces cellules au cours du développement normal du cerveau ou dans des conditions pathologiques. Le grossissement est le même pour les trois images.

Parmi les fonctions de la microglie activée, on sait déjà depuis longtemps que ces cellules peuvent prendre la place de synapses sur le corps cellulaire de neurones lésés. Ce processus appelé en anglais "synaptic stripping" (déshabillage synaptique) a été observé en particulier au niveau des motoneurones du nerf facial après lésion de leurs axones (9). Il ne semble pas se développer dans toutes les pathologies, (par exemple, il n'est pas présent dans les maladies à prions) (10), mais a été néanmoins observé dans d'autres régions du SNC que le noyau du nerf facial, telles que le néocortex (11).

La microglie activée peut aussi influencer l'activité synaptique en libérant des médiateurs reconnus par les neurones. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la douleur neuropathique et de l'influence de la microglie sur la transmission synaptique inhibitrice dans la moelle épinière. En effet, l'apparition de douleurs consécutives à la lésion de fibres nerveuses périphériques s'accompagne d'une activation microgliale dans la partie de la moelle épinière où sont traitées les informations sensorielles, la corne dorsale (*Figure 2A*). Cette activation se caractérise en particulier par la mise en jeu d'un récepteur purinergique appelé P2X4 (12;13;38) qui est activé par l'adénosine triphosphate (ATP) libérée en excès dans les conditions pathologiques. L'activation de ce récepteur dans la microglie entraîne la production d'un facteur trophique, le BDNF (brain derived neurotrophic factor) qui se lie à son récepteur TrkB (tropomyosin receptor kinase B) localisé à la membrane des neurones de la corne dorsale. La mise en jeu de TrkB va induire un changement dramatique dans le fonctionnement des synapses inhibitrices de la corne dorsale, transformant ces jonctions en synapses excitatrices (*Figure*

2B). L'hyperexcitabilité du réseau neuronal qui en résulte serait à l'origine des douleurs neuropathiques (14).

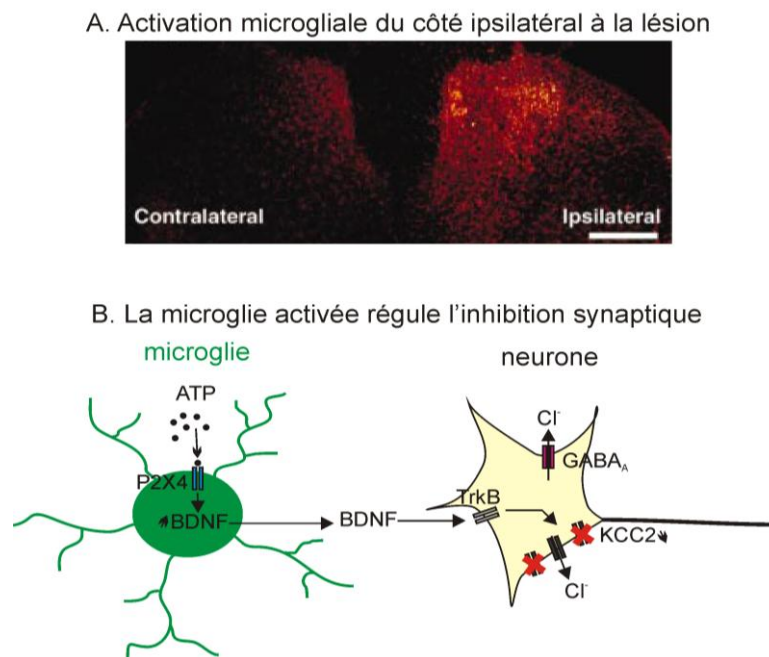


Figure 2 : Microglie et douleur neuropathique. A) Illustration de l'activation microgliale dans la corne dorsale du côté ipsilatéral à la lésion périphérique. La microglie est marquée avec un anticorps spécifique (adaptée de [13]). B) Mécanismes liant l'activation microgliale à l'hyperexcitabilité du réseau neuronal de la corne dorsale. La lésion d'un nerf périphérique induit l'activation de la microglie de la corne dorsale. Cette activation se traduit en particulier par une expression de novo du récepteur à l'ATP P2X4. La mise en jeu de ce récepteur induit une augmentation de la production de BDNF par la microglie. La liaison du BDNF à son récepteur TrkB exprimé à la membrane des neurones induit une diminution d'expression d'une autre protéine de la membrane des neurones, un transporteur des ions chlore nommé KCC2 (potassium chloride co-transporter 2), qui va entraîner une modification du fonctionnement des synapses inhibitrices. En effet, les récepteurs synaptiques activés par les neurotransmetteurs inhibiteurs comme le GABA ou la glycine sont des canaux membranaires perméables au chlore. La baisse d'expression de KCC2 se traduit par une élévation de la concentration de chlore dans le neurone et donc à une inversion du mouvement des ions chlores lors de la mise en jeu des synapses inhibitrices : cet ion chargé négativement sort alors de la cellule, au lieu d'y entrer, et ceci tend à dépolariser et donc à exciter les neurones, au lieu de les inhiber. Les synapses inhibitrices sont devenues excitatrices et cette hyperexcitabilité du réseau de la corne dorsale est à l'origine des douleurs neuropathiques.

Le BDNF n'est qu'un des nombreux médiateurs pouvant être libérés par la microglie activée et influencer le devenir des neurones dans les conditions pathologiques (mort, survie), mais aussi de réguler l'activité synaptique via la mise en jeu de voies de signalisation spécifiques dont certaines font intervenir un troisième partenaire. C'est le cas par exemple du $\text{TNF}\alpha$ (tumor necrosis factor alpha) qui

dans certaines conditions pathologiques pourrait exercer son influence sur les neurones de façon indirecte en activant son récepteur TNFR1 exprimé par d'autres cellules gliales, les astrocytes (15;16). Comme les neurones, les astrocytes ont la capacité de libérer du glutamate qui peut avoir des effets neurotoxiques mais qui peut aussi moduler l'activité neuronale (15;17;18). Nous verrons plus loin un autre exemple de la mise en jeu de cette triade microglie-astrocyte-neurone.

La microglie en conditions physiologiques : pas si calme que cela !

Une rupture majeure dans notre compréhension de la physiologie de la microglie a eu lieu il y a un peu moins de 10 ans lorsque deux équipes ont observé le comportement de la microglie directement dans le cerveau de souris saines (19;20). Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé des souris transgéniques dans lesquelles seules les cellules microgliales expriment une protéine fluorescente, la GFP (green fluorescent protein). Ils ont placé ces animaux anesthésiés sous un microscope biphotonique permettant l'observation de la fluorescence à l'intérieur du cerveau. Ils ont alors noté que les prolongements fins de la microglie dans le néocortex sont en perpétuel mouvement et explorent un domaine d'environ 100 μm de diamètre autour du corps cellulaire immobile de la microglie. Ainsi, contrairement à l'idée qui a prévalu pendant longtemps, la microglie en conditions physiologiques n'est pas quiescente, en attente de l'apparition d'un signal de danger qui l'activerait. Elle est au contraire très dynamique et explore en permanence son environnement en allongeant et en rétractant ses prolongements à une vitesse de l'ordre de quelques micromètres par minute. A quoi peuvent servir ces mouvements ? Une hypothèse est qu'ils permettent à la microglie d'aller à la recherche des signaux de danger afin de détecter le plus rapidement possible une rupture de l'homéostasie cérébrale. En effet, ces mouvements apparemment aléatoires deviennent tout à fait ordonnés lors de l'apparition d'une lésion : la plupart des prolongements des microglies au voisinage de la lésion convergent alors vers celle-ci et l'entourent rapidement.

Les signaux régulant cette motilité microgliale sont certainement multiples mais là encore l'ATP joue un rôle important puisqu'il régule la cinétique des mouvements spontanés et orientés vers une lésion. Le récepteur microglial mis en jeu cette fois est le récepteur purinergique P2Y₁₂ (20;21). Mais

d'autres signaux sont également impliqués, comme l'adénosine qui régule la rétraction des prolongements microgliaux (22) et la dynamique de ces mouvements sensible à l'activité synaptique du réseau neuronal local (23;24) (même si tous les auteurs ne s'accordent pas sur ce point (25)). Or, dans les conditions physiologiques, la concentration des transmetteurs libérés lors de l'activité synaptique est très contrôlée de façon à éviter que ceux-ci ne s'échappent de la fente synaptique et que leur concentration dans le milieu extracellulaire n'augmente trop de façon prolongée. Si les mouvements de la microglie sont sensibles à l'activité synaptique, il est donc possible que les prolongements microgliaux entrent en contact direct avec les synapses et que la dynamique de ces processus reflète au moins en partie la dynamique des interactions physiques entre microglie et synapses. Cette hypothèse a effectivement pu être confirmée lors d'observations en microscopie biphotonique et électronique d'animaux transgéniques dans lesquels la microglie et les neurones expriment des protéines fluorescentes distinctes (23;26). Ces expériences ont montré d'une part que les prolongements microgliaux en mouvement forment à leur extrémité des contacts directs avec les éléments pré- et post-synaptiques de neurones corticaux (Figure 3A) et, d'autre part, que ces interactions structurelles sont régulées par l'activité neuronale qui détermine notamment la durée et la fréquence de ces contacts entre microglie et synapses. Les mouvements microgliaux pourraient donc avoir une autre fonction que l'unique recherche de signaux d'alerte et pourraient participer à la régulation de l'activité synaptique. Des résultats en faveur d'une telle hypothèse ont été récemment obtenus dans une étude réalisée sur des larves de poisson zèbre montrant que la microglie est plus fréquemment en contact avec les neurones ayant une forte activité et que celle-ci diminue à la suite d'un contact avec la microglie (27).

Ainsi, par analogie avec son rôle en conditions pathologiques, la microglie pourrait influencer l'activité synaptique en libérant un certain nombre de médiateurs connus pour moduler l'expression et la fonction de protéines synaptiques. Il y a en effet dans la littérature de nombreux exemples de modulation du fonctionnement de synapses dans des conditions non-pathologiques par des médiateurs pouvant être libérés par la microglie. Le plus étudié est sans doute encore une fois le $\text{TNF}\alpha$ qui, lorsqu'il est appliqué de façon exogène, régule de nombreux aspects de la transmission et de la

plasticité synaptique (28). Mais même si la microglie est le pourvoyeur le plus important de $TNF\alpha$ dans le SNC, d'autres sources ne sont pas à exclure et l'implication de la microglie dans ces processus synaptiques n'est donc pas certaine. Par contre, la stimulation spécifique de récepteurs exprimés uniquement par la microglie a permis de confirmer cette hypothèse. La lipo-polysaccharide (LPS) est un composant de la paroi de certaines bactéries qui est classiquement utilisée expérimentalement pour déclencher une activation de la microglie et en étudier les conséquences sur une échelle de temps de plusieurs heures à plusieurs jours. De façon surprenante, l'application de LPS sur des tranches d'hippocampe entraîne une augmentation presque immédiate de la fréquence des courants synaptiques excitateurs spontanés (29). Les auteurs de cette observation ont disséqué les voies de signalisation impliquées dans cet effet et montré que l'activation du récepteur au LPS, TLR4 (toll like receptor 4), qui est exprimé uniquement par la microglie en conditions physiologiques, entraîne une libération d'ATP par la microglie qui active les récepteurs purinergiques P2Y1 à la surface des astrocytes. Les astrocytes mobilisés par l'ATP libèrent du glutamate, qui se lie à des récepteurs spécifiques, appelés mGluR5, localisés sur les terminaisons pré-synaptiques des connexions excitatrices et dont il augmente la probabilité de libération de leur neurotransmetteur (29). Une des surprises de cette étude réside dans la rapidité des effets du LPS qui suggère que, indépendamment de l'activation complète de la microglie induite par ce stimulus, toute voie de signalisation entraînant une libération d'ATP par la microglie a potentiellement la capacité d'augmenter l'excitabilité du réseau neuronal.

D'autres voies de régulation de l'activité synaptique par la microglie en conditions physiologiques ont été identifiées. La fractalkine est une cytokine exprimée à la membrane des neurones, et son unique récepteur CX3CR1, n'est exprimé que par la microglie dans le SNC. L'application de fractalkine dans l'hippocampe sain induit une diminution transitoire de l'amplitude des courants synaptiques excitateurs neuronaux. Cet effet passe par une libération microgliale d'adénosine (ou d'ATP hydrolysé en adénosine par des ectonucléotidases extracellulaire) agissant au niveau pré-synaptique (30). De façon intéressante, les souris déficientes pour le récepteur CX3CR1 présentent des déficits dans la transmission et la plasticité synaptique excitatrice glutamatergique ainsi que des déficits cognitifs. Ces anomalies résulteraient d'une production anormalement élevée d'interleukine- 1β , une cytokine pro-

inflammatoire pouvant être libérée par la microglie (31). L'activation constitutive de la voie de la fractalkine empêcherait ainsi une action délétère de la microglie sur le fonctionnement synaptique. Il existe au moins deux autres protéines microgliales, CD200R, le récepteur d'une glycoprotéine CD200 exprimée par les neurones et d'autres cellules gliales, et DAP12, un adaptateur des récepteurs de type TREM (triggering receptor expressed on myeloid cells), dont la mobilisation ou l'absence affectent la transmission synaptique dans l'hippocampe (32;33). Cependant, les mécanismes reliant ces voies microgliales de signalisation microgliales à la transmission neuronale restent, à ce jour, inconnus.

Les travaux actuels indiquent donc qu'en conditions physiologiques, la microglie exerce une surveillance permanente des neurones du SNC. Cette surveillance se traduit par la formation de contacts transitoires entre microglie et synapses, et ces interactions physiques semblent influencer le fonctionnement des synapses. Néanmoins, beaucoup de questions restent encore sans réponse. En particulier, comment sont mobilisés les facteurs diffusibles microgliaux influençant l'activité synaptique ? Il est en effet plus difficile de mettre en évidence l'intervention de tels médiateurs en conditions physiologiques au cours desquelles leur production est certainement moindre et plus limitée dans le temps que dans des conditions pathologiques. Certains éléments de réponses pourraient émerger de l'étude de la microglie au cours du développement du SNC pendant lequel des changements synaptiques structuraux et fonctionnels massifs dépendants de l'activité semblent nécessiter une intervention de la microglie.

La microglie au cours du développement postnatal du SNC : un sculpteur des synapses en formation

Au cours du développement normal du SNC, un nombre important de neurones sont éliminés par apoptose et la microglie régule ce processus (37) (voir l'article de Legendre et Le Corronc dans ce numéro). Mais, il y a aussi une production de synapses en excès qui sont éliminées par des mécanismes dépendant en partie de l'activité neuronale lors de la maturation des réseaux synaptiques. Des observations récentes indiquent que, durant le développement postnatal de l'hippocampe et du thalamus de la souris, des éléments pré- et post synaptiques ont été observés à l'intérieur de cellules

microgliales (Figure 3B). Cela suggère que celles-ci sont impliquées dans la phagocytose de synapses surnuméraires devant être éliminées (34;35). Dans le thalamus en développement, la phagocytose des terminaisons des fibres rétinienne est dépendante de l'activité neuronale et met en jeu des éléments du système du complément, mieux connu pour son rôle dans le système immunitaire. Il semble que les synapses "faibles" devant être éliminées sont étiquetées par l'expression de la composante C3 du complément, qui agit comme un signal "mange moi" (eat me) sur la microglie, qui est la seule dans le SNC à exprimer le récepteur de C3. Chez les animaux invalidés pour C3 ou son récepteur microglial C3R la phagocytose des terminaisons rétinienne par la microglie est diminuée et la connectivité synaptique de cette voie rétino-thalamique ne subit pas une maturation normale (35). La disponibilité de la microglie aux sites d'élimination synaptique est bien entendue un facteur limitant pour que cette phagocytose ait lieu. Dans l'hippocampe d'animaux invalidés pour le récepteur CX3CR1 de la fractalkine, l'augmentation de la densité microgliale est retardée pendant les premières semaines de vie. Ce déficit transitoire du nombre de microglies s'accompagne d'un plus grand nombre d'épines dendritiques sur les neurones, suggérant un déficit d'élimination des synapses surnuméraires. De façon intéressante, ces anomalies structurelles s'accompagnent d'un retard de maturation des propriétés fonctionnelles du réseau neuronal (34). Cependant, le lien entre phagocytose microgliale et maturation fonctionnelle des synapses n'est pas clairement établi et d'autres fonctions microgliales pourraient expliquer ces observations.

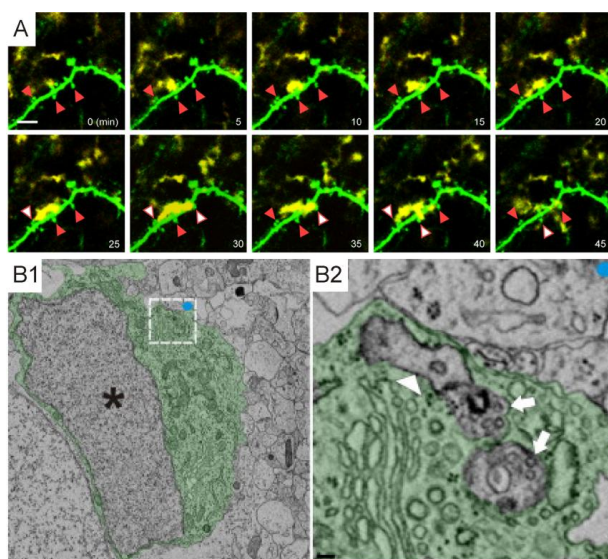


Figure 3 : Microglie au contact des synapses.

A) Série d'images prises en microscopie biphotonique toutes les 5 minutes dans le cortex d'une souris transgénique adulte exprimant des protéines fluorescentes différentes dans les neurones (vert) et la microglie (jaune). Les flèches indiquent les épines dendritiques postsynaptiques contactées par la microglie. La barre de calibration représente 5 µm (adaptée d'après (26)).

B) Clichés de microscopie électronique montrant la présence d'éléments présynaptiques (flèches blanches en B2) et probablement postsynaptiques (tête de flèche blanche en B2) à l'intérieur d'une microglie (verte) dans le thalamus d'une souris âgée de cinq jours. L'astérisque en B1 indique le noyau de la cellule microgliale. Le carré blanc en B1 indique la zone agrandie présentée en B2.

La barre de calibration en B2 représente 100 nm (adaptée d'après (35)).

Le rôle de la microglie sur le développement des circuits de cortex somato-sensoriel des rongeurs a été étudié au niveau de structures anatomiques très particulières appelées tonneaux. Le centre de ces tonneaux est constitué par les fibres issues du thalamus, une structure sous-corticale relayant les informations sensorielles issues des vibrisses du museau, véritables organes sensoriels des rongeurs (39). Au centre des tonneaux, les fibres thalamiques font des synapses sur les dendrites des neurones du cortex dont les corps cellulaires sont localisés à la périphérie des tonneaux. A chaque vibrisse correspond un seul tonneau dans le cortex (*Figure 4A*). Cette représentation corticale des vibrisses se met en place à partir du 3^{ème} jour de vie postnatal et les propriétés fonctionnelles des synapses thalamo-corticales évoluent de façon importante entre la première et la seconde semaine post-natale. La distribution de la microglie pendant ces étapes de formation des tonneaux et de maturation synaptique suit un patron très stéréotypé. Jusqu'au cinquième jour postnatal, la microglie reste à la périphérie des tonneaux et est exclue des sites synaptiques qu'elle commence à envahir uniquement à partir des sixième et du septième jour (*Figure 4B*). Ce recrutement microglial au niveau des synapses dépend de la fractalkine qui est exprimée de façon transitoire au centre des tonneaux. Chez les animaux invalidés pour son récepteur CX3CR1, le recrutement microglial est retardé d'au moins deux jours (*Figure 4C*). Ce retard de recrutement de la microglie aux sites des synapses thalamo-corticales s'accompagne d'un retard de maturation des propriétés de ces synapses qui se caractérise en particulier par un défaut dans l'expression fonctionnelle des récepteurs postsynaptiques du glutamate (36). Ces observations suggèrent donc que la microglie en colonisant le centre des tonneaux émet un signal influençant l'expression ou la disponibilité des récepteurs du glutamate aux synapses. L'identité de ce signal doit encore être déterminée, mais ces observations soulignent que la microglie influence la maturation fonctionnelle des circuits synaptiques durant le développement normal du SNC.

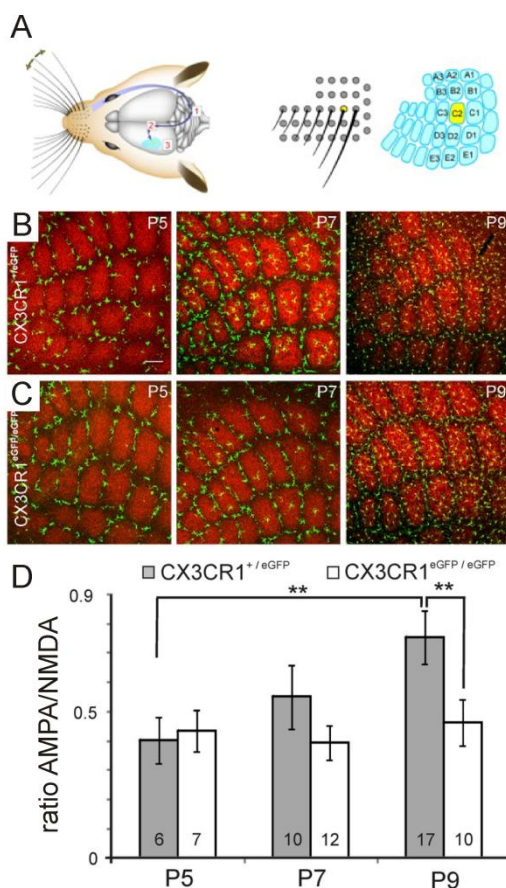


Figure 4 : Microglie et maturation fonctionnelle des synapses. A) Schéma du système sensoriel des vibrisses chez les rongeurs et correspondance entre la disposition des vibrisses du museau et les tonneaux dans la couche 4 du cortex somato-sensoriel (adaptée d'après (40)). B) Evolution de la distribution de la microglie (vert) dans le champ des tonneaux de la couche 4 du cortex entre le cinquième et le neuvième jour postnatal chez des souris hétérozygotes pour le récepteur microglial de la fractalkine (CX3CR1^{+/eGFP}). Notez qu'au cinquième jour, la microglie est exclue des zones synaptiques au centre des tonneaux (rouge, marquage des axones thalamiques) et qu'au septième jour postnatal elle a commencé à envahir ces zones. La barre de calibration représente 100 μ m. C) Même expérience réalisée avec des souris invalidées pour CX3CR1^{eGFP/eGFP}. Notez qu'au septième jour postnatal, la microglie n'a pratiquement pas commencé à envahir les tonneaux. D) Evolution relative des courants synaptiques portés par les deux types de récepteurs du glutamate, les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropioniv) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate), exprimés aux synapses thalamo-corticales entre le cinquième et le neuvième jour postnatal chez les souris hétérozygotes ou invalidées pour CX3CR1. Notez le déficit d'évolution chez les souris invalidées pour CX3CR1 qui constitue un défaut de maturation fonctionnelle de ces synapses (adapté d'après (36)).

Conclusion

L'ensemble de ces travaux souligne l'extraordinaire plasticité des cellules microgliales dont le phénotype et les fonctions s'adaptent rapidement à l'environnement. L'existence d'une motilité permanente de la microglie en direction des synapses dans les conditions physiologiques est une découverte fascinante. Son étude pourrait avoir d'importantes conséquences sur notre conception du contrôle de l'activité synaptique, notamment lors des changements d'état du système (veille-sommeil, stress, etc...). Ainsi, si la synapse quadri-partite est une réalité morphologique, nous sommes encore loin d'en comprendre le fonctionnement et les spécificités passionnantes de la microglie devraient nous occuper encore un certain temps.

Liens d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

Remerciements

Nous remercions Céline Bidoret pour son aide sur l'étude morphologique et Maki Hoshiko pour sa contribution à l'ensemble du projet microglie et développement. Isabelle Arnoux a bénéficié d'une allocation du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et de la Fondation pour la recherche médicale (FDT20130928365). Les images confocales des Figures 1-4 ont été acquises sur la plateforme du centre universitaire des Saints-Pères. L'équipe d'Étienne Audinat est membre de l'École des neurosciences de Paris (ENP) et est soutenue par l'Inserm, le CNRS et l'Agence nationale de la recherche (ANR 2010 BLAN 1419 01).

Références

1. Verkhratsky,A., and Butt,A. 2007. Glial Neurobiology: A text book. John Wiley & Sons, Ltd.
2. Perea,G., Navarrete,M., and Araque,A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32:421-431.
3. Hanisch,U.K., and Kettenmann,H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10:1387-1394.
4. Ransohoff,R.M., and Perry,V.H. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol* 27:119-145.
5. Bechade,C., Cantaut-Belarif,Y., and Bessis,A. 2013. Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci.* 7:32.
6. Blank,T., and Prinz,M. 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61:62-70.
7. Kettenmann,H., Hanisch,U.K., Noda,M., and Verkhratsky,A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 91:461-553.
8. Schafer,D.P., Lehrman,E.K., and Stevens,B. 2013. The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61:24-36.
9. Blinzinger,K., and Kreutzberg,G. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 85:145-157.
10. Siskova,Z., Page,A., O'Connor,V., and Perry,V.H. 2009. Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping. *Am. J. Pathol.* 175:1610-1621.
11. Trapp,B.D., Wujek,J.R., Criste,G.A., Jalabi,W., Yin,X., Kidd,G.J., Stohlman,S., and Ransohoff,R. 2007. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55:360-368.
12. Ulmann,L., Hatcher,J.P., Hughes,J.P., Chaumont,S., Green,P.J., Conquet,F., Buell,G.N., Reeve,A.J., Chessell,I.P., and Rassendren,F. 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* 28:11263-11268.

13. Tsuda,M., Shigemoto-Mogami,Y., Koizumi,S., Mizokoshi,A., Kohsaka,S., Salter,M.W., and Inoue,K. 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
14. Coull,J.A., Beggs,S., Boudreau,D., Boivin,D., Tsuda,M., Inoue,K., Gravel,C., Salter,M.W., and De Koninck,Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
15. Bezzi,P., Domercq,M., Brambilla,L., Galli,R., Schols,D., De Clercq,E., Vescovi,A., Bagetta,G., Kollias,G., Meldolesi,J. et al 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4:702-710.
16. Domercq,M., Brambilla,L., Pilati,E., Marchaland,J., Volterra,A., and Bezzi,P. 2006. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281:30684-30696.
17. Perea,G., and Araque,A. 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res. Rev.* 63:93-102.
18. Angulo,M.C., Le,M.K., Kozlov,A.S., Charpak,S., and Audinat,E. 2008. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* 86:297-303.
19. Nimmerjahn,A., Kirchhoff,F., and Helmchen,F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
20. Davalos,D., Grutzendler,J., Yang,G., Kim,J.V., Zuo,Y., Jung,S., Littman,D.R., Dustin,M.L., and Gan,W.B. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8:752-758.
21. Haynes,S.E., Hollopeter,G., Yang,G., Kurpius,D., Dailey,M.E., Gan,W.B., and Julius,D. 2006. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9:1512-1519.
22. Orr,A.G., Orr,A.L., Li,X.J., Gross,R.E., and Traynelis,S.F. 2009. Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12:872-878.
23. Wake,H., Moorhouse,A.J., Jinno,S., Kohsaka,S., and Nabekura,J. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* 29:3974-3980.
24. Fontainhas,A.M., Wang,M., Liang,K.J., Chen,S., Mettu,P., Damani,M., Fariss,R.N., Li,W., and Wong,W.T. 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS. ONE.* 6:e15973.
25. Wu,L.J., and Zhuo,M. 2008. Resting microglial motility is independent of synaptic plasticity in mammalian brain. *J Neurophysiol.* 99:2026-2032.
26. Tremblay,M.E., Lowery,R.L., and Majewska,A.K. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS. Biol.* 8:e1000527.
27. Li,Y., Du,X.F., Liu,C.S., Wen,Z.L., and Du,J.L. 2012. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev. Cell* 23:1189-1202.
28. Santello,M., and Volterra,A. 2012. TNFalpha in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci.* 35:638-647.
29. Pascual,O., Ben,A.S., Rostaing,P., Triller,A., and Bessis,A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109:E197-E205.
30. Piccinin,S., Di,A.S., Piccioni,A., Volpini,R., Cristalli,G., Fredholm,B.B., Limatola,C., Eusebi,F., and Ragozzino,D. 2010. CX3CL1-induced modulation at CA1 synapses reveals multiple mechanisms of EPSC modulation involving adenosine receptor subtypes. *J Neuroimmunol.* 224:85-92.

31. Rogers,J.T., Morganti,J.M., Bachstetter,A.D., Hudson,C.E., Peters,M.M., Grimmig,B.A., Weeber,E.J., Bickford,P.C., and Gemma,C. 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 31:16241-16250.
32. Costello,D.A., Lyons,A., Denieffe,S., Browne,T.C., Cox,F.F., and Lynch,M.A. 2011. Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: a role for Toll-like receptor activation. *J Biol. Chem.* 286:34722-34732.
33. Roumier,A., Bechade,C., Poncer,J.C., Smalla,K.H., Tomasello,E., Vivier,E., Gundelfinger,E.D., Triller,A., and Bessis,A. 2004. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci.* 24:11421-11428.
34. Paolicelli,R.C., Bolasco,G., Pagani,F., Maggi,L., Scianni,M., Panzanelli,P., Giustetto,M., Ferreira,T.A., Guiducci,E., Dumas,L. et al 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
35. Schafer,D.P., Lehrman,E.K., Kautzman,A.G., Koyama,R., Mardinly,A.R., Yamasaki,R., Ransohoff,R.M., Greenberg,M.E., Barres,B.A., and Stevens,B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
36. Hoshiko,M., Arnoux,I., Avignone,E., Yamamoto,N., and Audinat,E. 2012. Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J Neurosci.* 32:15106-15111.
37. Legendre P, Le Corronc H. Cellules microgliales et développement du système nerveux central chez l’embryon. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 147-52
38. Pochet S, Seil M, El Ouailiti M, Dehay JP. P2X4 ou P2X7. Lequel de ces deux récepteurs nous fera saliver ? *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 509-14.
39. Estebanez L, Destexhe A, El-Boustani S, Shulz DE. Ce que les vibrissent dissent au cerveau tactile. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 30 : 93-8.
40. Petersen CC. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 2007 ; 56 : 339-55.

Références

- Aarum, J., Sandberg, K., Haerberlein, S.L.B., and Persson, M.A.A. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15983–15988.
- Agmon, A., and Connors, B.W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience* *41*, 365–379.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* *10*, 1538–1543.
- Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* *117*, 145–152.
- Antonini, A., and Stryker, M.P. (1996). Plasticity of geniculocortical afferents following brief or prolonged monocular occlusion in the cat. *J. Comp. Neurol.* *369*, 64–82.
- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P., et al. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J.* *31*, 1231–1240.
- Arnoux, I., Hoshiko, M., Mandavy, L., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2013). Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory “Barrel” cortex. *Glia* *61*, 1582–1594.
- Arnoux, I., Hoshiko, M., Sanz Diez, A., and Audinat, E. (2014). Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex. *Glia* *62*, 399–410.
- Ashwell, K.W., Holländer, H., Streit, W., and Stone, J. (1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis. Neurosci.* *2*, 437–448.
- Auberson, Y.P., Allgeier, H., Bischoff, S., Lingenhoebl, K., Moretti, R., and Schmutz, M. (2002). 5-Phosphonomethylquinolinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *12*, 1099–1102.
- Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., and Audinat, E. (2008). Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 9133–9144.
- Bae, J.J., Xiang, Y.-Y., Martinez-Canabal, A., Frankland, P.W., Yang, B.B., and Lu, W.-Y. (2011). Increased transforming growth factor- β 1 modulates glutamate receptor expression in the hippocampus. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* *3*, 9–20.
- Bannister, N.J., Benke, T.A., Mellor, J., Scott, H., Grdal, E., Crabtree, J.W., and Isaac, J.T.R. (2005). Developmental changes in AMPA and kainate receptor-mediated quantal transmission at thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5259–5271.
- Basu, A., Krady, J.K., O’Malley, M., Styren, S.D., DeKosky, S.T., and Levison, S.W. (2002). The Type 1 Interleukin-1 Receptor Is Essential for the Efficient Activation of Microglia and the Induction of Multiple Proinflammatory Mediators in Response to Brain Injury. *J. Neurosci.* *22*, 6071–6082.
- Bates, C.A., and Killackey, H.P. (1985). The organization of the neonatal rat’s brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J. Comp. Neurol.* *240*, 265–287.

- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.
- Béchéde, C., Cantaut-Belarif, Y., and Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 32.
- Beek, E.M. van, Cochrane, F., Barclay, A.N., and Berg, T.K. van den (2005). Signal Regulatory Proteins in the Immune System. *J. Immunol.* 175, 7781–7787.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16021–16026.
- Beggs, S., and Salter, M.W. (2010). Microglia-neuronal signalling in neuropathic pain hypersensitivity 2.0. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 474–480.
- Belarbi, K., and Rosi, S. (2013). Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 145.
- Berg, A., Zelano, J., Stephan, A., Thams, S., Barres, B.A., Pekny, M., Pekna, M., and Cullheim, S. (2012). Reduced removal of synaptic terminals from axotomized spinal motoneurons in the absence of complement C3. *Exp. Neurol.* 237, 8–17.
- Bessis, A., Béchéde, C., Bernard, D., and Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233–238.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., et al. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4, 702–710.
- Bialas, A.R., and Stevens, B. (2013). TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat. Neurosci.*
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005). Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 β Release from Microglia. *J. Immunol.* 174, 7268–7277.
- Biber, K., Laurie, D.J., Berthele, A., Sommer, B., Tölle, T.R., Gebicke-Härter, P.J., van Calcar, D., and Boddeke, H.W. (1999). Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J. Neurochem.* 72, 1671–1680.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., and Boddeke, H.W.G.M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602.
- Biber, K., Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., Tsukamoto, K., Toyomitsu, E., Masuda, T., Boddeke, H., and Inoue, K. (2011). Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. *EMBO J.* 30, 1864–1873.
- Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* Vienna Austria 1948 85, 145–157.
- Boche, D., Cunningham, C., Docagne, F., Scott, H., and Perry, V.H. (2006). TGF β 1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 22, 638–650.

- Boehme, S.A., Lio, F.M., Maciejewski-Lenoir, D., Bacon, K.B., and Conlon, P.J. (2000). The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 397–403.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Kohsaka, S., Jucker, M., and Calhoun, M.E. (2008). Dynamics of the Microglial/Amyloid Interaction Indicate a Role in Plaque Maintenance. *J. Neurosci.* 28, 4283–4292.
- Böttner, M., Krieglstein, K., and Unsicker, K. (2000). The Transforming Growth Factor- β s. *J. Neurochem.* 75, 2227–2240.
- Boucsein, C., Kettenmann, H., and Nolte, C. (2000). Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2049–2058.
- Boulanger, L.M., and Shatz, C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 521–531.
- Brockhaus, J., Ilschner, S., Banati, R.B., and Kettenmann, H. (1993). Membrane properties of ameboid microglial cells in the corpus callosum slice from early postnatal mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 4412–4421.
- Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., and Mattson, M.P. (1996). Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2, 788–794.
- Byrnes, K.R., Stoica, B., Loane, D.J., Riccio, A., Davis, M.I., and Faden, A.I. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. *Glia* 57, 550–560.
- Carbonell, W.S., Murase, S.-I., Horwitz, A.F., and Mandell, J.W. (2005). Infiltrative microgliosis: activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. *J. Neuroinflammation* 2, 5.
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924.
- Chamak, B., Dobbertin, A., and Mallat, M. (1995). Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 69, 177–187.
- Chen, S.-K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., and Capecchi, M.R. (2010). Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 141, 775–785.
- Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., et al. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386–396.
- Cheung, G., Kann, O., Kohsaka, S., Fäerber, K., and Kettenmann, H. (2009). GABAergic activities enhance macrophage inflammatory protein-1 α release from microglia (brain macrophages) in postnatal mouse brain. *J. Physiol.* 587, 753–768.
- Chin, J., Liu, R.-Y., Cleary, L.J., Eskin, A., and Byrne, J.H. (2006). TGF- β 1-Induced Long-Term Changes in Neuronal Excitability in Aplysia Sensory Neurons Depend on MAPK. *J. Neurophysiol.* 95, 3286–3290.

- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., and Landreth, G.E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1179–1188.
- Cooper, N.G.F., and Steindler, D.A. (1986). Monoclonal antibody to glial fibrillary acidic protein reveals a parcellation of individual barrels in the early postnatal mouse somatosensory cortex. *Brain Res.* 380, 341–348.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S., and Shatz, C.J. (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21, 505–520.
- Costello, D.A., Lyons, A., Denieffe, S., Browne, T.C., Cox, F.F., and Lynch, M.A. (2011). Long Term Potentiation Is Impaired in Membrane Glycoprotein CD200-deficient Mice A ROLE FOR Toll-LIKE RECEPTOR ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* 286, 34722–34732.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017–1021.
- Crair, M.C., and Malenka, R.C. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375, 325–328.
- Cuadros, M.A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., and Navascués, J. (1993). First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 330, 113–129.
- Cullheim, S., and Thams, S. (2007). The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res. Rev.* 55, 89–96.
- Czeh, M., Gressens, P., and Kaindl, A.M. (2011). The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* 33, 199–209.
- Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1997). Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 377, 70–84.
- Dalmau, I., Vela, J.M., González, B., Finsen, B., and Castellano, B. (2003). Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 458, 144–157.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.
- Daw, M.I., Scott, H.L., and Isaac, J.T.R. (2007). Developmental synaptic plasticity at the thalamocortical input to barrel cortex: mechanisms and roles. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 493–502.
- Dénes, Á., Ferenczi, S., Halász, J., Környei, Z., and Kovács, K.J. (2008). Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1707–1721.
- Deng, Y.Y., Lu, J., Ling, E.A., and Kaur, C. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF-kappaB signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia* 57, 604–621.

- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., and Kipnis, J. (2012). Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 484, 105–109.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., and Kipnis, J. (2013). The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol.* 34, 144–150.
- Deverman, B.E., and Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron* 64, 61–78.
- DeWitt, D.A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., and Silver, J. (1998). Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 149, 329–340.
- Dheen, S.T., Kaur, C., and Ling, E.-A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–1197.
- Dibaj, P., Nadrigny, F., Steffens, H., Scheller, A., Hirrlinger, J., Schomburg, E.D., Neusch, C., and Kirchhoff, F. (2010). NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. *Glia* 58, 1133–1144.
- Dickson, D.W., and Mattiace, L.A. (1989). Astrocytes and microglia in human brain share an epitope recognized by a B-lymphocyte-specific monoclonal antibody (LN-1). *Am. J. Pathol.* 135, 135–147.
- Ding, M., Pierre, B.A.S., Parkinson, J.F., Medberry, P., Wong, J.L., Rogers, N.E., Ignarro, L.J., and Merrill, J.E. (1997). Inducible Nitric-oxide Synthase and Nitric Oxide Production in Human Fetal Astrocytes and Microglia A KINETIC ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* 272, 11327–11335.
- Domercq, M., and Matute, C. (2004). Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 609–612.
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., and Bezzi, P. (2006). P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281, 30684–30696.
- Eder, C. (1998). Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am. J. Physiol.* 275, C327–342.
- Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231.
- Eroglu, C., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., et al. (2009). Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380–392.
- Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1254–1266.
- Erzurumlu, R.S., and Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1540–1553.
- Erzurumlu, R.S., and Killackey, H.P. (1982). Critical and sensitive periods in neurobiology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 17, 207–240.
- Färber, K., Pannasch, U., and Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 128–138.
- Fedoroff, S., Zhai, R., and Novak, J.P. (1997). Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 50, 477–486.

- Feldman, D.E., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and Isaac, J.T.. (1998). Long-Term Depression at Thalamocortical Synapses in Developing Rat Somatosensory Cortex. *Neuron* 21, 347–357.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Virgilio, F.D. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J.N., Mohacsi, E., Heitz, M.P., and Kemp, J.A. (1997). Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1285–1292.
- Fiske, B.K., and Brunjes, P.C. (2000). Microglial activation in the developing rat olfactory bulb. *Neuroscience* 96, 807–815.
- Fonseca, M.I., Zhou, J., Botto, M., and Tenner, A.J. (2004). Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 6457–6465.
- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., and Wong, W.T. (2011). Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS ONE* 6, e15973.
- Fordyce, C.B., Jagasia, R., Zhu, X., and Schlichter, L.C. (2005). Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7139–7149.
- Frade, J.M., and Barde, Y.A. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20, 35–41.
- Franke, H., Günther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., Faber-Zuschratter, H., Schneider, D., and Illes, P. (2004). P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 686–699.
- Fujita, S., and Kitamura, T. (1975). Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. *Acta Neuropathol. Suppl. Suppl* 6, 291–296.
- Fukushima, T., Liu, R.-Y., and Byrne, J.H. (2007). Transforming growth factor-beta2 modulates synaptic efficacy and plasticity and induces phosphorylation of CREB in hippocampal neurons. *Hippocampus* 17, 5–9.
- Fumagalli, S., Perego, C., Ortolano, F., and De Simoni, M.-G. (2013). CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia* n/a–n/a.
- Galiano, M., Liu, Z.Q., Kalla, R., Bohatschek, M., Koppius, A., Gschwendtner, A., Xu, S., Werner, A., Kloss, C.U., Jones, L.L., et al. (2001). Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 14, 327–341.
- Galic, M.A., Riazi, K., and Pittman, Q.J. (2012). Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol.* 33, 116–125.
- Gebicke-Haerter, P.J., Christoffel, F., Timmer, J., Northoff, H., Berger, M., and Van Calker, D. (1996). Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* 29, 37–42.

- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 45.
- Glazner, G.W., and Mattson, M.P. (2000). Differential effects of BDNF, ADNF9, and TNFalpha on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis, and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp. Neurol.* 161, 442–452.
- Glynn, M.W., Elmer, B.M., Garay, P.A., Liu, X.-B., Needleman, L.A., El-Sabeawy, F., and McAllister, A.K. (2011). MHCI negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections. *Nat. Neurosci.* 14, 442–451.
- Goddard, C.A., Butts, D.A., and Shatz, C.J. (2007). Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6828–6833.
- Gordon, J.A., and Stryker, M.P. (1996). Experience-Dependent Plasticity of Binocular Responses in the Primary Visual Cortex of the Mouse. *J. Neurosci.* 16, 3274–3286.
- De Groot, C.J., Hupples, W., Sminia, T., Kraal, G., and Dijkstra, C.D. (1992). Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 6, 301–309.
- Gruol, D.L., and Nelson, T.E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 15, 307–339.
- Hall, B.J., Ripley, B., and Ghosh, A. (2007). NR2B Signaling Regulates the Development of Synaptic AMPA Receptor Current. *J. Neurosci.* 27, 13446–13456.
- Han, Y., Yu, H.-X., Sun, M.-L., Wang, Y., Xi, W., and Yu, Y.-Q. (2014). Astrocyte-restricted disruption of connexin-43 impairs neuronal plasticity in mouse barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 39, 35–45.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Hanke, M.L., and Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 199 121, 367–387.
- Hao, C., Richardson, A., and Fedoroff, S. (1991). Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 9, 1–14.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10896–10901.
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., and Nakanishi, H. (2006). Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53, 660–668.

- Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., and Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519.
- Hernandez-Ontiveros, D.G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., and Borlongan, C.V. (2013). Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurotrauma* 4, 30.
- Heupel, K., Sargsyan, V., Plomp, J.J., Rickmann, M., Varoqueaux, F., Zhang, W., and Kriegstein, K. (2008). Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Develop.* 3, 25.
- Hines, D.J., Hines, R.M., Mulligan, S.J., and Macvicar, B.A. (2009). Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57, 1610–1618.
- Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S., and Kohsaka, S. (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 81, 357–362.
- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., et al. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768–1771.
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2012). Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 15106–15111.
- Hovden, H., Frederiksen, J.L., and Pedersen, S.W. (2013). Immune system alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* n/a–n/a.
- Hsieh, C.L., Koike, M., Spusta, S.C., Niemi, E.C., Yenari, M., Nakamura, M.C., and Seaman, W.E. (2009). A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *J. Neurochem.* 109, 1144–1156.
- Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1964). Effects of monocular deprivation in kittens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Für Exp. Pathol. Pharmacol.* 248, 492–497.
- Imai, Y., Iбата, I., Ito, D., Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (1996). A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 855–862.
- Imamoto, K., and Leblond, C.P. (1978). Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J. Comp. Neurol.* 180, 139–163.
- Inan, M., and Crair, M.C. (2007). Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 13, 49–61.
- Inoue, K. (2006). The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* 109, 210–226.
- Isaac, J.T.R., Crair, M.C., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1997). Silent Synapses during Development of Thalamocortical Inputs. *Neuron* 18, 269–280.
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke J. Cereb. Circ.* 32, 1208–1215.

- Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., and Antel, J.P. (2005). Microglia and multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* *81*, 363–373.
- Ji, R.-R., and Suter, M.R. (2007). p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol. Pain* *3*, 33.
- Jou, I., Pyo, H., Chung, S., Young Jung, S., Gwag, B.J., and Joe, E.-H. (1998). Expression of Kv1.5 K⁺ channels in activated microglia in vivo. *Glia* *24*, 408–414.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4106–4114.
- Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., et al. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann. Neurol.* *72*, 536–549.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, 979–987.
- Kaur, C., Ling, E.A., and Wong, W.C. (1984). Cytochemical localisation of 5'-nucleotidase in amoeboid microglial cells in postnatal rats. *J. Anat.* *139 (Pt 1)*, 1–7.
- Kaur, C., Ling, E.A., and Wong, W.C. (1987). Localisation of thiamine pyrophosphatase in the amoeboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J. Anat.* *152*, 13–22.
- Kaur, C., Wu, C.H., Wen, C.Y., and Ling, E.A. (1994). The effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rats. *Arch. Histol. Cytol.* *57*, 449–459.
- Kaushal, V., and Schlichter, L.C. (2008). Mechanisms of Microglia-Mediated Neurotoxicity in a New Model of the Stroke Penumbra. *J. Neurosci.* *28*, 2221–2230.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* *91*, 461–553.
- Kidd, F.L., and Isaac, J.T. (1999). Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* *400*, 569–573.
- Kierdorf, K., and Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 44.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* *16*, 273–280.
- Kim, W.-K., Hwang, S.-Y., Oh, E.-S., Piao, H.Z., Kim, K.-W., and Han, I.-O. (2004). TGF- β 1 Represses Activation and Resultant Death of Microglia via Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity. *J. Immunol.* *172*, 7015–7023.
- Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K., and Noguchi, K. (2008). P2Y₁₂ receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 2892–2902.
- Kohman, R.A., and Rhodes, J.S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain. Behav. Immun.* *27*, 22–32.

- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091–1095.
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61, 47–54.
- Koning, N., Swaab, D.F., Hoek, R.M., and Huitinga, I. (2009). Distribution of the Immune Inhibitory Molecules CD200 and CD200R in the Normal Central Nervous System and Multiple Sclerosis Lesions Suggests Neuron-Glia and Glia-Glia Interactions. *J. Neuropathol.* 68, 159–167.
- Kraft, A.D., McPherson, C.A., and Harry, G.J. (2009). Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* 30, 785–793.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318.
- Kriegelstein, K., Zheng, F., Unsicker, K., and Alzheimer, C. (2011). More than being protective: functional roles for TGF- β /activin signaling pathways at central synapses. *Trends Neurosci.* 34, 421–429.
- Kuhn, S.A., van Landeghem, F.K., Zacharias, R., Färber, K., Rappert, A., Pavlovic, S., Hoffmann, A., Nolte, C., and Kettenmann, H. (2004). Microglia express GABAB receptors to modulate interleukin release. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 312–322.
- Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2005). Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *J. Neuroimmunol.* 162, 89–96.
- Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A., and Song, C. (2006). Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J. Neuroimmunol.* 175, 97–106.
- Lalancette-Hébert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., and Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10383–10395.
- Lambertsen, K.L., Clausen, B.H., Babcock, A.A., Gregersen, R., Fenger, C., Nielsen, H.H., Haugaard, L.S., Wrenfeldt, M., Nielsen, M., Dagnaes-Hansen, F., et al. (2009). Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1319–1330.
- Langosch, J.M., Gebicke-Haerter, P.J., Nörenberg, W., and Illes, P. (1994). Characterization and transduction mechanisms of purinoceptors in activated rat microglia. *Br. J. Pharmacol.* 113, 29.
- Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of Apoptotic Cells: Getting Rid of the Corpses. *Mol. Cell* 14, 277–287.
- Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am. J. Pathol.* 177, 2549–2562.
- Lehrmann, E., Kiefer, R., Christensen, T., Toyka, K.V., Zimmer, J., Diemer, N.H., Hartung, H.P., and Finsen, B. (1998). Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 24, 437–448.

- Li, F., Lu, J., Wu, C.-Y., Kaur, C., Sivakumar, V., Sun, J., Li, S., and Ling, E.-A. (2008). Expression of Kv1.2 in microglia and its putative roles in modulating production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 106, 2093–2105.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., and Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev. Cell* 23, 1189–1202.
- Liang, K.J., Lee, J.E., Wang, Y.D., Ma, W., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2009). Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4444–4451.
- Ling, E.A. (1982). Influence of cortisone on amoeboid microglia and microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats. *J. Anat.* 134, 705–717.
- Ling, E.A. (1994). Monocytic origin of ramified microglia in the corpus callosum in postnatal rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 182–183.
- Ling, E.A., Penney, D., and Leblond, C.P. (1980). Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the “ameboid cells” present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neurol.* 193, 631–657.
- Liu, G.J., Nagarajah, R., Banati, R.B., and Bennett, M.R. (2009). Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1108–1118.
- Liu, W., Brosnan, C.F., Dickson, D.W., and Lee, S.C. (1994). Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am. J. Pathol.* 145, 48–53.
- Van der Loos, H., and Woolsey, T.A. (1973). Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* 179, 395–398.
- López-Bendito, G., and Molnár, Z. (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 276–289.
- Lu, H.C., Gonzalez, E., and Crair, M.C. (2001). Barrel cortex critical period plasticity is independent of changes in NMDA receptor subunit composition. *Neuron* 32, 619–634.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lund, S., Christensen, K.V., Hedtjörn, M., Mortensen, A.L., Hagberg, H., Falsig, J., Hasseldam, H., Schrattenholz, A., Pörzgen, P., and Leist, M. (2006). The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J. Neuroimmunol.* 180, 71–87.
- Maciejewski-Lenoir, D., Chen, S., Feng, L., Maki, R., and Bacon, K.B. (1999). Characterization of Fractalkine in Rat Brain Cells: Migratory and Activation Signals for CX3CR1-Expressing Microglia. *J. Immunol.* 163, 1628–1635.
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D’Andrea, I., Lauro, C., and Limatola, C. (2011). CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Front. Cell. Neurosci.* 5, 22.
- Mandolesi, G., Musella, A., Gentile, A., Grasselli, G., Haji, N., Sepman, H., Fresegna, D., Bullitta, S., Vito, F.D., Musumeci, G., et al. (2013). Interleukin-1 β Alters Glutamate Transmission at Purkinje Cell Synapses in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* 33, 12105–12121.

- Mangin, J.-M., Li, P., Scafidi, J., and Gallo, V. (2012). Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex. *Nat. Neurosci.* *15*, 1192–1194.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Marín-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., and Navascués, J. (1999). Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat. Embryol. (Berl.)* *200*, 289–300.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* *41*, 535–547.
- Mattsson, P., Morgan, B.P., and Svensson, M. (1998). Complement activation and CD59 expression in the motor facial nucleus following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J. Neuroimmunol.* *91*, 180–189.
- McKanna, J.A. (1993). Lipocortin 1 immunoreactivity identifies microglia in adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* *36*, 491–500.
- McMullan, S.M., Phanavanh, B., Li, G.G., and Barger, S.W. (2012). Metabotropic glutamate receptors inhibit microglial glutamate release. *ASN Neuro.*
- Même, W., Calvo, C.-F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by β -amyloid. *FASEB J.* *20*, 494–496.
- Menteyne, A., Levavasseur, F., Audinat, E., and Avignone, E. (2009). Predominant functional expression of Kv1.3 by activated microglia of the hippocampus after Status epilepticus. *PloS One* *4*, e6770.
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A.A., Bushell, T.J., Gray, P.W., and Miller, R.J. (1998). Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14500–14505.
- Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A.M., Inglis, J., Trebault, A., Chan, E., Drexler, S., Sofat, N., Kashiwagi, M., Orend, G., et al. (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.* *15*, 774–780.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.-K., Mack, M., Heikenwalder, M., Brück, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* *10*, 1544–1553.
- Min, K.-J., Yang, M., Kim, S.-U., Jou, I., and Joe, E. (2006). Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation. *J. Neurosci.* *26*, 1880–1887.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529–540.
- Moreno-López, B., Sunico, C.R., and González-Forero, D. (2011). NO Orchestrates the Loss of Synaptic Boutons from Adult “Sick” Motoneurons: Modeling a Molecular Mechanism. *Mol. Neurobiol.* *43*, 41–66.

- Morgan, T.E., Nichols, N.R., Pasinetti, G.M., and Finch, C.E. (1993). TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 120, 291–301.
- Morganti, J.M., Nash, K.R., Grimmig, B.A., Ranjit, S., Small, B., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2012). The Soluble Isoform of CX3CL1 Is Necessary for Neuroprotection in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 32, 14592–14601.
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., and Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 43, 1026–1034.
- Moriguchi, S., Mizoguchi, Y., Tomimatsu, Y., Hayashi, Y., Kadowaki, T., Kagamiishi, Y., Katsube, N., Yamamoto, K., Inoue, K., Watanabe, S., et al. (2003). Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119, 160–169.
- Napoli, I., and Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030–1038.
- Navascués, J., Calvente, R., Marín-Teva, J.L., and Cuadros, M.A. (2000). Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 72, 91–102.
- Neumann, H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191–199.
- Neumann, J., Gunzer, M., Gutzeit, H.O., Ullrich, O., Reymann, K.G., and Dinkel, K. (2006). Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 714–716.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., and Akaike, N. (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 251–258.
- Nutile-McMenemy, N., Elfenbein, A., and Deleo, J.A. (2007). Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *J. Neurochem.* 103, 2035–2046.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55, 604–616.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2010). P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58, 790–801.
- Oliveira, A.L.R., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hökfelt, T., Kärre, K., Lindå, H., and Cullheim, S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17843–17848. Copyright (2004) National Academy of Sciences, U.S.A
- Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.
- Pannasch, U., Färber, K., Nolte, C., Blonski, M., Yan Chiu, S., Messing, A., and Kettenmann, H. (2006). The potassium channels Kv1.5 and Kv1.3 modulate distinct functions of microglia. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 401–411.

- Paoletti, P., Ascher, P., and Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5711–5725.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596–1609.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E197–205.
- Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.
- Perry, V.H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* 90, 113–121.
- Perry, V.H., and O'Connor, V. (2010). The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro* 2, e00047.
- Petersen, C.C.H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339–355.
- Piccinin, S., Di Angelantonio, S., Piccioni, A., Volpini, R., Cristalli, G., Fredholm, B.B., Limatola, C., Eusebi, F., and Ragozzino, D. (2010). CX3CL1-induced modulation at CA1 synapses reveals multiple mechanisms of EPSC modulation involving adenosine receptor subtypes. *J. Neuroimmunol.* 224, 85–92.
- Piccio, L., Buonsanti, C., Mariani, M., Cella, M., Gilfillan, S., Cross, A.H., Colonna, M., and Panina-Bordignon, P. (2007). Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 37, 1290–1301.
- Pinteaux-Jones, F., Sevastou, I.G., Fry, V.A.H., Heales, S., Baker, D., and Pocock, J.M. (2008). Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 106, 442–454.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527–535.
- Poon, V.Y., Choi, S., and Park, M. (2013). Growth factors in synaptic function. *Front. Synaptic Neurosci.* 5, 6.
- Priller, J., Flügel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C.A., Prinz, M., Fernández-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B.A., et al. (2001). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* 7, 1356–1361.
- Prinz, M., Häusler, K.G., Kettenmann, H., and Hanisch, U.-K. (2001). β -adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12p40 release in microglia. *Brain Res.* 899, 264–270.

- Qian, L., Hu, X., Zhang, D., Snyder, A., Wu, H.-M., Li, Y., Wilson, B., Lu, R.-B., Hong, J.-S., and Flood, P.M. (2009). beta2 Adrenergic receptor activation induces microglial NADPH oxidase activation and dopaminergic neurotoxicity through an ERK-dependent/protein kinase A-independent pathway. *Glia* 57, 1600–1609.
- Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., Hong, J.-S., and Block, M.L. (2005). Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 52, 78–84.
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I.F., Limatola, C., and Eusebi, F. (2006). Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10488–10498.
- Rakic, P., Bourgeois, J.P., Eckenhoff, M.F., Zecevic, N., and Goldman-Rakic, P.S. (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* 232, 232–235.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Rappert, A., Biber, K., Nolte, C., Lipp, M., Schubel, A., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Boddeke, H.W.G.M., and Kettenmann, H. (2002). Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 3221–3226.
- Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A.D., Gerard, C., Boddeke, H.W.G.M., Nitsch, R., et al. (2004). CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8500–8509.
- Rappold, P.M., Lynd-Balta, E., and Joseph, S.A. (2006). P2X7 receptor immunoreactive profile confined to resting and activated microglia in the epileptic brain. *Brain Res.* 1089, 171–178.
- Ravichandran, K.S. (2003). “Recruitment Signals” from Apoptotic Cells: Invitation to a Quiet Meal. *Cell* 113, 817–820.
- Rawji, K.S., and Yong, V.W. (2013). The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 948976.
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8541–8552.
- Rigato, C., Buckinx, R., Le-Corronc, H., Rigo, J.M., and Legendre, P. (2011). Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59, 675–695.
- Rigato, C., Swinnen, N., Buckinx, R., Couillin, I., Mangin, J.-M., Rigo, J.-M., Legendre, P., and Le Corronc, H. (2012). Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11559–11573.
- Rodgers, K.M., Hutchinson, M.R., Northcutt, A., Maier, S.F., Watkins, L.R., and Barth, D.S. (2009). The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain J. Neurol.* 132, 2478–2486.

- Rodriguez, J.I., and Kern, J.K. (2011). Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biol.* 7, 205–213.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 16241–16250.
- Rotshenker, S. (2009). The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J. Mol. Neurosci.* MN 39, 99–103.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 11421–11428.
- Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.-C., Réal, E., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PloS One* 3, e2595.
- Roy, A., Jana, A., Yatish, K., Freidt, M.B., Fung, Y.K., Martinson, J.A., and Pahan, K. (2008). Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 686–699.
- Rymo, S.F., Gerhardt, H., Wolfhagen Sand, F., Lang, R., Uv, A., and Betsholtz, C. (2011). A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PloS One* 6, e15846.
- Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., and Nishikawa, S. (2007). Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446, 1056–1061.
- Santello, M., Bezzi, P., and Volterra, A. (2011). TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* 69, 988–1001.
- Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.-C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J.L., Navascués, J., and Cuadros, M.A. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 506, 224–239.
- Sanz, J.M., and Virgilio, F.D. (2000). Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 β Release from Microglial Cells. *J. Immunol.* 164, 4893–4898.
- Saura, J. (2007). Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflammation* 4, 26.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., and Stevens, B. (2013). The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61, 24–36.
- Schilling, T., and Eder, C. (2007). Ion channel expression in resting and activated microglia of hippocampal slices from juvenile mice. *Brain Res.* 1186, 21–28.
- Schilling, T., Quandt, F.N., Cherny, V.V., Zhou, W., Heinemann, U., Decoursey, T.E., and Eder, C. (2000). Upregulation of Kv1.3 K⁺ channels in microglia deactivated by TGF- β . *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 279, C1123–C1134.

- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., and Eder, C. (2001). Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.* 14, 463–473.
- Schmid, C.D., Sautkulis, L.N., Danielson, P.E., Cooper, J., Hasel, K.W., Hilbush, B.S., Sutcliffe, J.G., and Carson, M.J. (2002). Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* 83, 1309–1320.
- Schmidtmayer, J., Jacobsen, C., Miksch, G., and Sievers, J. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12, 259–267.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90.
- Sedel, F., Béchade, C., Vyas, S., and Triller, A. (2004). Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2236–2246.
- Shatz, C.J. (2009). MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 64, 40–45.
- Sheridan, G.K., and Murphy, K.J. (2013). Neuron–glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol.* 3, 130181.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495.
- Sievers, J., Parwaresch, R., and Wottge, H.U. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12, 245–258.
- De Simone, R., Ambrosini, E., Carnevale, D., Ajmone-Cat, M.A., and Minghetti, L. (2007). NGF promotes microglial migration through the activation of its high affinity receptor: Modulation by TGF- β . *J. Neuroimmunol.* 190, 53–60.
- Sisková, Z., Page, A., O'Connor, V., and Perry, V.H. (2009). Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping. *Am. J. Pathol.* 175, 1610–1621.
- Smith, M.E., van der Maesen, K., and Somera, F.P. (1998). Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *J. Neurosci. Res.* 54, 68–78.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., and Gabel, C.A. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132.
- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., and O'Callaghan, J.P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . *FASEB J.* 20, 670–682.
- Steindler, D.A., Settles, D., Erickson, H.P., Laywell, E.D., Yoshiki, A., Faissner, A., and Kusakabe, M. (1995). Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1971–1983.

- Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440, 1054–1059.
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., and Malenka, R.C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 3219–3228.
- Stephan, A.H., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 369–389.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164–1178.
- Streit, W.J., Hurley, S.D., McGraw, T.S., and Semple-Rowland, S.L. (2000). Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J. Neurosci. Res.* 61, 10–20.
- Stroemer, R.P., and Rothwell, N.J. (1998). Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 833–839.
- Sunico, C.R., González-Forero, D., Domínguez, G., García-Verdugo, J.M., and Moreno-López, B. (2010). Nitric oxide induces pathological synapse loss by a protein kinase G-, Rho kinase-dependent mechanism preceded by myosin light chain phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 973–984.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1–7.
- Suzuki, T., Hide, I., Matsubara, A., Hama, C., Harada, K., Miyano, K., Andrä, M., Matsubayashi, H., Sakai, N., Kohsaka, S., et al. (2006). Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J. Neurosci. Res.* 83, 1461–1470.
- Tahraoui, S. I., Marret, S., Bodénant, C., Leroux, P., Dommergues, M. a., Evrard, P., and Gressens, P. (2001). Central Role of Microglia in Neonatal Excitotoxic Lesions of the Murine Periventricular White Matter. *Brain Pathol.* 11, 56–71.
- Takahashi, K., Naito, M., and Takeya, M. (1996). Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol. Int.* 46, 473–485.
- Takahashi, K., Rochford, C.D.P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657.
- Takeuchi, H., Wang, J., Kawanokuchi, J., Mitsuma, N., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2006). Interferon- γ induces microglial-activation-induced cell death: A hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 22, 33–39.
- Tambuyzer, B.R., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., Ponsaerts, P., and Van Ginneken, C. (2012). Interferon- γ modulates the functional profile of in-vitro-cultured porcine microglia. *Neuroreport* 23, 519–524.

Taupin, P., and Gage, F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 69, 745–749.

Taylor, D.L., Diemel, L.T., Cuzner, M.L., and Pocock, J.M. (2002). Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 82, 1179–1191.

Taylor, D.L., Diemel, L.T., and Pocock, J.M. (2003). Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2150–2160.

Thrash, J.C., Torbett, B.E., and Carson, M.J. (2009). Developmental regulation of TREM2 and DAP12 expression in the murine CNS: implications for Nasu-Hakola disease. *Neurochem. Res.* 34, 38–45.

Tovar, K.R., Sprouffske, K., and Westbrook, G.L. (2000). Fast NMDA receptor-mediated synaptic currents in neurons from mice lacking the epsilon2 (NR2B) subunit. *J. Neurophysiol.* 83, 616–620.

Toyomitsu, E., Tsuda, M., Yamashita, T., Tozaki-Saitoh, H., Tanaka, Y., and Inoue, K. (2012). CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. *Purinergic Signal.* 8, 301–310.

Trang, T., Beggs, S., Wan, X., and Salter, M.W. (2009). P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3518–3528.

Trapp, B.D., Wujek, J.R., Criste, G.A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G.J., Stohlman, S., and Ransohoff, R. (2007). Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55, 360–368.

Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol* 8, e1000527.

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778–783.

Tsuda, M., Masuda, T., Kitano, J., Shimoyama, H., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8032–8037.

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., and Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.*

Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 11263–11268.

Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., and Rassendren, F. (2013). Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* n/a–n/a.

Veinante, P., and Deschênes, M. (1999). Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 5085–5095.

- Vela Hernández, J.M., Dalmau, I., González, B., and Castellano, B. (1997). Abnormal expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the spinal cord of the hypomyelinated Jimpy mutant mice. *Brain Res.* 747, 130–139.
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., and Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J. Anat.* 217, 436–448.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* 79, 555–566.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3974–3980.
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8138–8143.
- Weinstein, J.R., Koerner, I.P., and Möller, T. (2010). Microglia in ischemic brain injury. *Future Neurol.* 5, 227–246.
- Welser-Alves, J.V., and Milner, R. (2013). Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β 1 in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem. Int.* 63, 47–53.
- Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* 44, 851–859.
- Witcher, M.R., Kirov, S.A., and Harris, K.M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55, 13–23.
- Wollmer, M.A., Lucius, R., Wilms, H., Held-Feindt, J., Sievers, J., and Mentlein, R. (2001). ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J. Neuroimmunol.* 115, 19–27.
- Wolswijk, G. (1995). Strongly GD3⁺ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia* 13, 13–26.
- Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17, 205–242.
- Wu, C.-S., Ballester Rosado, C.J., and Lu, H.-C. (2011). What can we get from “barrels”: the rodent barrel cortex as a model for studying the establishment of neural circuits. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1663–1676.
- Wu, C.-Y., Kaur, C., Sivakumar, V., Lu, J., and Ling, E.-A. (2009). Kv1.1 expression in microglia regulates production and release of proinflammatory cytokines, endothelins and nitric oxide. *Neuroscience* 158, 1500–1508.
- Wu, L.-J., Vadakkan, K.I., and Zhuo, M. (2007). ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia* 55, 810–821.
- Xiang, Z., and Burnstock, G. (2005). Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia* 52, 119–126.

- Xu, J., and Ling, E.A. (1994). Upregulation and induction of major histocompatibility complex class I and II antigens on microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of recombinant interferon-gamma. *Neuroscience* 60, 959–967.
- Xu, H., Chen, H., Ding, Q., Xie, Z.-H., Chen, L., Diao, L., Wang, P., Gan, L., Crair, M.C., and Tian, N. (2010). The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* 65, 503–515.
- Yamada, J., Hayashi, Y., Jinno, S., Wu, Z., Inoue, K., Kohsaka, S., and Nakanishi, H. (2008). Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *Glia* 56, 1448–1462.
- Yanagisawa, T., Tsumoto, T., and Kimura, F. (2004). Transiently higher release probability during critical period at thalamocortical synapses in the mouse barrel cortex: relevance to differential short-term plasticity of AMPA and NMDA EPSCs and possible involvement of silent synapses. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3006–3018.
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (1999). Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* 154, 927–936.
- Yokoyama, A., Yang, L., Itoh, S., Mori, K., and Tanaka, J. (2004). Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* 45, 96–104.
- Von Zahn, J., Möller, T., Kettenmann, H., and Nolte, C. (1997). Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Neuroreport* 8, 3851–3856.
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6391–6410.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406.
- Zhang, F., Endo, S., Cleary, L.J., Eskin, A., and Byrne, J.H. (1997). Role of Transforming Growth Factor- β in Long-Term Synaptic Facilitation in Aplysia. *Science* 275, 1318–1320.
- Zhu, F., Zhang, L., Ding, Y., Zheng, Y., and Zhao, J. (2014). Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain. Behav. Immun.*
- Zielasek, J., and Hartung, H.P. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* 6, 191–122.
- Van Zundert, B., Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2004). Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci.* 27, 428–437.